

Maja Starčević

**POVEZANOST TJELESNE NEAKTIVNOSTI
S TUMORSKIM OBOLJENJIMA I BIOLOŠKI UČINCI
NOVOSINTETIZIRANIH DERIVATA KUMARINA
NA RAST LJUDSKIH STANICA „IN VITRO“**

1. UVOD

Intenzivno zagađenje okoliša, starenje svjetske populacije, tjelesna (ne)aktivnost, sedentarni način života i način prehrane imaju za posljedicu porast pojave tumorskih oboljenja, koja su postala jedan od vodećih uzročnika smrtnosti u svijetu (Wang i sur., 2009). U posljednjih nekoliko desetljeća tumorska oboljenja javljaju se sve češće te je važno uočiti njihov nagli porast pojavljivanja i kod mlađe populacije. Prema predviđanjima Svjetske zdravstvene organizacije do 2030. godine bit će 11.000 000 smrtnih slučajeva od tumora godišnje (World Health Organization, 2011). Uzročnici nastanka tumora brojni su i na njihovu pojavu ne utječe samo jedan čimbenik, nego više njih. Znanstveno je dokazano da tumorske bolesti mogu izazvati virusi, pušenje, UV i druga radijacijska zračenja, kemijske tvari iz hrane i okoliša, a nikako se ne smije izostaviti nasljedna sklonost razvoju novotvorina i tjelesna neaktivnost. Budući da se naš okoliš neprestano mijenja, velike su količine opasnih tvari u vodi i zraku pa se svojstva vode i zraka stalno mijenjaju u smislu akumulacije toksičnih tvari. Jedan od najvažnijih čimbenika u okolišu je svakako čovjek, koji je u najkraćem vremenu promijenio svoj okoliš, a mijenjajući prirodu izazvao je promjene koje djeluju i na njega samoga. Zbog svega navedenog važno mjesto u društvu ima zaštita ljudskog zdravlja i kvalitete okoliša, a potrebno je za poznavanje rizika od brojnih supstancija koje su proizvod našeg društva, a onda vezano za navedeno važna je edukacija učenika i studenata o posljedicama uprabe supstancija, načina života i prehrane, kao i sve češćih tumorskih oboljenja. Prema putu i načinu kojima je čovjek izložen, vrste toksičnih supstancija su: lijekovi, aditivi u hrani, dodaci prehrani za sportaše, što je posebno popularno među mlađom populacijom sportaša, ali i rekreativaca, što također može bitno utjecati na zdravlje pojedinca, a samim tim i na njegova sportska postignuća. Za tjelesnu aktivnost potrebna je energija, a nju dobijemo iz bjelančevina, masti i ugljikohidrata. U citoplazmi stanice ugljikohidrati se razgrađuju do pirogroždane kiseline. Ovaj mehanizam dobivanja energije rezultira padom pH vrijednosti, a to znači zakiseljavanje organizma. Poznato je da kiseli medij omogućava rast tumorskih stanica. Danas se tumori liječe kombinacijom kirurškog

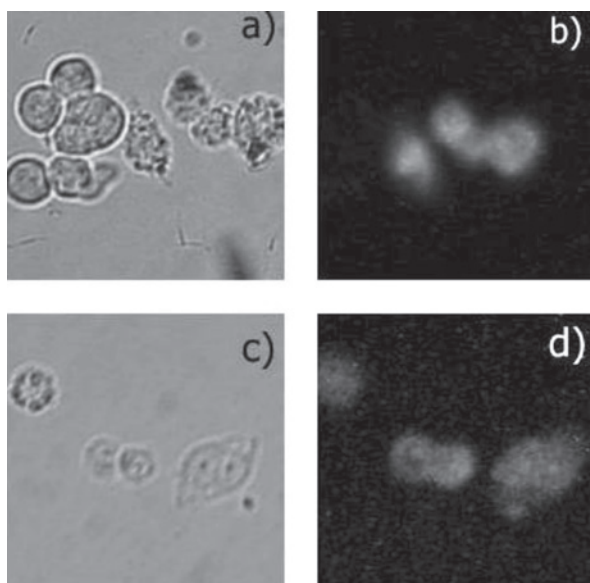
uklanjanja tumora, radioterapije, kemoterapije i hormonske terapije. Spojevi kumarina pronađeni u prirodi poznati su po svojim antibiotskim, antikoagulativnim, antitumorskim, fungicidnim, antialergijskim i drugim svojstvima (Čačić i sur., 2009). Kumarini su, poput drugih flavonoida i polifenolnih spojeva, snažni antioksidansi kako u hidrofilnom tako i u lipofilnom okolišu (Alves i sur., 1993). Karakterizira ih raznolika biološka aktivnost koja uključuje dokazano protubakterijsko (Rawal i sur., 2005), fungicidno (Vigorita i sur., 2001; Ottanà i sur., 2001; Vasconcelos i sur., 2009), protuparazitsko (Gursoy i Terzioglu, 2005), protuvirusno (Gududuru i sur., 2005), protuupalno (Alves i sur., 1993), analgetičko (Ottana i sur., 2005), antikonvulzivno (Malawska, 2005) i antitumorsko (Abdel Hafez i sur., 2009).

2. MATERIJALI I METODE

Potvrda čistoće i identifikacije dobivenih spojeva rađena je tankoslojnom kromatografijom, elementarnom mikroanalizom, IR spektrometrijom i ^1H NMR spektrometrijom. Otapala su destilirana s odgovarajućim sredstavima za sušenje kratko vrijeme prije upotrebe. Za vaganje uzoraka korištena je analitička vaga Mettler Toledo. Za kromatografiju na tankom sloju upotrijebljen je silikagel HF254 kao stacionarna faza, a kao mobilna faza otopina sastava: benzen:aceton:octena kiselina u omjeru 8:1:1. Za detekciju mrlja nakon kromatografije na tankom sloju korištena je UV lampa valnih duljina 254 nm i 356 nm. Točke tališta određene su na uređaju Electrothermal. ^1H -NMR spektri su snimljeni na Bruker spektrometru, dok je kao interni standard korišten tetrametilsilan (TMS). IR spektri su snimljeni na FT-IR spektrometru u krutom kalijevom bromidu. ^1H -NMR spektrometrija, elementarna mikroanaliza i IR spektrometrija napravljeni su u analitičkom istraživačkom centru instituta tvornice Pliva d.o.o. u Zagrebu i Institutu „Ruđer Bošković“ u Zagrebu. Biološka aktivnost derivata kumarina ispitana je na stanicama u kulturi: stanice karcinoma vrata maternice (HeLa), stanice adenokarcinoma debelog crijeva (CaCo2), stanice karcinoma ždrijela (HEp-2) stanice adenokarcinoma gušterače (MIA PaCa-2), satnice karcinoma pluća (NCI-H358) stanice adenokarcinoma dojke (MCF-7), humani fibroblasti (BJ), epitelne stanice bubrega izolirane iz psećeg bubrega (MDCK). Stanice su tripsinizirane i skupljene centrifugiranjem tijekom 5 minuta pri $300\times g$ okretaja u minuti. Dobro su izmiješane u mediju za uzgoj stanica kojem je dodan dimetil-sulfoksid (DMSO) u koncentraciji 10% i fetalni teleći serum u koncentraciji 20%. Jedan ml suspenzije stanica po ampuli za smrzavanje smrzavan je u hladnjaku na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 2 sata, a zatim je čuvana u tekućem dušiku. Određivanje citotoksičnosti derivata 7-hidroksikumarina na staničnim linijama provedeno je kolorimetrijskim MTT testom (Mickisch i sur., 1999).

3. REZULTATI I RASPRAVA

U prehrambenoj industriji derivati kumarina koriste se kao aditivi hrani, a u farmaceutskoj industriji kao dodaci kozmetičkim preparatima. Tiazolidinoni su upravo takvi spojevi jer se relativno jednostavno sintetiziraju, heterocikličke su prirode i prema tome kemijski vrlo reaktivni, a time s potencijalnom biološkom aktivnošću (Malik i sur., 2011). 1,3- Tiazolidin-2,4-dion derivati imaju veliko biološko značenje budući da inhibiraju enzim aldoza reduktazu, odgovoran za akumulaciju sorbitola u očima, živcima i bubrezima kod dijabetičara (Malik i sur., 2011). Kumarini se nalaze i u širokoj primjeni kao snažni terapijski agensi u liječenju koagulacijskih bolesti, što je važno i za sportaše i osobe koje se rekreativno bave sportom, jer najvažniji organski sustav svakako je kardiovaskularni, tako da sudjeluju u kontroli nekih serinskih proteaza, no mehanizam protupalnog djelovanja kumarina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (Alves i sur., 1993). Određivanjem inhibicijskih učinaka na rast tumorskih stanica MTT testom nađeno je kako svi ispitivani spojevi u koncentraciji 1×10^{-4} mol/dm³ inhibiraju rast tumorskih stanica. Schiff-ove baze s 7-hidroksi-(2-okso-2*H*-kromen-4-il)octenom kiselinom. Biološki učinci temelje se na hidrazonskim spojevima dodanim aktivnom farmakoforu (-CONH-N=CH-) (Narasimhan i sur., 2010) i oni značajno inhibiraju rast (30-60%) svih tumorskih stanica. Izuzetno otporne stanice adenokarcinoma dojke MCF-7 bile su osjetljive na ispitivane spojeve u koncentraciji 1×10^{-4} mol/dm³ nakon inkubacije tijekom 72 sata. Dosadašnjim studijama u kojima su ispitivani protutumorski učinci 7-hidroksikumarina i njegovih derivata, kao i 4-tiazolidinona i njegovih derivata nađeno je kako su oni snažni i selektivni antiproliferativni agensi za brojne karcinomeč. Za 7hidroksikumarin i njegove derivate nađeno je kako im je mehanizam djelovanja povezan s aktivacijom mitogenom aktiviranih proteinskih kinaza ERK1 i ERK2. Učinak 7-hidroksikumarina na DNA strukturu dokazan je radom Finn. i sur u gdje je dokazan njegov učinak na relaksaciju DNA koju katalizira enzim topoizomeraza II (Finn i sur., 2004; Ottana i sur., 2005). Nadalje, nađeno je kako djeluju tako da aktiviraju signalne puteve u stanici koji su povezani sa staničnom diferencijacijom i apoptozom (Gududuru i sur., 2005; Finn i sur., 2004). Rezultati ispitivanja pokazali su da se stanice morfološki mijenjaju nakon inkubacije, a dokazano je i ireverzibilno izlaganje fosfatidil-serina na vanjskoj strani plazmine membrane, koje se smatra ranim događajem u apoptozi (programirano umiranje stanice). Izlaganje fosfatidil-serina pojavljuje se prije razgradnje jezgrinih proteina, razgradnje dijelova citoskeleta, kondenzacije kromatina i fragmentacije DNA (Elmore, 2007).



Slika 1. Apoptoza u stanicama CaCO-2 (karcino debelog crijeva) izloženim derivatima kumarina. Vitalne stanice nisu vezale flourescein, stanice u ranoj apoptozi svjetle zeleno, dok u kasnoj apoptozi i nekrozi membrana svjetli zeleno.

4. ZAKLJUČAK

Brojna znanstvena istraživanja nedvojbeno argumentirano prikazuju povezanost između tjelesne aktivnosti i zdravlja. Rezultati idu u prilog pozitivnog utjecaja tjelesne aktivnosti i negativnog utjecaja sedentarnog načina života na zdravlje, koji, između ostalih čimbenika, za posljedicu ima sve veći broj oboljelih od tumorskih bolesti, posebice kod mlađe populacije. Snažan dokaz ukazuje da je tjelesna neaktivnost povezana s 30-40% višim rizikom za rak debelog crijeva. Nešto manje postojan dokaz upućuje da TNA povećava rizik za nastanak raka dojke kod pre i postmenopauzalnih žena za 20-30%. (Friedenreich, 2001, Lee et al., 2001., Thune and Furberg, 2001, Vainio and Bianchini, 2002, Dorn et al., 2003., McTiernan et al., 2003., Rintala et al., 2002., 2003) Ovo istraživanje pokazalo je osrednji učinak novosintetiziranih derivata kumarina na inhibiciju rasta tumorskih stanica, što je u skladu s dosadšnjim rezultatima. S druge strane nisu inhibirali rast normalnih stanica. Ograničeni dokazi idu u prilog povezanosti TNA i povećanog rizika za rak endometrija i prostate. (Vainio and Bianchini 2002., Dhillon and Holt, 2003, Furberg and Thune, 2003) Iako u službi zdravlja medicina ima najveću ulogu, za uspješnu primjenjivost zdravih načela u životu pojedinca i društva u cjelini, potrebna je suradnja više institucija na programima promocije zdravlja: vladinih, zdravstvenih i stručnih tijela, edukacija

javnosti putem medijskih kampanja, osiguravanje površina za rekreaciju i primjerenu tjelesnu aktivnost itd. Povećanje tjelesne aktivnosti nije samo problem pojedinca, već i društvena potreba.

5. LITERATURA

1. Abdel-Hafez, O.M., Amin, K.F., Abdel-Latif, N.A., Mohmed, T.K., Ahmed, E.Y., Maher, T. (2009). Synthesis and Antitumor Activity of some New Xanthoxin driates. Eurpoean
2. Alves, A.J., Leite, A.C.L., Santana, D., Beltrão, T.M., Coelho, M.R.D. (1993). Synthesis of 2-thiazolinone as potential antiprotozoal activity. *II Fármaco* 48: 1167
3. Ćaćić, M., Molnar, M. i Drača, N. (2009). Design and synthesis of some thiazolidine-4-ones based on (7-hydroxy 2-oxo-2H-chromen-4-yl) acetic acid. *Molecules* 14: 2501-2513
4. Dhillon, P.K. & Holt, V.L. (2003). Recreational physical activity and endometrioma risk. *American Journal of Epidemiology*, 158, 156-164. 17. Dorn J, Vena J, Brasure J, Freudenheim J & Graham S (2003).
5. Elmore, S. (2007). Apoptosis. A review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35: 495-516
6. Finn, G.J., Creaven, B.S., Egan, D.A. (2004). Investigation of intracellular signalling events mediating the the mechanism of action of 7-hydrxycoumarin and 6-nitro-7-hydroxy coumarin in human renal cells. *Cancer Letters.*205(1): 69-79
7. Friedenreich, C.M. (2001). Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. *Cancer Epidemiology*, 10, 287-301.
8. Gududuru, V., Hurh, E., Dalton, T.J. and Miller, D.D. (2005). Discovery of 2-arylthiazolidine-4-carboxylic acid amides as a new class of cytotoxic agents for prostate cancer *J. Med. Chem.* 48: 2584
9. Gursoy, A., Terzioglu, N. (2005). Synthesis and Isolation of New Regioisomeric 4-Thiazolidinones and Their Anticonvulsant Activity. *Turk J. Chem* 29: 247-254
10. Guyton, A.C. i Hall, J.E. (2012). *Medicinska fiziologija – udžbenik*. 12. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. (1031.-1041. str.)
11. Heimer, S. (2009). *Elektivni predmet Epidemiologija tjelesne aktivnosti, izabrani materijali: priručnik za potrebe nastave Kineziološkog fakulteta sveučilišta u Zagrebu.* (153.-163. str.)

12. McTiernan, A., Kooperberg, C., White, E., Wilcox, S., Coates, R., Adams-Cambell, L.L. et al. (2003). Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of American Medical Association (JAMA)*, 290, 1331-1336.
13. Štalić, Z., Sorić, M., Mišigoj-Duraković, M., *Sportska prehrana, Znanje, Zagreb*, 2016.
14. Mišigoj-Duraković, M. et al. (1999). Tjelesno vježbanje i zdravlje: znanstveni dokazi stavovi i preporuke. Zagreb: Grafos. (267-276, 277-283, 326-333 str.)
15. Malawska, B. (2005). New anticonvulsant agents. *Current Topics in Medicinal Chem.* 5: 69-85
16. Malik, S., Upadhyaya, P.K., Miglani, S. (2011). Thiazolidinediones: A Pletho of Biological Load. *Int. J. Pharm. Tech Res* 3: 62-75
17. Mickisch, G., Fajta, S., Keilhauer, G., Schlick, E., Tschada, R., Alken, P. (1990). Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by tetrazolium based microculture assay (MTT). *Urol. Res.* 18: 131-136
18. Ottana, R., Carotti, S., Maccari, R., Landini, I., Chiricosta, G., Caciagli, B., Vigorita, M.G. and Mini, E. (2005). In vitro antiproliferative activity against human colon cancer cell lines of representative 4-thiazolidinones. Part I. *B&M Chem. Letters* 15: 3930-3933
19. Rintala, P., Pukkala, E., Laara, E. & Vihko, V. (2003). Physical activity and breast cancer risk among female physical education and language teachers: a 34- year follow-up. *International Journal of Cancer*, 107, 268-270.
20. Vainio, H. & Bianchini, F. (Eds.) (2002). Weight control and physical activity. In *IARC handbooks of cancer prevention (Volume 6, pp. 1 – 315)*. Lyon: IARC Press.
21. Vasconcelos Juliana F., Teixeira Mauro M., Barbosa-Filho José M., Agra Maria F., Nunes Xirley P., Giulietti Ana Maria, Ribeiro-dos-Santos Ricardo, Soares Milena B.P. (2009). Effects of mbeliferone in a murine model of allergic airway inflammation. *European J. Pharmacol.* 609(1-3): 126-131 World Health Organization, 2011. Fact sheet N°297