

Kemijska i biološka evaluacija organskih ekstrakata plaštenjaka, *Phallusia mammillata*, iz Jadranskog mora

Šurlina, Karlo

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:577615>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-07**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Karlo Šurlina

*Kemijska i biološka evaluacija organskih ekstrakata plaštenjaka, Phallusia
mammillata, iz Jadranskog mora*

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Karlo Šurlina

*Kemijska i biološka evaluacija organskih ekstrakata plaštenjaka, Phallusia
mammillata, iz Jadranskog mora*

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: *izv. prof. dr. sc. Dean Marković*

Ko-mentor rada: *izv. prof. dr. sc. Gabriela Ambrožić*

Neposredni voditelj: *mag. med. chem. Dario Matulja*

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Graduate programme "*Drug research and development*"

Karlo Šurlina

*Chemical and biological evaluation of organic extracts of Adriatic sea
ascidian, Phallusia mammillata*

Master's thesis

Rijeka, 2020.

Diplomski rad obranjen je dana 9. prosinca 2020. godine pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Sedić, predsjednica
2. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić, članica
3. izv. prof. dr. sc. Gabriela Ambrožić, članica
4. izv. prof. dr. sc. Dean Marković, član

Rad ima 54 stranica, 12 slika, 6 tablica i 46 literaturnih navoda.

Diplomski rad je dijelom na opremi Centra za visokopropusne tehnologije te se zahvaljujem pristupu znanstvenoj opremi nabavljenoj projektom Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci (RISK)“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn. Diplomski rad je izrađen u sklopu projekta "Bioprospecting Jadranskog mora" uz financijsku pomoć istraživačkih potpora Sveučilišta u Rijeci, UNIRI-biomed-18-133 (1277) i UNIRI-prirod-18-102.

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem izvanrednom profesoru dr. sc. Deanu Markoviću na pruženoj prilici izrade diplomskog rada pod njegovim mentorstvom te trudu i razumijevanju.

Posebno se zahvaljujem doktorandu Dario Matulji na angažiranosti, pomoći i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada te na provođenju ABTS eseja i kvalitativnog kemijskog probira.

Zahvaljujem se doktorandici Petri Grbčić na provođenju MTT eseja.

Zahvaljujem se doktorandici Martini Mušković na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Sažetak

Phallusia mammillata (Cuvier, 1815) je plaštenjak koji se prilagodio ekstremnim uvjetima morskog okoliša proizvodnjom bioaktivnih sekundarnih metabolita koji štite organizam od predatora te pomažu u lovu i borbi za moguće stanište. Morski sekundarni metaboliti, zbog svojih jedinstvenih kemijskih struktura te širokog spektra bioloških aktivnosti, mogu biti izvor novih kandidata lijekova. Većina istraživanja koja su se do sada provela na *P. mammillata*, proučavala su osnovne razvojne procese, no nema puno radova o biološkim aktivnostima ekstrakata plaštenjaka ili njegovih sekundarnih metabolita. Zato smo u sklopu ovog diplomskog rada proveli evaluaciju biološkog potencijala krutih organskih ekstrakata *P. mammillata*, *in vitro*. Ekstrakcija organizma je provedena pomoću pet otapala različitih polarnosti: petroletera, diklormetana, etanola, metanola i acetonitrila kako bi se odredilo najprikladnije otapalo za daljnju ekstrakciju plaštenjaka. Optimizacijom ekstrakcije utvrđeno je da je petroleter najprikladnije nepolarno otapalo, a etanol najprikladnije polarno otapalo obzirom na iskorištenja ekstrakcija. Antioksidativna aktivnost krutih organskih ekstrakata *P. mammillata* je ispitana pomoću ABTS i DPPH esej. Antiproliferativni i citotoksični učinci ekstrakata, izraženi kao IC₅₀ i LC₅₀ vrijednosti, redom, su procijenjeni pomoću MTT esej na tumorskim staničnim linijama karcinoma debelog crijeva (HCT116), duktalnog adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1), metastatskog tumora dojke (MCF-7), hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) te netransformiranim ljudskim fibroblastima (HFF-1). Alkoholni i acetonitrilni ekstrakti su pokazali značajnu ABTS antiradikalnu aktivnost. Značajna DPPH antiradikalna aktivnost nije opažena kod nijednog ekstrakta *P. mammillata*. Petroleterski ekstrakt je jedini pokazao značajan antiproliferativan i citotoksičan učinak na tumorskim staničnim linijama. Proveden je kvalitativni kemijski probir kako bi se utvrdilo koje skupine metabolita mogu biti odgovorne za ispitane biološke aktivnosti. Svi ekstrakti *P. mammillata* su pokazali prisutnost fenola i alkaloida. Terpenoidi, glikozidi i steroidi su jedino bili uočeni u

ekstraktima petroletera i acetonitrila dok su saponini jedino bili prisutni u ekstraktu acetonitrila.

Ključne riječi: *Phallusia mammillata*, kruti organski ekstrakti, antioksidativna aktivnost, citotoksičnost, kvalitativni kemijski probir

Abstract

Phallusia mammillata (Cuvier, 1815) is a tunicate which has adapted to the harsh marine environment by production of the secondary bioactive metabolites that provide protection from predators, aid in hunting process and defend their territory against invading competitors. Because of their unique chemical structures and diverse biological activities, marine secondary metabolites can be used to design and develop new potentially useful therapeutic agents. Majority of studies using *P. mammillata* investigated its basic development processes, but biological activities of tunicate extracts or its secondary metabolites have not been thoroughly described. Thus, the evaluation of *in vitro* biological potential of crude organic extracts of tunicate *P. mammillata* was conducted. To determine the most suitable organic solvent for the extraction process, the organism was extracted by using five solvents of different polarity: petroleum ether, dichloromethane, ethanol, methanol and acetonitrile. Petroleum ether and ethanol were the most suitable nonpolar and polar solvents, respectively, based on extraction yields. Antioxidant activity of *P. mammillata* crude organic extracts was tested by ABTS and DPPH assays. Antiproliferative and cytotoxic activities, expressed as IC₅₀ and LC₅₀ values, respectively, were evaluated by MTT assay by using following tumor cell lines: colorectal carcinoma (HCT116), ductal pancreatic adenocarcinoma (CFPAC-1), metastatic breast cancer (MCF7), hepatocellular carcinoma (HepG2) as well as non-transformed skin fibroblasts (HFF). Alcoholic and acetonitrile extracts showed significant ABTS scavenging activity. Significant DPPH scavenging activity was not observed in any of the organic extracts. Only petroleum ether extract demonstrated significant antiproliferative and cytotoxic activity against tumor cell lines. To evaluate which natural products classes may be responsible for observed biological activities, the presence of bioactive metabolites in *P. mammillata* organic extracts was evaluated by specific and qualitative colorimetric tests. Qualitative chemical screening of organic extracts revealed the presence of phenolic compounds

and alkaloids in each tested sample. Terpenoids, sterols and glycosides were present in petroleum ether and in acetonitrile extract, while absent in the rest of samples. Saponins were detected only in acetonitrile extract.

Key words: *Phallusia mammillata*, crude organic extracts, antioxidant activity, cytotoxicity, qualitative chemical screening

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Morski bioaktivni spojevi	1
1.2. Antioksidativna aktivnost morskih bioaktivnih spojeva	2
1.2.1. Slobodni radikali, oksidativni stres i antioksidansi	2
1.2.2. Antioksidativna aktivnost prirodnih spojeva morskog podrijetla	5
1.2.3. Antioksidativni eseji	6
1.2.3.1. ABTS esej.....	8
1.2.3.2. DPPH esej.....	9
1.3. Protutumorska aktivnost morskih bioaktivnih spojeva	10
1.3.1. Ispitivanje protutumorske aktivnosti pomoću MTT eseja	15
1.4. Plaštenjaci	16
2. CILJ RADA	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Kemikalije i reagensi.....	20
3.2. Probir plaštenjaka <i>P. mamillata</i>	20
3.3. Optimizacija ekstrakcije plaštenjaka <i>P. mamillata</i>	20
3.4. Kvalitativni kemijski probir ekstrakata <i>P. mamillata</i>	21
3.5. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti	22
3.5.1. ABTS esej.....	22
3.5.2. DPPH esej.....	23
3.6. Ispitivanje antiproliferativnog i citotoksičnog učinka	24
3.6.1. MTT esej	24
4. REZULTATI.....	26
4.1. Optimizacija ekstrakcije plaštenjaka <i>P. mamillata</i>	26
4.2. Kvalitativni kemijski probir ekstrakata <i>P. mamillata</i>	26

4.3. ABTS esej	30
4.4. DPPH esej	33
4.5. MTT esej	36
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČAK	46
7. LITERATURA.....	47
8. ŽIVOTOPIS.....	53

1. UVOD

1.1. Morski bioaktivni spojevi

Morska flora i fauna je izložena različitim stresnim čimbenicima poput nedostupnosti hrane i svjetlosti, razlikama u tlaku i temperaturi te slanosti (1). Kako bi preživjeli u kompetitivnom okolišu, morski organizmi, pogotovo sjedilački, proizvode sekundarne metabolite, molekule koje primarno nisu odgovorne za rast, razvoj i razmnožavanje organizma već služe za lov, obranu od predatora i nadmetanje za prostor. Ove molekule nisu produkti glavnih metaboličkih puteva, odnosno nisu neophodne za preživljenje organizma. Alkaloidi, fenoli, terpenoidi, steroidi, šećeri, peptidi i poliketidi jedinstvenih kemijskih struktura i širokog raspona biološke aktivnosti su izolirani iz morskih organizama (2). Nadalje, morski organizmi su se pokazali kao dobri izvori halogeniranih metabolita koji uključuju peptide, poliketide, indole, terpene, acetogenine, fenole te hlapljive ugljikovodike. Kod algi, koje su predmet najvećeg broja istraživanja morskih organizama, otkrivena je prisutnost klora i broma primarno u crvenim i zelenim algama te joda u smeđim algama. Morska trava *Laminaria digitata* ima koncentraciju joda 30,000 puta veću od koncentracije halogenog atoma u morskoj vodi, te čini prosječno 1% suhe mase. Modifikacija metabolita halogenim atomima značajno utječe na njihovu biološku aktivnost. Primjerice, halogenirani sesterterpeni, neomangikoli A i B izolirani iz morske gljive *Fusarium*, su pokazali *in vitro* citotoksičnost na tumorskoj staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva (HCT-116). S druge strane, njihov nehalogenirani analog neomangikol C nije bio aktivan prema istim tumorskim stanicama (3). Također, smeđe i crvene alge su bogati izvor halogeniranih polifenolnih spojeva poput bromofenola i florotanina, čiji je protutumorski potencijal također ispitan u *in vitro* uvjetima (4).

More je kao i morska flora i fauna igrala kroz povijest značajnu ulogu u razvoju i životu ljudi. Tako na primjer, u azijskim zemljama morski organizmi su bili te još uvijek jesu sastavni dio prehrane zbog svojih nutritivnih vrijednosti. Nadalje, zbog učinkovitih bioloških djelovanja,

koristili su se za tretman bolesti jetre, natečene štitnjače, cista i oteklina (5). Razvitkom modernog ronjenja sredinom prošlog stoljeća počelo je sustavno istraživanje morske flore i faune, odnosno izolacija te biološka ispitivanja sekundarnih metabolita. Identificirani metaboliti su pokazali da morski okoliš obiluje bio- i kemijskom raznolikošću te da je potencijalni izvor novih molekula, koje nisu prisutne kod kopnene flore i faune (1,6). Do danas je izolirano više od 29,000 spojeva iz morskih organizama (7). Osim protutumorskih lijekova koji su kasnije opisani (poglavlje 1.4.), odobreno je još četiri lijeka s različitim terapijskim učincima. Tako je Vidarabin (Vira-A®), sintetski analog nukleozida spongouridina izoliran iz karipske spužve *Tectitethya crypta*, odobren 1976. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) za liječenje virusnih infekcija uzrokovanih *Herpes simplex*-om i *Varicella zoster*-om (8,9). Etil esteri omega-3 kiselina (Omacor®), prisutne u ribljem ulju odobrene su 2001. godine u Europi za tretman hipertrigliceridemije. Peptid izoliran iz otrova puža stošca *Conus magus* čiji je sintetski ekvivalent Zikonotid (Prialt®), odobren je 2004. godine u SAD-u za tretman kronične boli (8). Jota-karagenan (Carragelose®), protutuvirusni polimer primarno ekstrahiran iz crvene alge *Eucheuma denticulatum*, je 2018. godine odobren u Europi za liječenje bolesti dišnog sustava (10).

1.2. Antioksidativna aktivnost morskih bioaktivnih spojeva

1.2.1. Slobodni radikali, oksidativni stres i antioksidansi

Slobodni radikali su nestabilni i reaktivni atomi ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci (11). Ove reaktivne molekule nastaju kao nusprodukti aerobnog metabolizma (stanični redoks procesi, enzimske i ne-enzimske reakcije), najčešće u mitohondrijama ili zbog egzogenih izvora i životnog stila poput zagađenja zraka, zračenja, ozona, trovanja teškim metalima, dima cigarete te alkohola (12). Najpoznatiji slobodni radikali su reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*, ROS) poput hidroksil radikala ($\text{HO}^\bullet$), superoksidnog anionskog radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$), vodikovog peroksida (H_2O_2), singlet kisika ($^1\text{O}_2$), alkoksil radikala

(RO•), hipokloritne kiseline (HOCl), ozona (O₃), peroksil radikal (ROO•), lipidnog peroksila (LOO•) te reaktivne dušikove vrste (eng. *reactive nitrogen species*, RNS) poput dušikovog (II) oksida (NO•), dušikovog (IV) oksida (NO₂•), peroksinitrita (ONOO⁻) te nitritne kiseline (HNO₂). Pro-oksidansi koji nisu radikali, ali najčešće sudjeluju u radikalnim reakcijama zbog svog oksidativnog potencijala su prijelazni metali poput bakra, željeza i mangana (8). Slobodni radikali imaju dvojaku ulogu u ljudskom organizmu: protektivnu i štetnu. Pri niskim i umjerenim koncentracijama, potrebni su za sintezu staničnih struktura, sudjeluju u staničnoj signalizaciji i dio su obrambenih mehanizama imunološkog sustava u borbi protiv patogena. Međutim, pri višim koncentracijama, kada se višak slobodnih radikala ne može neutralizirati, njihova akumulacija u organizmu uzrokuje oksidativni stres (11). Oksidativni stres je posljedica neravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i nesposobnosti organizma da spriječi njihove štetne učinke pomoću antioksidansa, odnosno remećenje redoks signaliziranja i njegove kontrole (11,12). Tijekom oksidativnog stresa, slobodni radikali uzrokuju strukturna i funkcionalna oštećenja u biološkim makromolekulama, proteinima, lipidima i DNA (13). Lipidna peroksidacija uzrokuje oštećenja u lipidnom dvosloju i lipoproteinima što dovodi do promjena u strukturnom integritetu staničnih membrana i mikrookolišu membranskih proteina. Oksidacijom bočnih lanaca aminokiselina i peptidnih okosnica može doći do smanjenja ili gubitka funkcija proteina poput enzima, signalnih molekula, ionskih kanala te strukturnih proteina. Oksidativna oštećenja DNA se manifestiraju kao lomovi jednog ili oba lanca nukleinske kiseline te unakrižnog povezivanja DNA (stvaranje adukata i lezija) što uzrokuje mutacije u samoj molekuli. Krajnja posljedica oksidativnog stresa u organizmu su stanična te tkivna oštećenja zbog okrnjenih funkcija stanica, odnosno apoptoza stanica koja imaju višak slobodnih radikala, to jest manjak antioksidansa (14). U patofiziološkim uvjetima, neravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa je izraženija što je bitno kod sprječavanja i liječenja bolesti i poremećaja jer oksidativni stres pridonosi razvoju raka, neurodegenerativnih bolesti, upala te starenja.

Ljudski organizam može neutralizirati slobodne radikale pomoću antioksidansa, koji se mogu prirodno stvoriti *in situ* ili unijeti u organizam putem prehrane i dodataka za prehranu (11). U biologiji, antioksidansom se smatra bilo koja tvar ili spoj koji pri relativno niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijom biomolekule koja može oksidirati, odgoditi ili inhibirati oksidaciju te biomolekule (13). U prehrambenoj industriji, antioksidansi su prirodne ili umjetne tvari dodane proizvodima kako bi se spriječilo ili odgodilo njihovo kvarenje zbog reakcija kisika u zraku, to jest kako bi se spriječio proces užeglosti (15). Prema vrsti reakcije sa slobodnim radikalima, antioksidansi se mogu podijeliti na primarne ili žrtvene (eng. *sacrificial*) antioksidanse, koji zaustavljaju lančane radikalske reakcije inhibicijom ROS/RNS i sekundarne ili preventivne antioksidanse, koji sprječavaju stvaranje reaktivnih slobodnih radikala (13,15). U lančanim reakcijama, kada radikal otpusti ili primi elektron, nastaje drugi radikal. Ovaj proces se ponavlja dok se slobodni radikal ne stabilizira primarnim antioksidansima ili pretvori u neštetan ne-radikalni ili nereaktivan produkt, najčešće prijenosom atoma vodika. Sekundarni antioksidansi sprječavaju oksidaciju inhibicijom singlet kisika, razgradnjom peroksida, keliranjem pro-oksidativnih metala, inhibicijom oksidativnog enzima ili apsorpcijom UV zračenja (12). Prva linija obrane protiv slobodnih radikala u ljudskom organizmu su enzimi superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza.

Umjetni antioksidansi poput butiliranog hidroksitoluena i hidroksianisola, tert-butilhidrokinona i propil galata se obično dodavaju hrani radi usporavanja procesa užeglosti. Međutim, ovi umjetni antioksidansi potencijalno su opasni po zdravlje, stoga se njihova uporaba u hrani ne preporuča. Također, dodatci prehrani koji su bogati umjetnim antioksidansima nisu strogo regulirani poput lijekova, odnosno ne mora se dokazati njihova sigurnost i učinkovitost. Zato su se farmaceutska i prehrambena industrija ponovo okrenuli razvoju antioksidansa iz prirodnih izvora, poput morske flore i faune.

1.2.2. Antioksidativna aktivnost prirodnih spojeva morskog podrijetla

Uz alge i mikroorganizme, morski beskralješnjaci su najbogatiji izvori prirodnih antioksidansa među kojima su najbolju aktivnost pokazali karotenoidi, sulfatni polisaharidi, fenoli i bioaktivni peptidi (4,16,17). Karotenoid astaksantin je ksantofil crvene boje koji je pokazao bolje antioksidativno djelovanje od uobičajenih antioksidansa koji se koriste u dodacima prehrane, vitamina E i β -karotena (4). U jednom istraživanju, astaksantin je uzrokovao smanjenje veličine i težine tumorskih stanica fibrosarkoma kod miševa hranjenih karotenoidom (0,02%, 40 mg/kg/dan kroz tri tjedna) u usporedbi s kontrolnom skupinom koja nije hranjena astaksantinom (16). On je jedan od karotenoida dostupan na tržištu kao dodatak prehrani koji se komercijalno dobiva iz zelene mikroalge *Haematococcus pluvialis* (18). Fukoksantin je najzastupljeniji karotenoid u morskim smeđim algama koji čini više od 10% ukupne proizvodnje prirodnih karotenoida. Fukoksantin ekstrahiran iz alge *Sargassum siliquastrum* je pokazao značajan antioksidativan i protektivan učinak *in vitro*. Vero stanice (epitelne stanice bubrega) tretirane su koncentracijama fukoksantina od 5, 50, 100 i 200 μ M te potom s 50 μ M vodikovog peroksida tijekom 24 sata. Tretman s karotenoidom je uspio spriječiti citotoksično djelovanje reaktivne kisikove vrste u koncentracijski ovisnom učinku (63,6%, 69,4%, 78,5% i 89,2% vijabilnosti Vero stanica, redom) (16).

Najproučavaniji morski polifenolni spojevi su florotanini i bromofenoli izolirani iz smeđih i crvenih algi, redom (4). Derivati florotanina poput ekola, diekola, biekola, fukodifloroetola i florofukofuroekola A izolirani iz alge *Ecklonia cava* su pokazali značajnu antioksidativnu aktivnost inhibicijom DPPH• radikala (raspon IC_{50} = 8,28 $\pm$ 0,45 – 22,89 $\pm$ 0,52 μ M) te vezanjem za hidroksil radikal (raspon IC_{50} = 28,60 $\pm$ 2,60 – 51,8 $\pm$ 2,50 μ M), superoksidni anion radikal (raspon IC_{50} = 15,9 $\pm$ 1,30 – 26,50 $\pm$ 1,25 μ M) i peroksil radikal (raspon IC_{50} = 14,50 $\pm$ 1,85 – 28,40 $\pm$ 1,50 μ M).

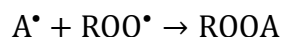
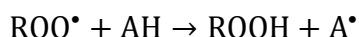
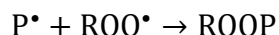
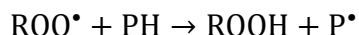
Stanične stijenke algi su bogate sulfatnim polisaharidima poput fukoidana, alginata i luminarina u smeđim algama, karagenana i agara u crvenim algama i ulvana u zelenim algama koji pokazuju antioksidativno djelovanje (19). Primjerice, fukoidan modulira bolesti i poremećaje povezane s oksidativnim stresom regulacijom prirodnih antioksidativnih obrambenih sustava i staničnih puteva. Fukoidan, izoliran iz *Turbinaria decurrens*, je smanjio oksidativno oštećenje jetre štakora izazvanog alkoholom smanjenjem razina markera lipidne peroksidacije malondialdehida i reaktivnih spojeva tiobarbiturične kiseline te povećao razine antioksidativnih enzima katalaze, superoksid dismutaze i glutation peroksidaze. Fukoidan, izoliran iz *Fucus vesiculosus*, aktivacijom signalnog puta protein kinaze B je značajno povećao ekspresiju superoksid dismutaze, a smanjio razinu ROS-a u mezenhimalnim matičnim stanicama koje su transplantirane na miša (17).

Morski bioaktivni peptidi su produkti hidrolize proteina riba, rakova, mekušaca i algi koji se primarno dobivaju iz kože, mišića i peraja tih organizama. Hidrolizat pepsina, valin-glutaminska kiselina-cistein-tirozin-glicin-prolin-asparagin-arginin-prolin-glutamin-fenilalanin, izoliran iz zelene mikroalge *Chlorella vulgaris*, je pokazao bolju ABTS antiradikalnu aktivnost ($IC_{50} = 9,8 \pm 0,5 \mu M$) od standarada vitamina C, Trolox-a i umjetnog antioksidansa butiliranog hidroksitoluena ($IC_{50} = 30,0 \pm 0,8$, $32,5 \pm 1,3$ i $57,4 \pm 2,3 \mu M$, redom) (18).

1.2.3. Antioksidativni eseji

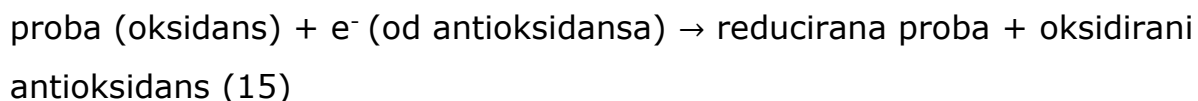
Antioksidativna aktivnost organizma ili spoja se može ispitati pomoću dvije vrste reakcija: prijenosom atoma vodika (eng. *hydrogen atom transfer*, HAT) i prijenosom elektrona (eng. *electron transfer*, ET) (13). U HAT esejima se odvijaju kompetitivne reakcije u kojima se antioksidans i molekulska proba (zamjena za supstrat) natječu za peroksil radikale kroz toplinsku razgradnju azo-spojeva. Reakcija prijenosa atoma vodika se sastoji od inicijatora azo-radikala, UV ili fluorescentne molekulske probe koja se može oksidirati te koja služi za praćenje reakcije. Većina eseja prati

kinetiku kompetitivnih reakcija, to jest kvantifikacija je određena iz kinetičkih krivulja. Mehanizam reakcije prijenosa atoma vodika je sljedeći:



ROO• označava peroksil radikale, PH probu te AH antioksidans. HAT eseji koji se uobičajeno provode su ORAC (eng. *oxygen radical absorbance capacity*) te TRAP (eng. *total radical-trapping antioxidant parameter*) eseji, eseji inhibicije autooksidacije lipoproteina niske gustoće i eseji izbjeljivanja krocina.

ET eseji mjere sposobnost antioksidansa da reducira oksidans, pri čemu dolazi do promjene boje uslijed odvijanja kemijske reakcije. Stupanj promjene boje je proporcionalan koncentraciji antioksidansa u uzorku. ET eseji se temelje na idućoj reakciji prijenosa elektrona:



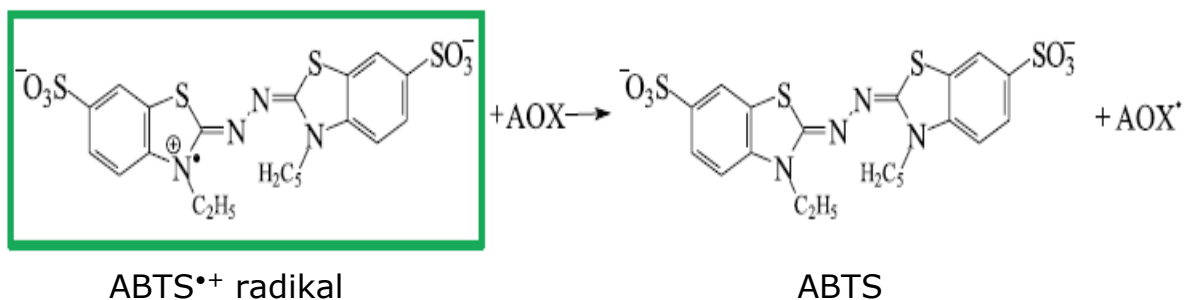
Oksidans je ujedno i fluorescentna ili obojena proba namijenjena za praćenje reakcije. Reakcije prijenosa elektrona uključuju esej određivanja ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, ABTS ili TEAC (eng. *Trolox equivalence antioxidant capacity*), FRAP (eng. *ferric ion reducing antioxidant power*) i DPPH eseja te eseja određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala koristeći Cu(II) kompleks kao antioksidans. Antioksidativni eseji daju odgovore na ulogu slobodnih radikala u bolestima i poremećajima povezanim s oksidativnim stresom. Uglavnom se temelje na mjerenju promjena apsorbancija što uvelike olakšava njihovu uporabu (13).

Treba naglasiti da postoji razlika između antiradikalne i antioksidativne aktivnosti, kao i između antioksidativne aktivnosti i antioksidativnog

kapaciteta. Pojam antiradikalna aktivnost označava sposobnost spojeva da reagiraju sa slobodnim radikalima, dok je antioksidativna aktivnost sposobnost inhibicije procesa oksidacije (20). Nadalje, antioksidativna aktivnost proučava kinetiku reakcije između antioksidansa ili slobodnog radikala kojeg antioksidans reducira, dok antioksidativni kapacitet mjeri učinkovitost termodinamičke pretvorbe kada oksidans, odnosno proba reagira s antioksidansom (13). Ukupni antioksidativni kapacitet uključuje kapacitet keliranja toksičnih metala, kapacitet vezanja ROS i RNS te kapacitet inhibicije oksidativnih enzima (15).

1.2.3.1. ABTS esej

ABTS esejom se mjeri relativna sposobnost antioksidansa da veže $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikal stvoren u vodenoj fazi, koji se potom uspoređuje sa standardom, Trolox-om (analog vitamina E topljiv u vodi). ABTS esej je česti odabir za proučavanje antioksidativne aktivnosti širokog raspona materijala (20). Esej je tehnički jednostavan, reakcije su brze (u većini metoda reakcija traje 30 minuta ili kraće) i može se izvesti u širokom rasponu pH. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikal je radikal plave boje s valnom duljinom maksimalne apsorpcije pri 734 nm. Topljiv je u vodenim i organskim otapalima pa se stoga može koristiti u različitim medijima za određivanje hidrofilne i lipofilne antioksidativne aktivnosti. Izvorna (eng. *stock*) otopina $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikala se razrjeđuje vodom, puferom ili organskim otapalima do iznosa apsorpcije između 0,7 i 1 pri 734 nm. Dobiva se reakcijom ABTS soli i oksidirajućih tvari poput kalijevog persulfata, kalijevog permanganata ili manganovog dioksida. U varijacijama ovog esej, lakaza, $\text{Br}_2^{\bullet-}$ (bromov anionski radikal), vodikov peroksid s hrenovom peroksidazom te peroksil radikal se mogu koristiti kao oksidansi. Od svih oksidirajućih tvari, persulfatna oksidacija se preferira zbog visokog prinosa $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikala i inertnosti prema radikalu i antioksidansima. Početna apsorpcija otopine $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikala pri 734 nm se očitava, potom se doda antioksidans, te se mjeri opadanje vrijednosti apsorpcija uzoraka, od četiri minute do nekoliko sati (13).



Slika 1. Kemijska reakcija između $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikala i antioksidansa (AOX) u ABTS eseju. Zeleni okvir (lijevo) označuje boju $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikala prije reakcije s antioksidansom. Slika je preuzeta i prilagođena prema (21).

1.2.3.2. DPPH esej

DPPH esej je jedan od komercijalnih antioksidativnih esej te brz i jednostavan za izvođenje, što pridonosi ekstenzivnoj uporabi esej (13). Esej se najčešće upotrebljava za određivanje antiradikalne ili antioksidativne aktivnosti pročišćenih fenolnih spojeva i prirodnih biljnih ekstrakata te hrane poput voća i povrća (20). DPPH• radikal je stabilan dušikov radikal ljubičaste boje koji ima maksimalnu UV-Vis apsorbanciju pri 517 nm. Miješanjem otopine DPPH• radikala sa spojem koji može donirati atom vodika, DPPH• radikal se reducira pri čemu dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu (Slika 2.). DPPH• radikal se najčešće priprema u metanolu ili etanolu. Kao i u ABTS eseju, početna apsorbancija DPPH• radikala pri 517 nm se očitava spektrofotometrom, dodaju se testni antioksidansi, mješavina se inkubira kroz željeno vrijeme reakcije te se na kraju konačna apsorbancija uzoraka očitava (13).

otkrivena. Tome govori u prilog da je američki Nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*) pretkliničkim citotoksičnim probirom utvrdio da oko 1% morskih prirodnih spojeva ima protutumorski potencijal usporedno s 0,01% testiranih spojeva izoliranih iz kopnenih vrsta (2).

Jedna od bioloških pojava koja igra važnu ulogu u patofiziologiji raka je oksidativni stres. Tumorske stanice imaju veću koncentraciju ROS-a u usporedbi sa zdravim stanicama koji pokazuju dvojak u ulogu u tumorskom okolišu (12). Naime, pri niskim ili umjerenim koncentracijama, ROS promovira karcinogenezu, angiogenezu, preživljavanje i proliferaciju tumorskih stanica te metastaziranje dok pri visokim koncentracijama te iste procese inhibiraju. Jedan od načina borbe protiv raka je razvoj kemoterapeutika s pro-oksidativnim djelovanjem, odnosno povećanjem proizvodnje pojedinih ROS-ova poput vodikovog peroksida ili potiskivanjem prirodnih antioksidativnih obrambenih mehanizama. Visoke koncentracije ROS-a mogu inducirati apoptozu u tumorskim stanicama ili učiniti te stanice osjetljivijima na postojeće terapije (24).

Do danas je odobreno devet protutumorskih lijekova morskog podrijetla, od čega njih pet u zadnje dvije godine (Tablica 1.) (25–28). Prvi protutumorski lijek morskog podrijetla je bio Citarabin, zaštićenog imena Cytosar-U®, odobren 1969. godine od strane američke Agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA). Sam prolijek je sintetski analog spoja spongotimidina izoliranog iz karipske spužve *Tectitethya crypta* koji spada u klasu pirimidinskih nukleozida (29). Koristi se za liječenje raznih oblika leukemije: akutne i kronične mijeloidne, akutne limfocitne i ne-Hodgkin-ovog limfoma (30). Citarabin inhibira DNA polimerazu što posljedično uzrokuje inhibiciju sinteze DNA. Jedan od rijetkih lijekova koji nije strukturni analog već nepromijenjeni prirodni spoj je Trabektedin (ekteinascidin 743, Yondelis®); tetrahidroizokinolinski alkaloid izoliran iz plaštenjaka, *Ecteinascidia turbinata*. Europska agencija za lijekove (eng. *European Medicines Agency*, EMA) je 2007. godine odobrila Trabektedin za tretman sarkoma mekog tkiva i raka jajnika (29). Ekteinascidin 743, osim što

inhibira transkripcijske faktore koji se vežu na DNA tijekom transkripcije, djeluje i na mikrookoliš tumora regulacijom sinteze angiogenih faktora i citokina (30). Eribulin mesilat (Halaven®) je odobren 2010. godine od strane FDA za liječenje metastatskog raka dojke i naprednog liposarkoma. Halaven®, sintetski, strukturno pojednostavljeni analog makrolida halikondrina B, izoliranog iz japanske spužve *Halichondria okadai*, inhibira polimerizaciju mikrotubula tijekom mitoze tumorskih stanica što dovodi do njihove apoptoze. Brentuksimab vedotin (Adcetris®) (FDA, 2011), Polatuzumab vedotin (Polivy®) (FDA, 2019) te Enfortumab vedotin (Padcev®) (FDA, 2020) su konjugati lijeka i protutijela koji ciljano napadaju tumorske stanice (7,25). Sva tri konjugata koriste isti lijek, monometil auristatin E (eng. *monomethyl auristatin E*, MMAE) (vedotin) dok se razlikuju po monoklonalnom protutijelu (Brentuksimab, Polatuzumab i Enfortumab). MMAE je sintetski analog dolastatina 10, linearnog pentapeptida izoliranog iz mekušca *Dolabella auricularia*, koji pokazuje izrazito visoku toksičnost prilikom samostalne uporabe; zato se veže na protutijelo kako bi se poboljšala njegova učinkovitost i selektivnost (9). Općenito, konjugat lijeka i protutijela se veže na antigen na površini stanice karakterističan za pojedini tumor. Nakon internalizacije kompleksa konjugata i ciljanog antigena (najčešće endocitozom), unutar stanice se proteolitičkim cijepanjem oslobađa antimitotički spoj MMAE iz kompleksa. Posljedično, dolazi do inhibicije polimerizacije mikrotubula te u konačnici staničnog ciklusa što uzrokuje apoptozu tumorskih stanica (29). Svaki konjugat lijeka i protutijela ima različitu primjenu; Brentuksimab vedotin se upotrebljava za tretman CD30+ Hodgkin-ovog limfoma i sistemskog anaplastičnog velikostaničnog limfoma, Polatuzumab vedotin za tretman CD79b+ difuznog B-velikostaničnog limfoma i Enfortumab vedotin za tretman nektin-4+ karcinoma urotela (7,25). Belantamab mafodotin-blmf (Blenrep®) je također konjugat lijeka i protutijela, samo koristi drugi sintetski analog dolastatina 10, monometil auristatin F, koji djeluje na isti način kao i MMAE; inhibicijom polimerizacije mikrotubula. FDA je odobrila Blenrep® u kolovozu 2020. godine za tretman multiplog mijeloma koji

izražavaju limfocitni receptor CD38+ (28). Plitidepsin (Aplidin®) je sintetski analog dehidrodidemnina B, izoliranog iz mediteranskog plaštenjaka, *Aplidium albicans* (29). Australski Ured za terapijska dobra (eng. *Therapeutic Goods Administration*, TGA) je 2018. godine odobrio Aplidin® za liječenje multiplog mijeloma dok je EMA odbila dati odobrenje iste godine. Plitidepsin inducira apoptozu blokiranjem elongacijskog faktora 1A-2 čija je funkcija razgradnja pogrešno smotanih proteina koji se potom akumuliraju te uzrokuju toksičnost u stanicama mijeloma (27). Lurbinektedin (Zepzelca®), tetrahydro β-karbolinski alkaloid izoliran iz iste vrste plaštenjaka kao trabektedin (*E. turbinata*) je odobren 2019. godine od strane FDA za tretman metastatskog raka pluća malih stanica. Lurbinektedin inhibira transkripciju DNA što dovodi do apoptoze tumorskih stanica te normalizacije tumorskog mikrookoliša regulacijom ekspresije medijatora upale, tako smanjujući stvaranje upalnih citokina te faktora angiogeneze (26). Trenutačno je 11 strukturnih analoga morskog podrijetla ili prirodnih morskih spojeva u različitim fazama kliničkog istraživanja (7).

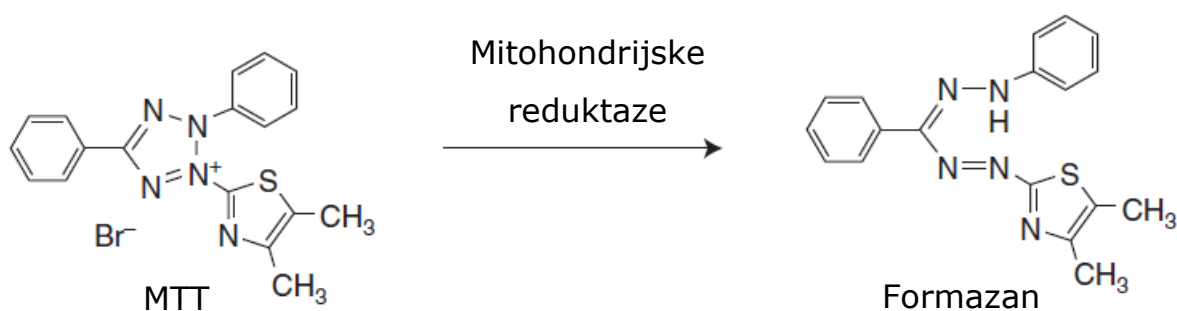
Tablica 1. Lista odobrenih protutumorskih lijekova morskog podrijetla. Preuzeto i prilagođeno prema (9).

Generičko ime (zaštićeno ime)	Spoj (morski organizam)	Kemijska klasa spoja	Terapijska indikacija	Mehanizam djelovanja	Agencija (godina odobrenja)
Citarabin (Cytosar-U®)	Spongotimidin (spužva <i>Tectitethya crypta</i>)	Nukleozid	Akutna i kronična mijeloidna leukemija, akutna limfocitna leukemija i ne-Hodgkin-ov limfom	Inhibicija sinteze DNA	FDA (1969)

Trabektedin (Yondelis®)	Ekteinascidin 743 (plaštenjak <i>Ecteinascidia turbinata</i>)	Alkaloid	Sarkom mekog tkiva i rak jajnika	Inhibicija transkripcije i djelovanje na mikrookoliš tumora	EMA (2007)
Eribulin mesilat (Halaven®)	Halikondrin B (spužva <i>Halichondria okadae</i>)	Makrolid	Metastatski rak dojke i napredni liposarkom	Inhibicija polimerizacije mikrotubula	FDA (2010)
Brentuksimab vedotin (Adcetris®)	Monometil auristatin E (mekušac <i>Dolabella auricularia</i>)	Konjugat peptida i protutijela	CD30+ Hodgkin-ov limfom i sistemički anaplastični velikostanični limfom	Inhibicija polimerizacije mikrotubula	FDA (2011)
Plitidepsin (Aplidin®)	Dehidrodidemnin B (plaštenjak <i>Aplidium albicans</i>)	Peptid	Multipli mijelom	Inhibicija elongacijskog faktora 1A-2	TGA (2018)
Polatuzumab vedotin (Polivy®)	Monometil auristatin E (mekušac <i>Dolabella auricularia</i>)	Konjugat peptida i protutijela	CD79b+ difuzni B- velikostanični limfom	Inhibicija polimerizacije mikrotubula	FDA (2019)
Enfortumab vedotin (Padcev®)	Monometil auristatin E (mekušac <i>Dolabella auricularia</i>)	Konjugat peptida i protutijela	Nektin-4+ karcinom urotela	Inhibicija polimerizacije mikrotubula	FDA (2019)
Lurbinektedin (Zepzelca®)	Lurbinektedin (plaštenjak <i>Ecteinascidia turbinata</i>)	Alkaloid	Metastatski rak pluća malih stanica	Inhibicija transkripcije i djelovanje na mikrookoliš tumora	FDA (2020)
Belantamab mafodotin- blmf (Blenrep®)	Monometil auristatin F (mekušac <i>Dolabella auricularia</i>)	Konjugat peptida i protutijela	CD38+ multipli mijelom	Inhibicija polimerizacije mikrotubula	FDA (2020)

1.3.1. Ispitivanje protutumorske aktivnosti pomoću MTT eseja

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) je kolorimetrijski esej koji mjeri metaboličku aktivnost stanica pretvorbom supstrata u kromogeni produkt (31). MTT esej je uobičajena metoda za procjenjivanje stanične vijabilnosti, proliferacije i citotoksičnosti koja služi za probir bioaktivnih spojeva s potencijalnom protutumorskom aktivnošću (32). Većina vijabilnih stanica ima konstantnu mitohondrijsku aktivnost, stoga povećanje ili smanjenje broja vijabilnih stanica je linearno povezano s mitohondrijskom aktivnošću (33). Esej procjenjuje mitohondrijsku aktivnost stanica redukcijom žute tetrazolijske soli u ljubičaste kristale formazana djelovanjem mitohondrijskih reduktaza, ponajviše oksidoreduktaza ovisnih o NAD(P)H-u (Slika 3.). Netopljivi kristali formazana se potom najčešće otope u dimetil sulfoksidu (32). Koncentracija ljubičaste otopine formazana se određuje mjerenjem apsorbancije pri 540 nm pomoću spektrofotometra s čitačem mikrotitarskih pločica (33). Intezitet ljubičaste boje je proporcionalan broju vijabilnih stanica. Jači intezitet ljubičaste boje ukazuje na veći broj vijabilnih, odnosno metabolički aktivnih stanica dok slabiji intezitet obojenja ukazuje na manji broj stanica, odnosno na antiproliferaciju i/ili citotoksičnost testiranih spojeva. Drugim riječima, kvantifikacija formazana je linearno povezana s enzimskom aktivnošću. Zdrave stanice pokazuju visoku stopu redukcije MTT boje u formazan u odnosu na mrtve ili metabolički neaktivne (32). Prednost MTT eseja je brza i osjetljiva kvantifikacija veće količine uzoraka (31).



Slika 3. Redukcija žutog MTT-a u ljubičasti formazan. Slika je preuzeta i prilagođena prema (31).

1.4. Plaštenjaci

Morski beskralješnjaci koji su pokazali najveći potencijal za istraživanje i razvoj novih lijekova su spužve, mahovnjaci i plaštenjaci. Plaštenjaci (eng. *ascidians*, kolokvijalno *sea squirts*) su većinski sjedilački morski beskralješnjaci koji obitavaju u priobalnom području pričvršćeni za stijene ili brodski trup u lukama i marinama te vezani za morske organizme poput algi, školjaka, koralja (34). Spadaju u primitivne svitkovce (*Chordata*) koji su dobili naziv po svitku, elastičnoj strukturi koja osigurava potporu tijela (35). Dijelevaju se na mješćice (*Ascidacea*), repnjake (*Appendicularia*) i dvootvorke (*Thaliacea*) (34). Tijekom mobilnog razvoja larve, plaštenjaci liče punoglavcima te imaju skeletnu hrskavičnu potporu, notokordu, koja se reducira nakon metamorfoze kada se plaštenjak nastani za čvrstu podlogu. Plaštenjaci imaju strukturu nalik vreći kroz koju filtriraju morsku vodu bogatu planktonima kroz dva cjevasta otvora, usni otvor i nečisnicu u škrgno ždrijelo. Kroz škrgno ždrijelo se odvija izmjena plinova koje time obavlja funkcije probavnog i dišnog sustava. Tijelo plaštenjaka je obavijeno debelim ovojem ili plaštom koji izlučuje jednoslojni valjkasti epitel – tuniku. Tunika je građena od proteina i složenih ugljikohidrata, primarno od celuloze tunicin po kojoj je čitavo potkoljeno *Tunicata* dobilo ime. Neki plaštenjaci imaju krutu, tvrdu i debelu tuniku, dok je kod drugih tunika tanka, glatka i prozirna. Plaštenjaci mogu živjeti samostalno ili u kolonijama. U potonjem slučaju se vrste većinom razmnožavaju nespolno, pupanjem, dok su samostalni plaštenjaci dvospolci koji se spolno razmnožavaju (35). Do danas je poznato oko 3000 vrsta ovih sjedilačkih morskih organizama (34). Neki plaštenjaci iz porodice *Styelidae* i *Pyuridae* te vrste *Stolidobranchs* se uzgajaju za ljudsku konzumaciju zbog visokog sadržaja proteina i mikronutrijenata. Plaštenjaci *Microcosmus sulcatus*, *Styela plicata* i *Polycarpa pomaria* su dio prehrane na Mediteranu. Konzumacija morskog ananasa, *Halocynthia roretzi*, je popularna u Japanu dok se *Pyura chilensis* konzumira u Južnoj Americi (36). U Australiji, veći

plaštenjaci poput *Pyura praeputialis* služe kao mamac u ribolovu (34,37,38).

Dosad provedene studije su pokazale da spojevi i ekstrakti plaštenjaka imaju široki spektar bioloških djelovanja; od protutumorskih, antibakterijskih, antifungalnih, antioksidativnih, protuupalnih i protuvirusnih svojstava do spojeva koji imaju potencijalno djelovanje protiv malarije i dijabetesa (2). Spojevi s najvećim biološkim potencijalom spadaju u klase sekundarnih metabolita alkaloida, terpenoida, poliketida, polisaharida, kinona, peptida te steroida (2,34). Najveći broj morskih prirodnih spojeva s potencijalnom biološkom aktivnošću je izolirano iz porodice plaštenjaka *Didemnidae* (32%), *Polyclinidae* (22%), *Styelidae* i *Polycitoridae* (11–12%), od kojih je većina pokazala protutumorski učinak. Više od 80% metabolita plaštenjaka sadrži dušik, od čega su skoro 70% alkaloidi. S druge strane, metaboliti plaštenjaka koji ne sadrže dušik su od manje biološke značajnosti (2). Sam plaštenjak ne mora proizvoditi bioaktivne sekundarne metabolite s obzirom da iste mogu sintetizirati simbiotski mikroorganizmi. Do danas je poznato oko 80 sekundarnih metabolita plaštenjaka koji su produkt simbiotskih bakterija poput cijanobakterija te aktinobakterija iz porodica *Streptomyces* i *Micromonospora* (34).

Mješčićnice (*Ascidacea*) su najveći i najpoznatiji razred potkoljena *Tunicata* (39). *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815) je bijela mješčićnica karakteristična po djelomičnoj prozirnoj debeloj tunici u obliku stošca s nepravilnim kvrgama na površini (Slika 4.). Nalazi se u pelagičkoj zoni (dubina do 200 m) pričvršćena na stjenovite, pješčane ili blatnjave površine u sjeveroistočnom Atlantskom oceanu te Sredozemnom i Sjevernom moru. Plaštenjak je samostalni dvospolac koji može narasti do 20 cm (40). Nekoliko porodica plaštenjaka su posebni po visokom sadržaju teških metala; bradavičasta mješčićnica nije iznimka. *P. mammillata* ima visoke razine prijelaznog metala vanadija u posebnim krvnim stanicama vanadocitama u kojima su zabilježene koncentracije do 19 mM, što je pola

milijuna puta više od koncentracije vanadija u okolnim morskim vodama (41). Razlog akumulacije vanadija trenutno nije poznat, no pretpostavlja se da ima obrambenu ulogu protiv predatora ili metaboličku ulogu u redoks reakcijama (34).



Slika 4. Plaštenjak *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815). Slika je preuzeta i prilagođena prema (42).

2. CILJ RADA

Svrha rada:

Priprema organskih ekstrakata plaštenjaka *Phallusia mammillata* iz Jadranskog mora te njihova kemijska i biološka evaluacija *in vitro*.

Glavni ciljevi rada:

1. Optimizacija ekstrakcije - odabir otapala s ciljem dobivanja krutog ekstrakta za biološka ispitivanja na temelju iskorištenja ekstrakcija s pojedinim otapalima različitih polarnosti
2. Kvalitativni kemijski probir krutih organskih ekstrakata *P. mammillata* kako bi se utvrdila prisutnost ili odsutnost različitih skupina metabolita
3. Ispitivanje antioksidativnog učinka krutih organskih ekstrakata *P. mammillata* pomoću ABTS i DPPH eseja
4. Ispitivanje antiproliferativnog i citotoksičnog učinka krutih organskih ekstrakata *P. mammillata* pomoću MTT eseja

Glavne hipoteze rada:

1. S obzirom da je kvalitativnim kemijskim probirom utvrđena prisutnost alkaloida, terpenoida, fenola i steroida kod organskih ekstrakata plaštenjaka *Phallusia nigra* (Savigny, 1816) i *Phallusia arabica* (Savigny, 1816), pretpostavljamo da će iste skupine spojeva biti detektirane u uzorcima *P. mammillata*
2. S obzirom da su organski ekstrakti plaštenjaka *Phallusia nigra* pokazali antioksidativni učinak evaluiran pomoću DPPH eseja, pretpostavljamo da će uzorci *P. mammillata* imati inhibicijsko djelovanje prema DPPH• radikalu te potencijalno prema ABTS•⁺ radikalu
3. S obzirom da su organski ekstrakti plaštenjaka *Phallusia nigra* i *Phallusia arabica* pokazali antiproliferativan učinak primjenom MTT eseja, pretpostavljamo da će uzorci *P. mammillata* također demonstrirati antiproliferativan te potencijalno citotoksičan učinak na tumorskim staničnim linijama

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i reagensi

Diklormetan, petroleter, acetonitril, metanol i kalijev persulfat su nabavljeni od VWR Chemicals (SAD). Etanol je kupljen od KEFO (Slovenija). Bezvodni natrijev sulfat je nabavljen od Gram-Mola (Republika Hrvatska). ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol) je kupljen od ALFA AESAR-a (Njemačka). DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) su nabavljeni od Sigma-Aldrich-a (SAD). Trolox® je nabavljen od Acros Organics-a (Belgija). Acetanhidrid, octena kiselina, 96%-tna sumporna kiselina, željezov (III) klorid, kalijev jodid i živin (II) klorid su kupljeni od Kemike (Republika Hrvatska). Kloroform je nabavljen od Honeywell-a (Njemačka).

3.2. Probir plaštenjaka *P. mammillata*

Otprilike jedan i pol kilogram neosušenog plaštenjaka, *P. mammillata* je uzorkovano u Šepurinama kraj Zadra, 23. svibnja 2019. godine, na dubini od pet do 10 metara. Salinitet Jadranskog mora je bio 38, a temperatura mora te zraka 15 °C i 17 °C, redom. Uzorci *P. mammillata* su pohranjeni u hladnjak na temperaturi od –80 °C.

3.3. Optimizacija ekstrakcije plaštenjaka *P. mammillata*

Uzorci *P. mammillata* su odmrznuti prije upotrebe te potom usitnjeni. Kako bi odredili koje otapalo ima najveće iskorištenje ekstrakcije, oko 40 g usitnjenog uzorka plaštenjaka je ekstrahirano pomoću pet otapala različitih polarnosti: petroletera, diklormetana, metanola, etanola i acetonitrila. Ekstrakcije su provedene po četiri sata koristeći magnetsku miješalicu na sobnoj temperaturi. Omjer mase uzoraka *P. mammillata* i otapala za ekstrakciju je bio 1:10. Nakon provedene ekstrakcije, uzorci su filtrirani pod sniženim tlakom kako bi se uklonio talog. Potom je dodan bezvodni natrijev sulfat za sušenje tijekom 15 minuta kako bi se uklonila voda te su uzorci ponovno profiltrirani. Filtrati tamnožute boje su se koncentrirali pod vakuumom pomoću rotacijskog uparivača kako bi se uklonilo organsko

otapalo i dobio kruti ekstrakt. Temperatura vodene kupelji kod svih uparivanja je iznosila 40 °C s ciljem izbjegavanja degradacije bioloških komponenti. Kruti ekstrakti su stavljeni na liofilizator kako bi se uklonila voda zaostala nakon uparivanja. Dobiveni ekstrakti su pospremljeni u prethodno izvagane vijalice pomoću diklormetana te pohranjeni u hladnjak na –20 °C do daljnjih analiza. Dobiveni uzorci su ekstrakti petroletera (PE), diklormetana (DCM), etanola (EtOH), metanola (MeOH) i acetonitrila (ACN). DCM i PE ekstrakti su bili uljasti i tamnosmeđe boje, a EtOH, MeOH i ACN ekstrakti kruti te svijetlosmeđe boje. Iskorištenje ekstrakcije je izračunato prema formuli:

$$\text{Iskorištenje ekstrakcije} = \frac{m(\text{dobiveni ekstrakt})}{m(\text{početni uzorak})} \times 100\%$$

3.4. Kvalitativni kemijski probir ekstrakata *P. mammillata*

Prisutnost skupina pojedinih metabolita u organskim ekstraktima *P. mammillata* je evaluirana specifičnim kolorimetrijskim testovima: fenoli (Folin–Ciocalteu-ov test), terpenoidi (Salkowski-jev test), alkaloidi (Mayer-ov test), glikozidi (Keller–Killiani-jev test), steroidi (Liebermann–Burchard-ov test) te saponini (test pjenjenja). Svi uzorci su otopljeni u metanolu pri koncentraciji od 2 mg/mL.

3.4.1. Test za detekciju fenola (Folin–Ciocalteu-ov test):

100 µL uzorka je pomiješano s 2 mL 2%-tnog natrijevog karbonata i ostavljeno nekoliko minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodano 100 µL 50%-tnog Folin–Ciocalteu-ovog reagensa. Smjesa je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku i promatrana do pojave plave boje koja potvrđuje prisutnost fenola.

3.4.2. Test za detekciju terpenoida (Salkowski-jev test):

2 mL uzorka je pomiješano s 2 mL kloroforma u epruveti. Potom je dodana kap po kap 400 µL koncentrirane 96%-tne sumporne kiseline radi stvaranja dvaju slojeva, oprezno uz stijenku epruvete. Nastajanje crveno-smeđeg obojenja na međupovršini potvrđuje prisutnost terpenoida.

3.4.3. Test za detekciju alkaloida (Mayer-ov test):

2 mL uzorka je pomiješano s 2 mL Mayer-ovog reagensa koji je pripremljen otapanjem 1,36 g živinog (II) klorida i 5 g kalijevog jodida u 100 mL deionizirane vode. Stvaranje obojenog kremastog precipitata potvrđuje prisutnost alkaloida.

3.4.4. Test za detekciju glikozida (Keller–Killiani-jev test):

2 mL uzorka je tretirano s 2 mL ledene octene kiseline, koja je sadržavala dvije kapi 5%-tnog željezovog (III) klorida. Dodana je kap po kap 400 µL koncentrirane 96%-tne sumporne kiseline. Nastajanje crveno-smeđeg prstena na međupovršini potvrđuje prisutnost glikozida s ljubičastim prstenom, koji se može pojaviti ispod crveno-smeđeg prstena.

3.4.5. Test za detekciju steroida (Liebermann–Burchard-ov test):

2 mL acetanhidrida i 1 mL kloroforma je pomiješano s 1 mL uzorka. Nekoliko kapi koncentrirane 96%-tne sumporne kiseline je potom dodano u testnu epruvetu niz stijenku kako bi se spriječila burna reakcija. Promjena boje iz ljubičaste u plavu ili zelenu potvrđuje prisutnost steroida.

3.4.6. Test za detekciju saponina (test pjenjenja):

2 mL uzorka je razrijeđeno s 2 mL deioniziranom vodom te snažno protreseno nekoliko minuta. Stvaranje stabilne pjene na vrhu smjese potvrđuje prisutnost saponina.

3.5. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

3.5.1. ABTS esej

In vitro antioksidativna aktivnost četiri organska ekstrakta *P. mamillata* (PE, EtOH, MeOH, ACN) je ispitana inhibicijom ABTS^{•+} radikala. ABTS^{•+} radikal je pripremljen miješanjem istog volumena 7 mM ABTS otopine i 2,4 mM otopine kalijevog persulfata koji je inkubiran preko noći na sobnoj temperaturi u mraku. Ta otopina je potom razrijeđena metanolom kako bi se dobila otopina apsorbancije od 0,7 pri 734 nm. 100 µL organskih

ekstrakata *P. mamillata* pripremljenih u metanolu (konačan raspon koncentracija: 1000–62,5 µg/mL) su pomiješani sa 100 µL otopine ABTS^{•+} radikala. Apsorbancija je mjerena pri 734 nm nakon 5, 10, 15 i 30 minuta inkubacije u mraku pomoću čitača mikropločica (Tecan). ABTS antiradikalna aktivnost je izračunata prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_{kontrola} - A_{uzorak}}{A_{uzorak}} \times 100,$$

gdje je $A_{kontrola}$ vrijednost apsorbancije otopine ABTS^{•+} radikala i metanola, a A_{uzorak} vrijednost apsorbancije organskih ekstrakata *P. mamillata* i Trolox-a pomiješanih s otopinom ABTS^{•+} radikala.

Antioksidativna aktivnost uzoraka *P. mamillata* je uspoređena s Trolox-om (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) koji je pripremljen u istom koncentracijskom rasponu kao organski ekstrakti *P. mamillata*. Trolox je služio kao pozitivna kontrola. 100 µL metanola je korišteno kao negativna kontrola. Korištene su dvije promjenjive varijable u eseju: koncentracijski raspon i vrijeme inkubacije uzoraka (5, 10, 15 i 30 minuta). IC₅₀ vrijednost, koja označava koncentraciju 50%-tne inhibicije ABTS^{•+} radikala, je određena iz grafa koji prikazuje odnos postotka inhibicije i koncentracije uzoraka. Sva mjerenja su provedena u duplikatu u trima neovisnim pokusima.

3.5.2. DPPH esej

In vitro antioksidativna aktivnost četiri organska ekstrakta *P. mamillata* (PE, EtOH, MeOH, ACN) je ispitana inhibicijom DPPH[•] radikala. Kako bi se dobila otopina DPPH[•] radikala koncentracije 0,2 mM, 8 mL DPPH[•] radikala koncentracije 1 mM je otopljeno u 32 mL metanola. 100 µL organskih ekstrakata *P. mamillata* pripremljenih u metanolu su pomiješani sa 100 µL otopine DPPH[•] radikala. Konačne koncentracije uzoraka *P. mamillata* su bile 1000, 500, 250, 125 i 62,5 µg/mL. Apsorbancija je mjerena pri 517 nm nakon 5, 10, 15 i 30 minuta inkubacije u mraku pomoću čitača mikropločica (Tecan). DPPH antiradikalna aktivnost je izračunata prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_{kontrola} - A_{uzorak}}{A_{uzorak}} \times 100,$$

gdje je $A_{kontrola}$ vrijednost apsorbancije otopine DPPH• radikala otopljenog u metanolu, a A_{uzorak} vrijednost apsorbancije organskih ekstrakata *P. mamillata* i Trolox-a pomiješanih s otopinom DPPH• radikala.

Antiradikalna aktivnost uzoraka *P. mamillata* je uspoređena s pozitivnom kontrolom Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) pri istom koncentracijskom rasponu kao i organski ekstrakti *P. mamillata*. 100 µL metanola otopljenog u 100 µL otopine DPPH• radikala je bila negativna kontrola. Dvije su promjenjive varijable korištene u eseju: koncentracijski raspon i vrijeme inkubacije uzoraka (5, 10, 15 i 30 minuta). Sva mjerenja su provedena u kvadruplikatu u trima neovisnim pokusima.

3.6. Ispitivanje antiproliferativnog i citotoksičnog učinka

3.6.1. MTT esej

Ljudske tumorske stanične linije: karcinom debelog crijeva (HCT116), duktalni adenokarcinom gušterače (CFPAC-1), metastatski tumor dojke (MCF-7) i hepatocelularni karcinom jetre (HepG2) te netransformirani ljudski fibroblasti (HFF-1), nabavljeni od ATCC (American Type Culture Collection), su kultivirani u Dulbecco modificiranom Eagle mediju (DMEM) u vlažnoj atmosferi s 5%-tnim CO₂ na 37 °C. DMEM podloga je obogaćena s 10%-tnim fetalnim goveđim serumom (eng. *fetal bovine serum*), 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (Capricorn Scientific, Njemačka). Liofilizirani organski ekstrakti *P. mamillata* su prvo otopljeni u mediju za rast koji je sadržavao 10%-tni dimetil sulfoksid te potom otopljeni pomoću vorteksiranja i ultrazvučne kupelji, 30 minuta na 37 °C. Tumorske stanične linije i netransformirani ljudski fibroblasti su nasađeni na pločicu s 96 jažica pri gustoći od 3,000 ili 5,000 stanica po jažici, ovisno o brzini dijeljenja tumorskih i netransformiranih staničnih linija. Prije pokusa, ispitivani uzorci *P. mamillata* su razrijeđeni pet do 10 puta u mediju za rast u rasponu koncentracija od 10⁻⁴ do 1 mg/mL. Stanice su inkubirane ekstraktima tijekom 72 sata. Brzina staničnog rasta je

evaluirana pomoću MTT eseja sukladno uputama proizvođača. Postotak staničnog rasta je izračunat transformiranjem eksperimentalno određenih vrijednosti apsorbancija koristeći formule koje su predložili američki Nacionalni instituti za zdravlje (eng. *National Institutes of Health*). Koncentracije uzoraka *P. mammillata* potrebne za inhibiciju 50% staničnog rasta (IC_{50} vrijednosti) i smrt 50% stanica (LC_{50} vrijednosti) su izračunate iz krivulja odnosa doze i učinka pomoću linearno regresijskih analiza. Sva mjerenja su provedena u kvadruplikatu u trima neovisnim biološkim pokusima.

4. REZULTATI

4.1. Optimizacija ekstrakcije plaštenjaka *P. mamillata*

Najmanja iskorištenja ekstrakcija *P. mamillata* su bila za diklormetan (0,079%) i petroleter (0,298%). Od polarnih otapala, metanol i etanol su imali najveća iskorištenja: 4,045% i 5,845%, redom, dok je acetonitril pokazao slabije iskorištenje od alkoholnih ekstrakata (1,314%) (Tablica 2.). Obzirom na izuzetno slabo iskorištenje ekstrakcije pomoću diklormetana, uzorci ekstrahirani tim otapalom nisu podvrgnuti daljnjim kemijskim i biološkim ispitivanjima.

Tablica 2. Početna masa uzorka, masa dobivenog ekstrakta i iskorištenje ekstrakcije plaštenjaka *P. mamillata* za pojedina organska otapala različitih polarnosti. PE, DCM, EtOH, MeOH i ACN označavaju organske ekstrakte petroletera, diklormetana, etanola, metanola i acetonitrila, redom.

Otapalo	PE	DCM	EtOH	MeOH	ACN
Početna masa uzorka/ g	43,222	43,105	40,217	40,220	42,775
Masa dobivenog ekstrakta/ g	0,129	0,034	2,351	1,627	0,562
Iskorištenje ekstrakcije/ %	0,298	0,079	5,845	4,045	1,314

4.2. Kvalitativni kemijski probir ekstrakata *P. mamillata*

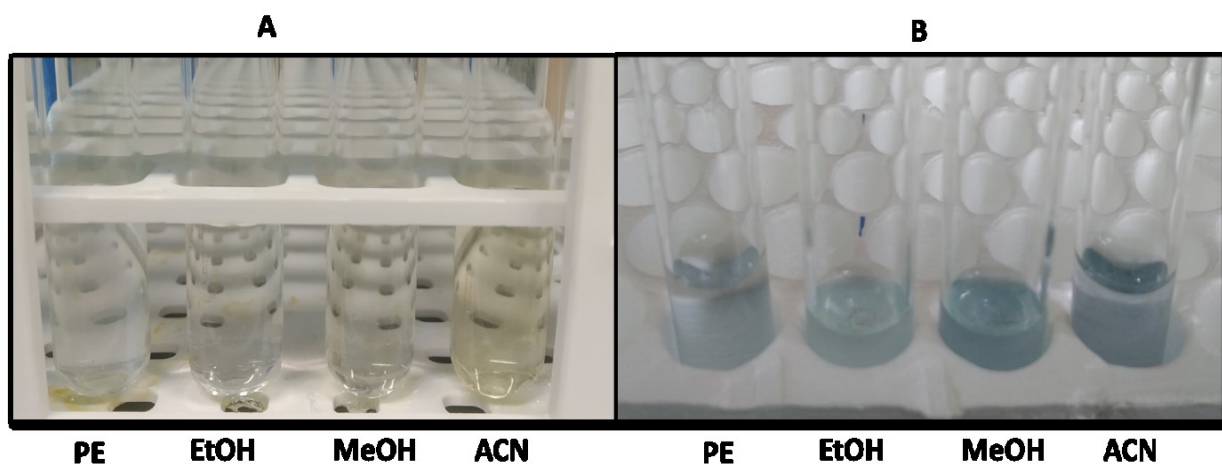
Pomoću fitokemijskog probira organskih ekstrakata *P. mamillata* detektirane su fenolne komponente i alkaloidi u svakom ispitanom uzorku (Tablica 3., Slike 5. i 7.). Nadalje, terpenoidi, glikozidi i steroidi su bili

snažno prisutni u PE ekstraktu te umjereno prisutni u ACN ekstraktu, dok su bili odsutni u ostalim uzorcima. S druge strane, prisutnost saponina je jedino uočena u ACN ekstraktu.

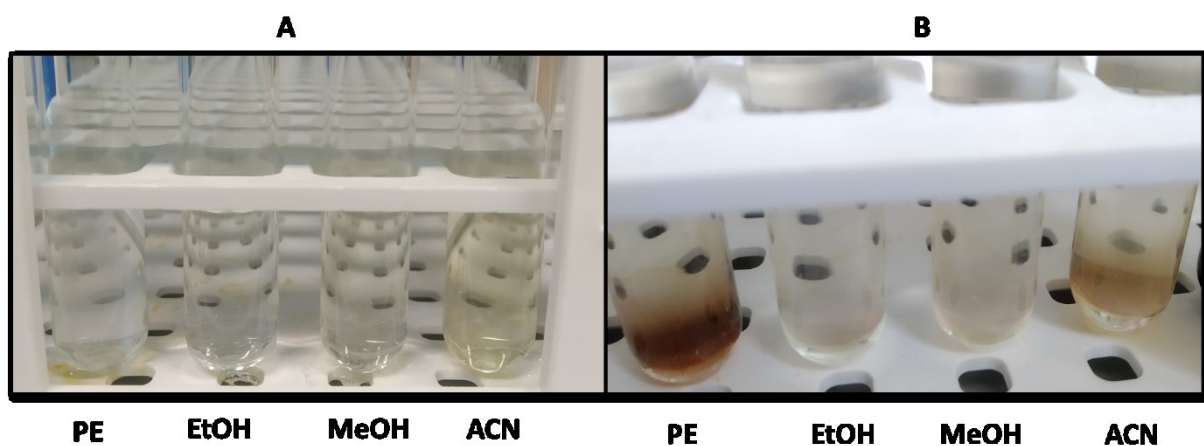
Tablica 3. Kvalitativni kemijski probir krutih organskih ekstrakata *P. mamillata*. PE, EtOH, MeOH i ACN označavaju organske ekstrakte petroletera, etanola, metanola i acetonitrila, redom.

UZORAK	FENOLI	TERPENOIDI	ALKALOIDI	GLIKOZIDI	STEROIDI	SAPONINI
PE	+	++	++	++	++	-
EtOH	+	-	+	-	-	-
MeOH	++	-	++	-	-	-
ACN	++	+	++	+	+	+

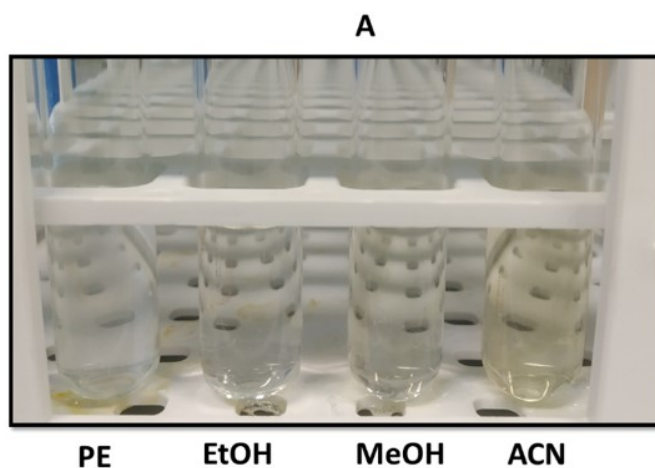
++ (snažna prisutnost), + (umjerena prisutnost), - (odsutnost)

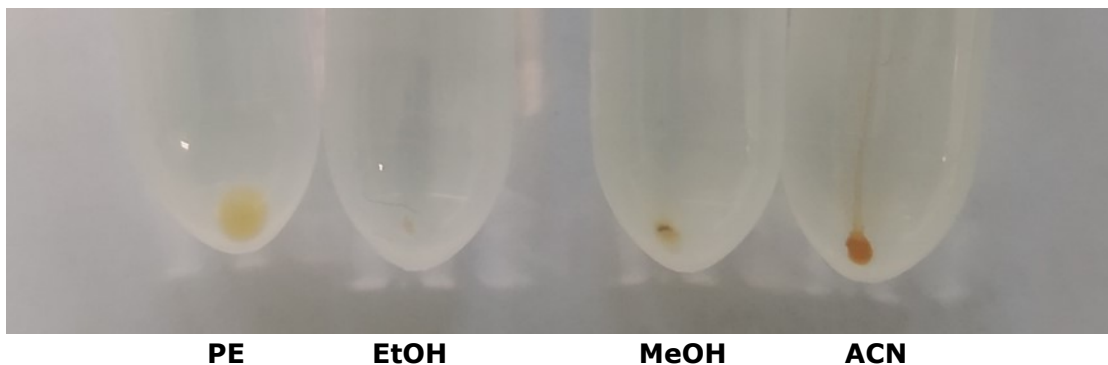


Slika 5. Kvalitativna kemijska karakterizacija uzoraka (PE, EtOH, MeOH i ACN ekstrakata) za detektiranje fenola primjenom Folin–Ciocalteu-ovog testa. Paneli **A)** i **B)** prikazuju uzorke prije i poslije provedbe fitokemijskog probira, redom.

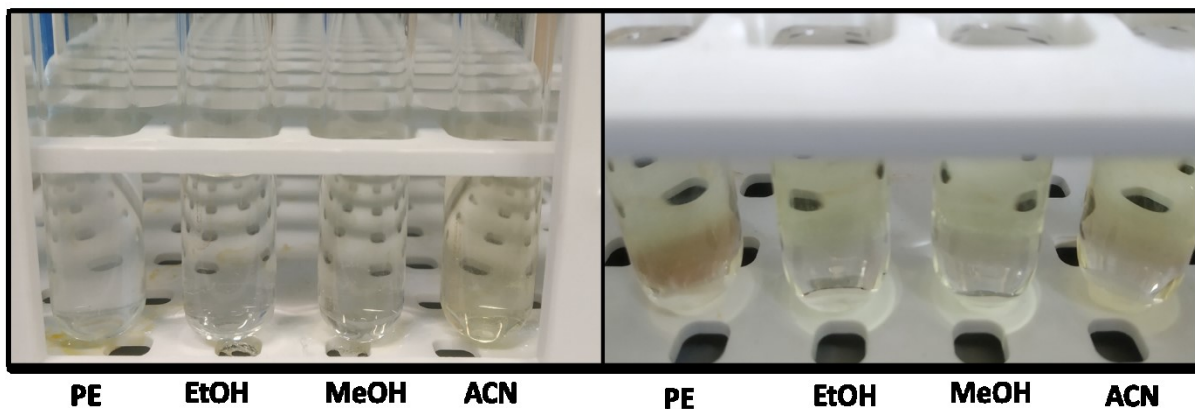


Slika 6. Kvalitativna kemijska karakterizacija uzoraka (PE, EtOH, MeOH i ACN ekstrakata) za detektiranje terpenoida primjenom Salkowski-jevog testa. Paneli **A)** i **B)** prikazuju uzorke prije i poslije provedbe fitokemijskog probira, redom.

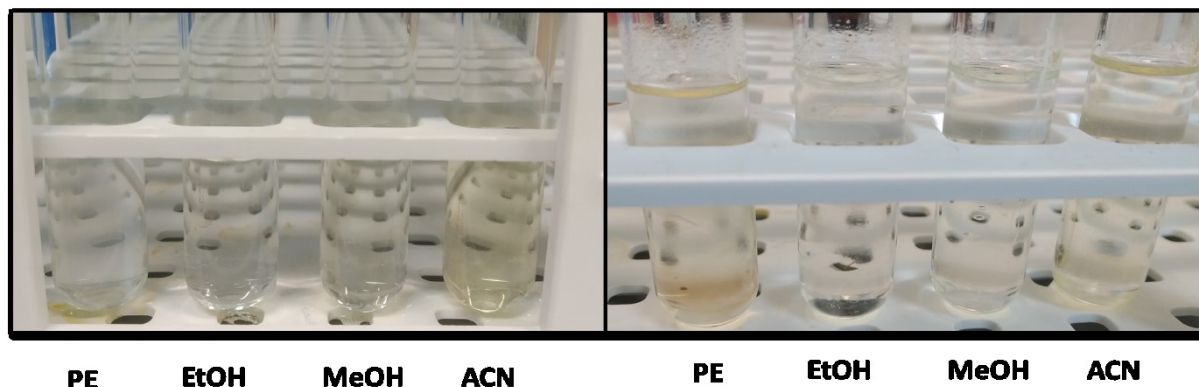


B**PE****EtOH****MeOH****ACN**

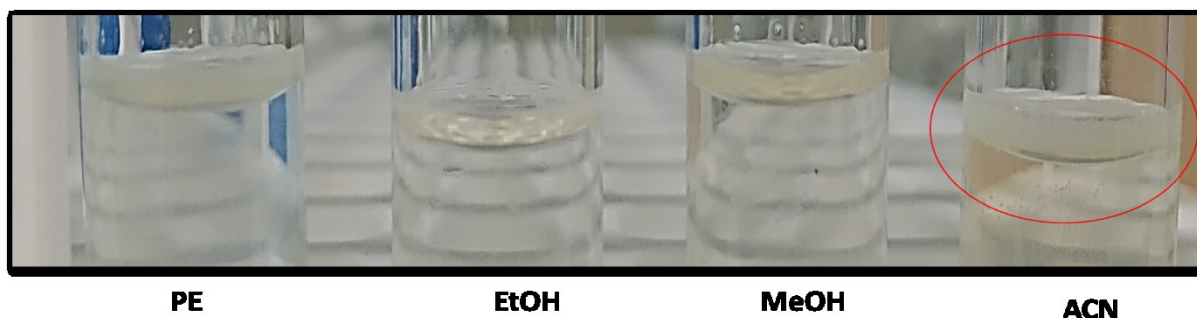
Slika 7. Kvalitativna kemijska karakterizacija uzoraka (PE, EtOH, MeOH i ACN ekstrakata) za detektiranje alkaloida primjenom Mayer-ovog testa. Paneli **A**) i **B**) prikazuju uzorke prije i poslije provedbe fitokemijskog probira, redom.

A**B****PE****EtOH****MeOH****ACN****PE****EtOH****MeOH****ACN**

Slika 8. Kvalitativna kemijska karakterizacija uzoraka (PE, EtOH, MeOH i ACN ekstrakata) za detektiranje glikozida primjenom Keller–Killiani-jevog testa. Paneli **A**) i **B**) prikazuju uzorke prije i poslije provedbe fitokemijskog probira, redom.

A**B****PE****EtOH****MeOH****ACN****PE****EtOH****MeOH****ACN**

Slika 9. Kvalitativna kemijska karakterizacija uzoraka (PE, EtOH, MeOH i ACN ekstrakata) za detektiranje steroida primjenom Liebermann–Burchard-ovog testa. Paneli **A**) i **B**) prikazuju uzorke prije i poslije provedbe fitokemijskog probira, redom.

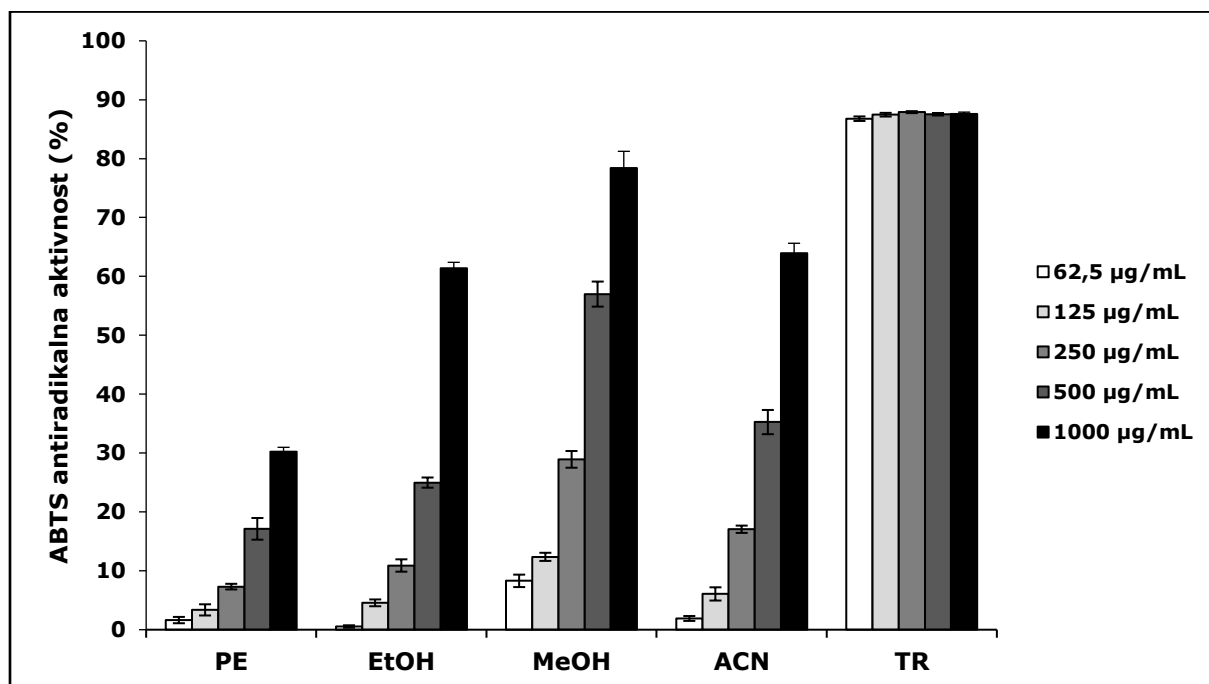


Slika 10. Kvalitativna kemijska karakterizacija uzoraka (PE, EtOH, MeOH i ACN ekstrakata) za detektiranje saponina primjenom testa pjenjenja. Crveni krug označava prisutnost stabilne pjene u zadnjem ekstraktu, ACN.

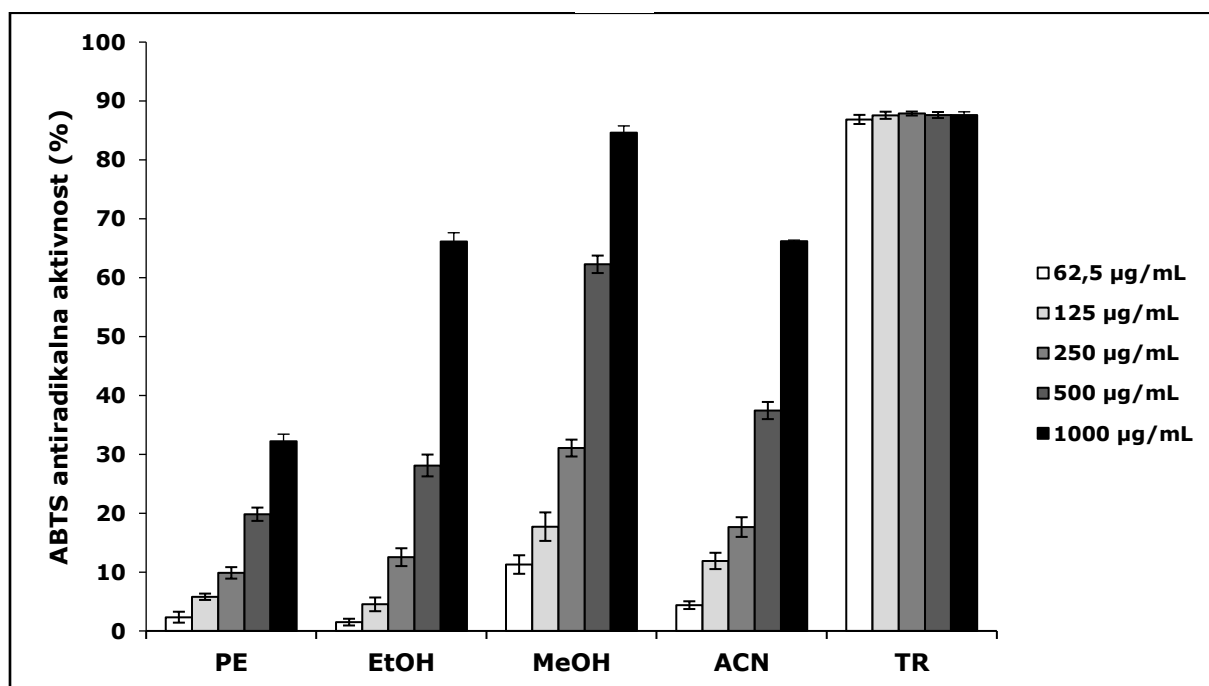
4.3. ABTS esej

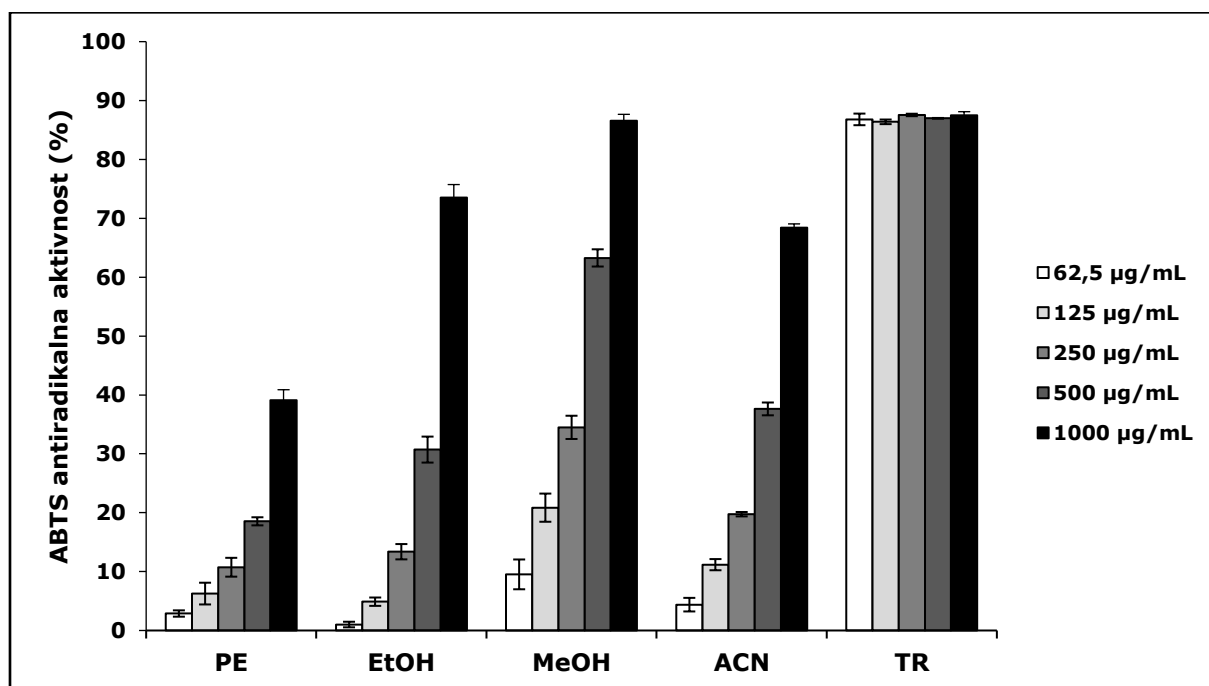
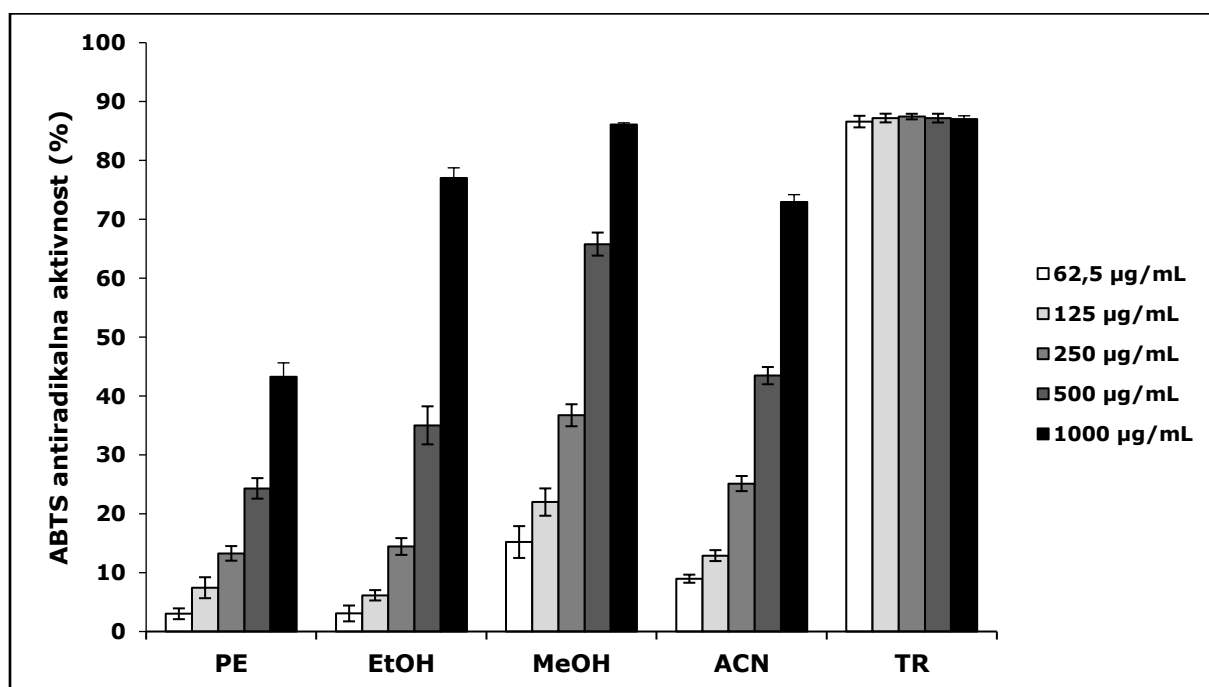
Rezultati inhibicije $ABTS^{\bullet+}$ radikala pokazuju koncentracijsku i vremensku ovisnost, što je bila veća koncentracija ekstrakata i duže vrijeme inkubacije, to je aktivnost bila veća (Slika 11.). MeOH ekstrakt je pokazao najveću ABTS antiradikalnu aktivnost pri svim koncentracijama nakon provedenih mjerenja u usporedbi s ostalim ekstraktima *P. mammillata*. ACN i EtOH ekstrakt su imali neznatno manju ABTS antiradikalnu aktivnost u odnosu na MeOH ekstrakt. Najslabija ABTS antiradikalna aktivnost primijećena je kod PE ekstrakta. Trolox je pokazao veću ABTS antiradikalnu aktivnost od svih ekstrakata *P. mammillata*.

A



B



C**D**

Slika 11. ABTS antiradikalna aktivnost organskih ekstrakata *P. mammillata* i Trolox-a (TR) u koncentracijskom rasponu 1000–62,5 µg/mL nakon inkubacije u mraku 5 minuta (panel **A**), 10 minuta (panel **B**), 15 minuta (panel **C**) i 30 minuta (panel **D**). PE, EtOH, MeOH i ACN označavaju organske ekstrakte petroletera, etanola, metanola i acetonitrila, redom.

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Sva mjerenja su provedena u duplikatu u trima neovisnim pokusima.

MeOH ekstrakt je imao najmanje IC₅₀ vrijednosti nakon svih četiri vremena inkubacije u usporedbi s ostalim ekstraktima *P. mammillata*. Međutim, alkoholni i ACN ekstrakti su imali velike IC₅₀ vrijednosti u odnosu na pozitivnu kontrolu Trolox koji je tijekom inkubacije imao IC₅₀ vrijednost manju od 62,5 µg/mL. IC₅₀ vrijednosti PE ekstrakta su bile iznad 1000 µg/mL tijekom svih mjerenja, odnosno PE ekstrakt nije postigao 50%-tnu inhibiciju ABTS^{•+} radikala tijekom inkubacije. Porastom vremena inkubacije uočeno je smanjenje IC₅₀ vrijednosti (Tablica 4.).

Tablica 4. IC₅₀ vrijednosti ABTS antiradikalne aktivnosti organskih ekstrakata *P. mammillata* i Trolox-a (TR) (pozitivna kontrola). PE, EtOH, MeOH i ACN označavaju organske ekstrakte petroletera, etanola, metanola i acetonitrila, redom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Sva mjerenja su provedena u duplikatu u trima neovisnim pokusima.

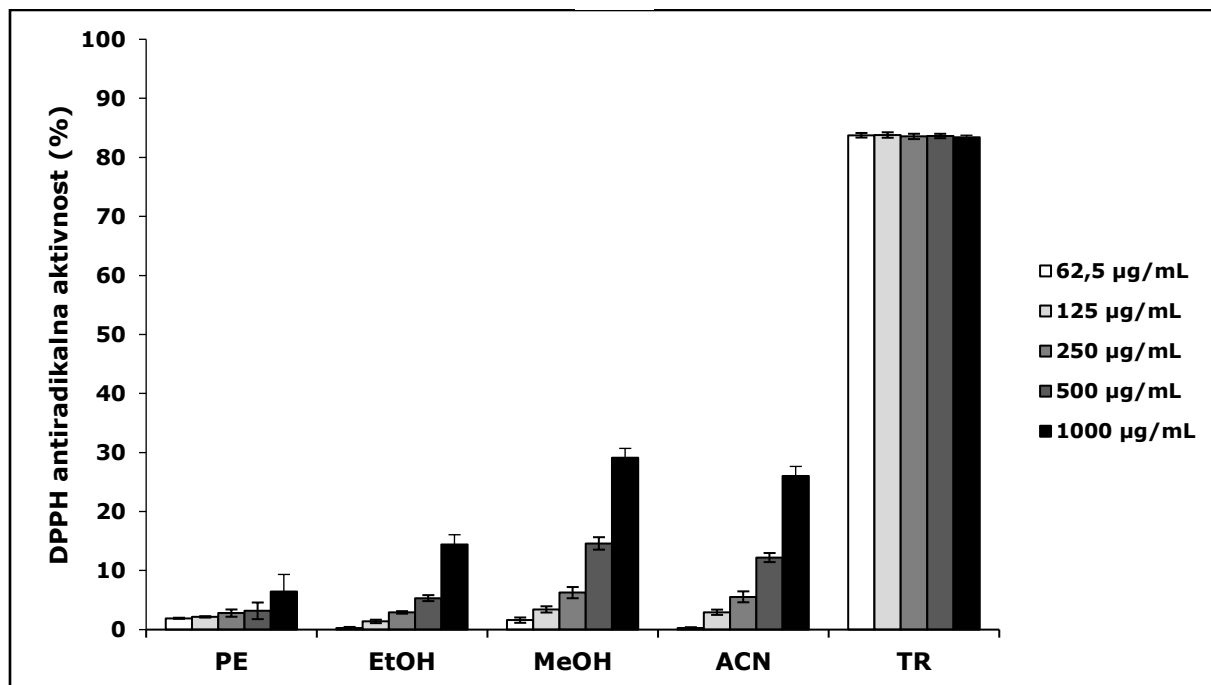
Uzorak	IC ₅₀ vrijednosti ABTS antiradikalne aktivnosti (µg/mL)			
	Vrijeme (minute)			
	5	10	15	30
PE	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
EtOH	843,99 ± 10,57	787,6 ± 27,90	725,06 ± 40,26	675,48 ± 51,17
MeOH	438,62 ± 30,38	401,92 ± 18,81	384,16 ± 21,71	363,95 ± 18,72
ACN	756,11 ± 53,35	716,98 ± 26,68	700,67 ± 25,95	604,43 ± 45,93
TR	< 62,5	< 62,5	< 62,5	< 62,5

4.4. DPPH esej

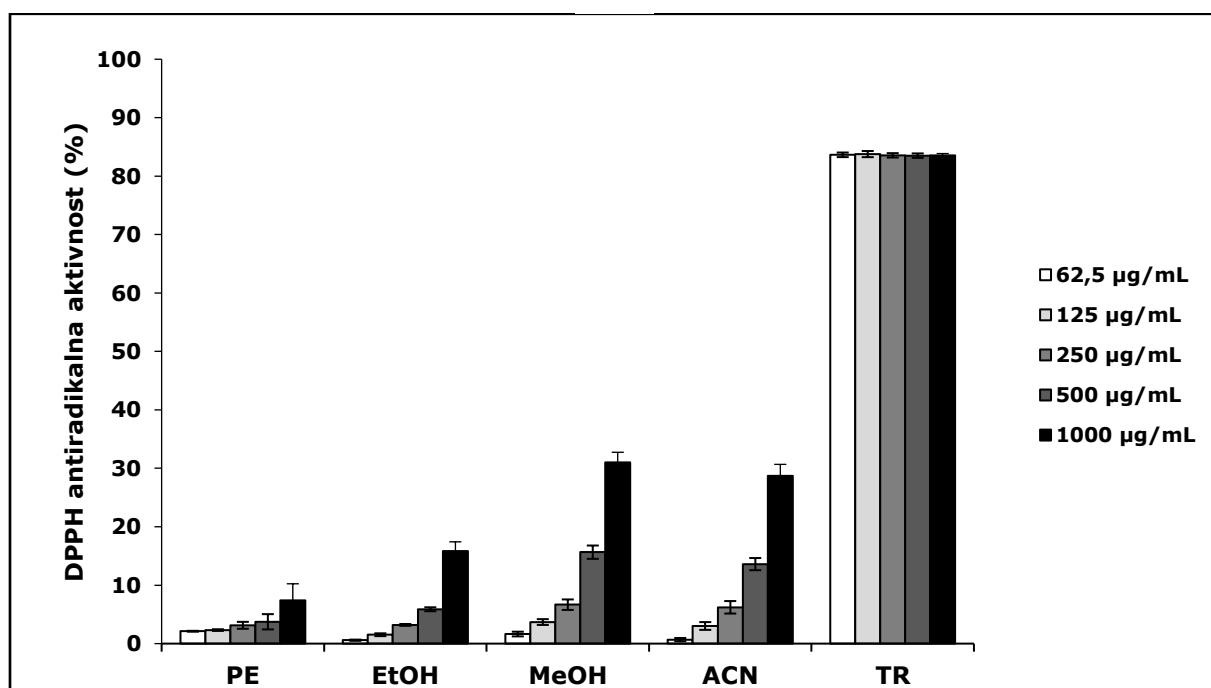
Od svih ekstrakata *P. mammillata*, najveću DPPH antiradikalnu aktivnost pri svim koncentracijama je pokazao MeOH ekstrakt. Potom su redom slijedili ACN te EtOH ekstrakt. PE ekstrakt je imao najnižu DPPH antiradikalnu aktivnost. Trolox, koji je bio pozitivna kontrola, je imao veću DPPH antiradikalnu aktivnost od svih ekstrakata *P. mammillata*. Niti jedan organski ekstrakt *P. mammillata* nije postigao IC₅₀. Porast DPPH

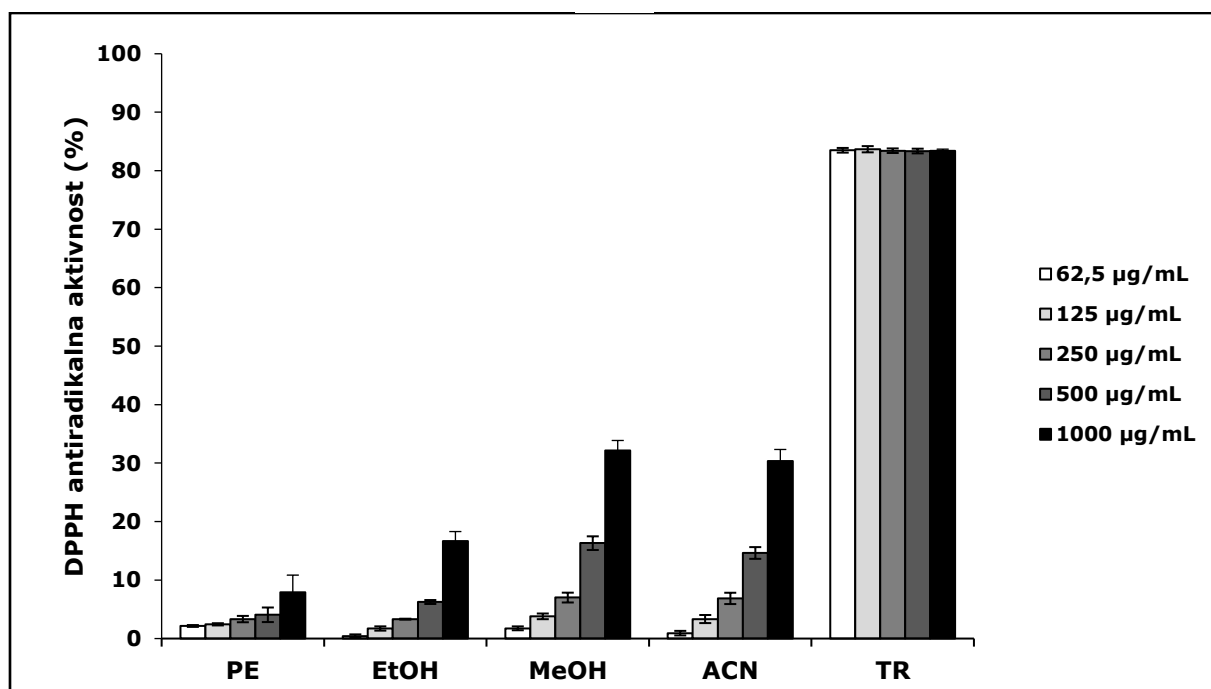
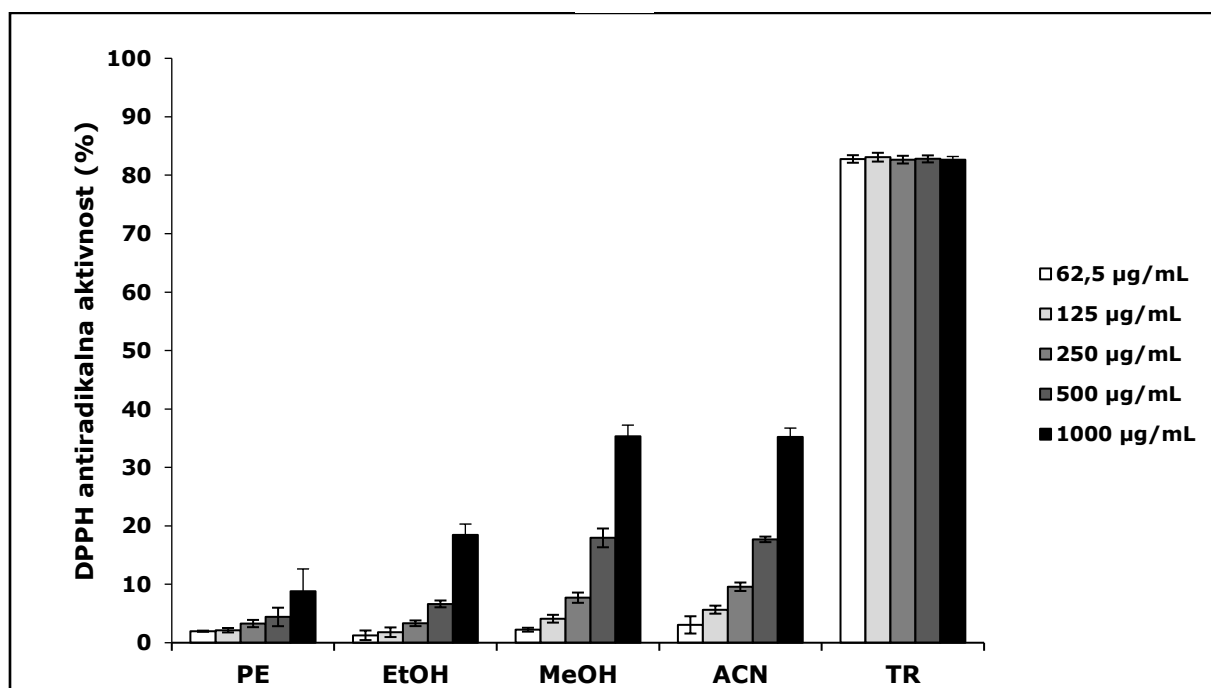
antiradikalne aktivnosti je proporcionalna s povećanjem koncentracije ekstrakata i porastom vremena inkubacije (Slika 12.).

A



B



C**D**

Slika 12. DPPH antiradikalna aktivnost organskih ekstrakata *P. mammillata* i Trolox-a (TR) pri koncentracijama 1000, 500, 250, 125 i 62,5 µg/mL nakon inkubacije u mraku 5 minuta (panel **A**), 10 minuta (panel **B**), 15 minuta (panel **C**) i 30 minuta (panel **D**). PE, EtOH, MeOH i ACN označavaju organske ekstrakte petroletera, etanola, metanola i acetonitrila, redom. Vrijednosti DPPH antiradikalne aktivnosti su prikazani kao aritmetička

sredina i standardna devijacija. Sva mjerenja su provedena u kvadruplikatu u trima neovisnim pokusima.

4.5. MTT esej

PE ekstrakt je pokazao značajan antiproliferativan učinak na svim tumorskim staničnim linijama te na netransformiranim ljudskim fibroblastima. Najveći postotak inhibicije rasta je imao na staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) ($0,96 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$) dok je za ostale tumorske stanične linije IC_{50} vrijednost prosječno bila manja od $4 \mu\text{g/mL}$. ACN ekstrakt je pokazao umjeren postotak inhibicije rasta na svim staničnim linijama, osobito na tumorskim staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) ($46,35 \pm 8,33 \mu\text{g/mL}$) i duktalnog adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1) ($50,80 \pm 7,38 \mu\text{g/mL}$). Alkoholni ekstrakti *P. mammillata* su imali najslabiji antiproliferativan učinak prema svim staničnim linijama (Tablica 5.).

Tablica 5. IC_{50} vrijednosti organskih ekstrakata *P. mammillata* dobivenih MTT esejom na ljudskim tumorskim staničnim linijama metastatskog tumora dojke (MCF-7), karcinoma debelog crijeva (HCT116), duktalnog adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1) i hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) te na netransformiranim ljudskim fibroblastima (HFF-1). PE, EtOH, MeOH i ACN označavaju organske ekstrakte petroletera, etanola, metanola i acetonitrila, redom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Sva mjerenja su provedena u kvadruplikatu u trima neovisnim biološkim pokusima.

Uzorak	IC ₅₀ (µg/mL)				
	MCF-7	HCT116	CFPAC-1	HepG2	HFF-1
PE	3,81 ± 0,36	3,43 ± 0,47	2,66 ± 1,04	0,96 ± 0,60	3,76 ± 2,29
EtOH	425,46 ± 6,44	523,58 ± 1,39	361,62 ± 0,38	231,83 ± 54,55	240,13 ± 78,56
MeOH	567,94 ± 147,13	701,28 ± 83,06	430,96 ± 97,09	806,81 ± 49,46	496, 77 ± 188,92
ACN	73,95 ± 40,37	83,15 ± 12,09	50,80 ± 7,38	46,35 ± 8,33	61,44 ± 10,76

Kod EtOH, MeOH i ACN ekstrakata, koji su imali LC₅₀ vrijednosti veće od 1000 µg/mL na tumorskim staničnim linijama kao i na netransformiranim ljudskim fibroblastima, nije opažen citotoksičan učinak. PE ekstrakt je imao najniže LC₅₀ vrijednosti od svih ekstrakata *P. mammillata*, odnosno pokazao je selektivan citotoksičan učinak na tumorskim staničnim linijama dukalnog adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1) (9,94 ± 12,13 µg/mL) i karcinoma debelog crijeva (HCT116) (33,80 ± 5,05 µg/mL) (Tablica 6.).

Tablica 6. LC₅₀ vrijednosti organskih ekstrakata *P. mammillata* dobivenih MTT esejom na ljudskim tumorskim staničnim linijama metastatskog tumora dojke (MCF-7), karcinoma debelog crijeva (HCT116), dukalnog adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1) i hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) te na netransformiranim ljudskim fibroblastima (HFF-1). PE, EtOH, MeOH i ACN označavaju organske ekstrakte petroletera, etanola, metanola i acetonitrila, redom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Sva mjerenja su provedena u kvadruplikatu u trima neovisnim biološkim pokusima.

Uzorak	LC ₅₀ (µg/mL)				
	MCF-7	HCT116	CFPAC-1	HepG2	HFF-1
PE	244,38 ± 139,40	33,80 ± 5,05	9,94 ± 12,13	138,08 ± 73,09	389,97 ± 112,78
EtOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
ACN	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

5. RASPRAVA

Prosječno jedan od 5,000 do 10,000 spojeva bude odobren za kliničku primjenu na ljudima nakon registracije i stavljanje na tržište (43). Dosad je izolirano više od 29,000 spojeva iz oceana i mora, a njih 9 od ukupno 13 odobrenih su poslužili kao strukturna osnova, karakteristični ponajviše po protutumorskom djelovanju (7). To znači da na jedan odobreni lijek morskog podrijetla dolazi 2231 testiranih spojeva što je puno bolji postotak uspjeha odobrenja bioaktivnog spoja za kliničku primjenu u odnosu na gore navedeni opći prosjek. Lijekovi podrijetlom iz oceana i mora nisu primarna obrana protiv bolesti i poremećaja, pogotovo u kemoterapiji gdje se koriste tek kao druga ili treća, ponekad tek četvrta linija liječenja, najčešće za tretman metastatskih i recidiviranih tumora (7). Značajan problem razvoja morskih lijekova predstavljaju izrazito niska iskorištenja ekstrakcija bioaktivnih metabolita te oskudne populacije organizama iz kojih bioaktivni metaboliti bivaju izolirani. Dodatno, uz ekološke probleme i ograničenja morskih organizama, javljaju se nedostatne količine molekula koje bi predstavljale potencijalne kandidate za pretklinička i klinička ispitivanja te posljedično za komercijalnu proizvodnju. Održiva komercijalna proizvodnja potencijalnih lijekova se može postići primjenom višestrukih strategija: kemijskom sintezom (totalnom ili polusintezom), akvakulturom organizama koji sadržavaju željene metabolite/spojeve, staničnim kulturama, identifikacijom biosintetskog puta proizvodnje željenih metabolita/spojeva ili hibridnim strategijama. Primjerice, za dobivanje 310 mg čistog halikondrina B, makrolida čija je struktura bila osnova lijeka Eribulin mesilata (Halaven®), moralo se skupiti više od jedne tone srodne vrste spužve *Lissodendoryx*. Eribulin mesilat se danas komercijalno proizvodi totalnom kemijskom sintezom koja ima iskorištenje reakcije 0,16%. Trabektedin (Yondelis®), koji se dobivao izolacijom iz plaštenjaka *E. turbinata* u vrlo niskom prinosu (0,0001%), danas se proizvodi polusintezom čiji je početni spoj antibiotik cijanosafracin B, koji se pak dobiva fermentacijom bakterije *Pseudomonas fluorescens* (43).

Antioksidativna, antiproliferativna i citotoksična ispitivanja su provedena na krutim organskim ekstraktima *P. mammillata* kako bi se procijenila biološka aktivnost za potrebe daljnjih analiza. Važno je napomenuti da su provedena biološka ispitivanja preliminarna tako da rezultati pokusa sugeriraju daljnji tijek eksperimenata obzirom da su *in vitro* testiranja prikladnija za čiste spojeve, odnosno male molekule. Uzimajući u obzir prisutnost različitih komponenti u svakom pojedinom ekstraktu te razlike u polarnosti i topljivosti, pretpostavka je da se svi spojevi nisu dovoljno otopili u zadanom koncentracijskom rasponu čime bi njihova biološka aktivnost mogla biti i veća. Optimizacijom ekstrakcije je utvrđeno da je petroleter najprikladnije nepolaro otapalo, a etanol najprikladnije polarno otapalo za daljnju ekstrakciju plaštenjaka *P. mammillata* na temelju izračunatih iskorištenja ekstrakcija.

Preliminarnim fitokemijskim kvalitativnim probirom PE ekstrakta *Phallusia nigra* (Savigny, 1816) detektirani su alkaloidi, terpenoidi, steroidi, saponini, flavonoidi, kinoni, antrakinoni, proteini, lipidi i ugljikohidrati dok je u drugom istraživanju na istom plaštenjaku otkrivena prisutnost svih navedenih skupina spojeva osim proteina, lipida i ugljikohidrata u PE ekstraktu (36,44). U MeOH ekstraktu *P. nigra* otkrivena je prisutnost alkaloida, terpenoida, steroida, flavonoida, kinona, fenola, lipida, proteina i ugljikohidrata (44). Preliminarni kemijski probir EtOH ekstrakta *P. nigra* je detektirao alkaloida, terpenoide, flavonoide, fenole, saponine, steroide, proteine, lipide i ugljikohidrate (36). Infracrveni spektar EtOH ekstrakta *P. nigra* je pokazao prisustvo alkana i aromatskih spojeva, alifatskih spojeva broma, fenola ili tercijarnih alkohola, karbonilnih spojeva, karboksilnih kiselina, lipida te proteina (45). Daljnjim analizama EtOH ekstrakta *P. nigra* pomoću tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti detektirani su pikovi galne, kofeinske i ferulične kiseline te rutina, kvercetina i izokvercetina. Nadalje, kvantitativnom procjenom udjela alkaloida, fenola, steroida, flavonoida i saponina u svim ekstraktima *P. nigra* (petroleterski, benzenski, kloroformni, etanolni i vodeni ekstrakt) pomoću UV-Vis

spektrofotometra, utvrđeno je da je EtOH ekstrakt imao najveći udio steroida i flavonoida (36). S druge strane, kod PE ekstrakta srodne vrste *Phallusia arabica* (Savigny, 1816) nisu detektirani antrakinoni nakon provedenog preliminarnog kemijskog probira, ali je otkrivena prisutnost tanina te proteina, lipida i ugljikohidrata. EtOH ekstrakt *P. arabica* u odnosu na EtOH ekstrakt *P. nigra* je pokazao prisustvo tanina, kinona, antrakinona, katehina i aromatskih kiselina dok saponini nisu bili detektirani (46). Svi uzorci plaštenjaka *P. nigra* i *P. arabica* su uzorkovani pored obale južnoindijskog grada Tutikorin u Lakadivskom moru (36,44–46). Iako kvalitativni kemijski probir proveden u sklopu ovog diplomskog rada nije bio opsežan kao ostali kvalitativni probiri spomenuti u ovom poglavlju, PE ekstrakt *P. mammillata* je pokazao prisutnost terpenoida, alkaloida, glikozida, steroida i fenola. Kod EtOH i MeOH ekstrakta *P. mammillata* su detektirani fenoli i alkaloidi. U ACN ekstraktu je otkrivena prisutnost fenola, alkaloida, glikozida, terpenoida, steroida i saponina. Spojevi plaštenjaka koji spadaju u navedene skupine spojeva, a da su izolirani iz razreda *Ascidiae*, su indol alkaloidi, pirokridin alkaloidi, β -karbolin alkaloidi, kinolin alkaloidi, alkaloidi na osnovi aminokiselina tirozin i fenilalanin, saturosporini, cijanobaktini, ciklički depsipeptidi te polisaharidi (2,34). Ovi pojedini spojevi mogu biti razlog biološke aktivnosti organskih ekstrakata plaštenjaka *P. mammillata* evaluiranih pomoću ABTS i MTT esaja.

Procjena antioksidativne aktivnosti krutih organskih ekstrakata *P. mammillata* je provedena pomoću ABTS i DPPH esaja. Svi ekstrakti *P. mammillata* osim PE ekstrakta su pokazali značajnu ABTS antiradikalnu aktivnost. Međutim, niti jedan ekstrakt nije pokazao IC₅₀ vrijednost usporedivu ili bolju od Trolox-a nakon provedenog antioksidativnog esaja. Jedno istraživanje je pokazalo da spojevi s većim brojem konjugiranih dvostrukih veza i acikličkih struktura pokazuju veću ABTS antiradikalnu aktivnost, dok spojevi s β -iononskim prstenom, hidroksilnim i keto skupinama te ksantofili smanjuju istu (13).

Rezultati mjerenja DPPH esej su pokazali da niti jedan organski ekstrakt *P. mamillata* nije postigao IC₅₀ vrijednost. Rezultati DPPH esej provedenim na organskim ekstraktima južnoindijskog plaštenjaka *Phallusia nigra* su pokazali da su MeOH i EtOH ekstrakti imali niže apsorbancije u usporedbi s askorbinskom kiselinom koja je služila kao standard. Alkoholni ekstrakti *P. nigra* su imali višestruko veći postotak inhibicije od EtOH i MeOH ekstrakta *P. mamillatae*. PE ekstrakt *P. nigra* je imao veće apsorbancije u odnosu na standard što znači da je PE ekstrakt *P. mamillata* imao veću DPPH antiradikalnu aktivnost pri usporedivim koncentracijama od PE ekstrakta *P. nigra* (38). Manja antiradikalna aktivnost PE ekstrakta *P. mamillata* može biti zbog utjecaja polarnosti na otapanje jer su organski ekstrakti plaštenjaka te DPPH• radikal pripremljeni i otopljeni u metanolu koji je polaran spoj. DPPH esej je prikladniji za uzorke ekstrahirane polarnijim otapalima što je vidljivo u više navrata. Uobičajeni protokol za DPPH esej je da se DPPH• radikal i uzorci otapaju u metanolu. MeOH ekstrakt je pokazao najveću antiradikalnu aktivnost u usporedbi s ostalim organskim ekstraktima *P. mamillata*. Uljasti PE ekstrakt je imao najmanju ABTS i DPPH antiradikalnu aktivnost jer je uzorak sadržavao komponente ekstrahirane nepolarnijim otapalom, uslijed čega je došlo do zamućenja otopine pri višim koncentracijama nakon otapanja u metanolu te posljedično nepouzdana izmjerenih apsorbancija. To je vidljivo po ABTS i DPPH antiradikalnoj aktivnosti polarnih ekstrakata, EtOH, MeOH i ACN koje su niže u usporedbi s antiradikalnom aktivnošću PE ekstrakta koji je nepolaran (Slike 11. i 12.). Zaključno, ABTS i DPPH esej nisu ponovljivi za PE ekstrakt *P. mamillata* zbog utjecaja polarnosti na otapanje u metanolu te DPPH esej za EtOH ekstrakt zbog velikog raspona standardne devijacije antiradikalne aktivnosti. Kod ABTS i DPPH esej su moguće sinergističke interakcije među pojedinim antioksidansima u ekstraktima *P. mamillata*, pogotovo za alkoholne i ACN ekstrakte koji su pokazali najveću antioksidativnu aktivnost. Treba uzeti u obzir i moguće antagonističke interakcije pojedinih antioksidansa koje bi objasnile slabiju DPPH antiradikalnu aktivnost svih testiranih ekstrakata.

Antioksidativni eseji provedeni u sklopu ovog diplomskog rada se temelje na kemijskim reakcijama *in vitro*, odnosno nisu biološki relevantni eseji jer nemaju sličnosti s biološkim sustavima. Zbog toga što nema kompetitivne reakcije i nema reaktivnog kisika u ET esejima, upitno je kako rezultati ABTS i DPPH eseja mogu biti povezani s antioksidativnom aktivnošću uzoraka. No, kako bi se dobila korelacija, pretpostavlja se da je antiradikalna aktivnost, odnosno kapacitet redukcije jednak antioksidativnoj aktivnosti (15). HAT esej je bolji indikator antioksidativne *in vivo* primjene jer koristi biološki relevantne peroksil radikale (13). Antioksidativni eseji se izvode u kontroliranim uvjetima u homogenoj otopini s umjetnim oksidansom ili prekursorom radikala koji inicira reakciju, dok *in vivo*, reakcija se odvija puno brže (u sekundama) bez dodanih radikala ili oksidansa u heterogenoj otopini/emulziji (15). Masovna uporaba antioksidativnih eseja kao brzog i jednostavnog alata za probir namirnica i bioloških uzoraka rađe nego kao kemijskih reakcija za mjerenje kinetike i određivanje mehanizama između antioksidansa i slobodnih radikala je odgovorno za nedosljednosti, netočnosti i kontroverze u znanstvenoj zajednici, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji te medicini. Na primjer, DPPH• radikal je stabilniji od ABTS•⁺ radikala zbog delokalizacije nesparenog elektrona kroz čitavi aromatski sustav molekule te fenilnih skupina koje okružuju radikalski centar, čineći DPPH• radikal teže dostupnim. Stoga antioksidansima treba duže vremena da ga inhibiraju, odnosno DPPH esej je prikladniji za sporo reagirajuće antioksidanse, čime se zanemaruju brzo reagirajući antioksidansi (13). Trenutačno ne postoji univerzalna metoda za pouzdanu kvantifikaciju antioksidativne učinkovitosti hrane i bioloških uzoraka (13,15). Kombinacija HAT i ET eseja s međusobno različitim mehanizmima bi trebali postati standardna praksa za ispitivanje antioksidativne aktivnosti i kapaciteta. Standardizacija eseja između različitih laboratorija je potrebna kako bi se poboljšala reproducibilnost metoda i kako bi rezultati bili usporedivi i pouzdani (13).

Antiproliferativan i citotoksičan učinak organskih ekstrakata *P. mammillata* je evaluiran pomoću MTT eseja. MTT esej je čest izbor preliminarnog ispitivanja antiproliferacije i citotoksičnosti uzoraka koji se dalje mogu ispitivati *in vivo* na životinjskim modelima poput miševa. Od svih ekstrakata *P. mammillata*, jedino je PE ekstrakt pokazao značajan antiproliferativan i citotoksičan učinak na tumorskim staničnim linijama. Antiproliferativan učinak MeOH ekstrakta je ispitan na drugim vrstama plaštenjaka *Phallusia arabica* i *Phallusia nigra*, probranih u obalnim vodama indijskog grada Tutikorina na tri stanične linije: raku vrata maternice (HeLa), karcinomu debelog crijeva (HT29) i metastatskom tumoru dojke (MCF-7) pomoću MTT eseja. Najniže IC₅₀ vrijednosti MeOH ekstrakta su uočene na MCF-7 staničnoj liniji: 38,28 µM za *P. arabica* i 34,76 µM za *P. nigra* (37). S druge strane, MeOH ekstrakt *P. mammillata* na istoj staničnoj liniji je imao IC₅₀ vrijednost 567,94 ± 147,13 µg/mL.

Buduća istraživanja bi trebala optimizirati ekstrakciju *P. mammillata* većim izborom srednje polarnih i nepolarnih otapala kako bi se utvrdilo imaju li druga otapala veća iskorištenja ekstrakcija od otapala pomoću kojeg je plaštenjak ekstrahiran u ovom radu. Također bi se utvrdilo pokazuju li ekstrakti drugih otapala potencijalnu bioaktivnost. Ekstrakti *P. mammillata* bi se trebali barem djelomično pročititi kromatografijom na stupcu. Daljnja antioksidativna ispitivanja bi se trebala provesti na pročišćenim MeOH, EtOH i ACN ekstraktima i njihovim frakcijama dok bi se daljnja citotoksična ispitivanja trebala provesti na pročišćenom PE ekstraktu te njegovim frakcijama. Ukoliko ispitani pročišćeni ekstrakti i njihove frakcije budu pokazali željene rezultate, preporuča se detaljnija te pouzdanija analiza ekstrakata i frakcija *P. mammillata* pomoću LC-MS analize radi identifikacije bioaktivnih metabolita odgovornih za uočenu antioksidativnu i citotoksičnu aktivnost. Biološka ispitivanja bi se potom trebala provesti na izoliranim i pročišćenim bioaktivnim spojevima. Nadalje, trebalo bi istražiti pozadinu molekularnih mehanizama navedenih aktivnosti spojeva te utvrditi povezanost između opaženih bioloških aktivnosti i pojedinih funkcionalnih

skupina bioaktivnih spojeva. Identificirani bioaktivni metaboliti bi mogli poslužiti kao strukturna osnova potencijalno novih protutumorskih lijekova.

6. ZAKLJUČAK

Morski okoliš je bogat izvor kemijski i biološko raznolikih spojeva s novim mehanizmima djelovanja koji mogu značajno doprinijeti farmaceutskoj, prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji. Oceani i mora čine 90% biosfere te prekrivaju 71% Zemljine površine (9). Prema procjenama američkog Nacionalnog udruženja za oceane i atmosferu (eng. *National Oceanic and Atmospheric Association*), više od 80% oceana nije istraženo, čime je potencijal za istraživanje i razvoj strukturno jedinstvenih bioaktivnih spojeva kao izvor novih lijekova izuzetno velik. Nedostatak održive komercijalne proizvodnje lijekova morskog podrijetla i potencijalnih kandidata lijekova još uvijek je jedan od glavnih izazova u farmaceutskoj industriji. Kemijska sinteza je najpouzdaniji postupak s obzirom da su svi odobreni lijekovi morskog podrijetla upravo proizvedeni sintezom (43). Jedan od morskih organizama za pronalazak potencijalnih kandidat lijekova su plaštenjaci, sjedilački filteri nalik vreći čiji su spojevi poslužili kao strukturna osnova triju odobrenih lijekova. Prema podacima iz 2017. godine, tek 5% vrsta plaštenjaka je istraženo od ukupno 3000 primjeraka zbog čega su ovi morski organizmi obećavajući izvor bioaktivnih spojeva (2). Od ispitanih polarnih otapala, ekstrakcija plaštenjaka *P. mammillata* etanolom je dala najveće iskorištenje. Terpenoidi, alkaloidi, glikozidi i steroidi detektirani kvalitativnim kemijskim probirom u PE ekstraktu *P. mammillata* mogu biti razlog značajnih antiproliferativnih i citotoksičnih učinaka tog ekstrakta. Alkoholni i ACN ekstrakti *P. mammillata* su pokazali značajnu ABTS antiradikalnu aktivnost što može biti zbog prisutnosti fenola i alkaloida u tim ekstraktima. Međutim, niti jedan ekstrakt nije pokazao značajnu IC₅₀ vrijednost nakon provedenog ABTS esaja. S druge strane, značajna DPPH antiradikalna aktivnost nije opažena kod nijednog organskog ekstrakta *P. mammillata*, odnosno niti jedan ekstrakt nije postigao IC₅₀ vrijednost. Rezultati proizašli iz eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada doprijet će poznavanju kemije i biološke aktivnosti dosad rijetko istražene vrste plaštenjaka, *Phallusia mammillatae*.

7. LITERATURA

1. Sithranga Boopathy N, Kathiresan K. Anticancer drugs from marine flora: An overview. *Journal of Oncology*. 2010;2010.
2. Palanisamy SK, Rajendran NM, Marino A. Natural Products Diversity of Marine Ascidians (Tunicates; Ascidiacea) and Successful Drugs in Clinical Development. *Natural Products and Bioprospecting*. 2017;7(1):1–111.
3. Cabrita MT, Vale C, Rauter AP. Halogenated compounds from marine algae. *Marine Drugs*. 2010;8(8):2301–17.
4. Shahidi F, Zhong Y. Antioxidants from marine by-products [Internet]. Maximising the Value of Marine By-Products. Woodhead Publishing Limited; 2006. 397–412 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9781845692087.2.397>
5. Chia YY, Kanthimathi MS, Khoo KS, Rajarajeswaran J, Cheng HM, Yap WS. Antioxidant and cytotoxic activities of three species of tropical seaweeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [Internet]. 2015;15(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0867-1>
6. Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Marine Drugs*. 2014;12(2):1066–101.
7. Pereira RB, Evdokimov NM, Lefranc F, Valentaõ P, Kornienko A, Pereira DM, et al. Marine-derived anticancer agents: Clinical benefits, innovative mechanisms, and new targets. *Marine Drugs*. 2019;17(6):1–21.
8. Alves C, Silva J, Pinteus S, Gaspar H, Alpoim MC, Botana LM, et al. From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9(AUG):1–24.

9. Nigam M, Suleria HAR, Farzaei MH, Mishra AP. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;27(1):491–515.
10. Jiménez C. Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2018;9(10):959–61.
11. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 2008;4(2):89–96.
12. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2015;97:55–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
13. Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*. 2013;85(5):957–98.
14. Sharma GN, Gupta G, Sharma P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Eukaryotic Gene Expression*. 2018;28(2):139–54.
15. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(6):1841–56.
16. Galasso C, Corinaldesi C, Sansone C. Carotenoids from marine organisms: Biological functions and industrial applications. *Antioxidants*. 2017;6(4).
17. Zhong Q, Wei B, Wang S, Ke S, Chen J, Zhang H, et al. The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview. Vol. 17, *Marine Drugs*. 2019.
18. Hamidi M, Safarzadeh Kozani P, Safarzadeh Kozani P, Pierre G,

- Michaud P, Delattre C. Marine bacteria versus microalgae: Who is the best for biotechnological production of bioactive compounds with antioxidant properties and other biological applications? *Marine Drugs*. 2020;18(1):1–38.
19. Pallela R. Antioxidants from Marine Organisms and Skin Care. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. 2014;3771–83.
 20. Shalaby EA, Shanab SMM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Marine Sciences*. 2013;42(5):556–64.
 21. Becker MM, Nunes GS, Ribeiro DB, Silva FEPS, Catanante G, Marty J-L. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *The Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2019;30(5):1108–14.
 22. Matulja D, Wittine K, Malatesti N, Laclef S, Turks M, Marković MK, et al. Marine Natural Products with High Anticancer Activities. *Current Medicinal Chemistry*. 2020;27(8):1243–307.
 23. Rocha DHA, Seca AML, Pinto DCGA. Seaweed secondary metabolites in vitro and in vivo anticancer activity. *Marine Drugs*. 2018;16(11):1–27.
 24. Raijmakers MTM, Poston L. The role of oxidative stress in pre-eclampsia. *Pre-Eclampsia: Etiology and Clinical Practice*. 2007;121–37.
 25. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. *mAbs* [Internet]. 2020;12(1):1–24. Available from: <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1703531>
 26. Markham A. Lurbinectedin: First Approval. *Drugs* [Internet]. 2020;80(13):1345–53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01374-0>

27. Jimenez PC, Wilke D V., Branco PC, Bauermeister A, Rezende-Teixeira P, Gaudêncio SP, et al. Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. *British Journal of Pharmacology*. 2020;177(1):3–27.
28. Markham A. Belantamab Mafodotin: First Approval. *Drugs* [Internet]. 2020;80(15):1607–13. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01404-x>
29. Chen JW, Wu QH, Rowley DC, Al-Kareef AMQ, Wang H. Anticancer agent-based marine natural products and related compounds. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2015;17(2):199–216.
30. Jimenez PC, Wilke DV, Costa-Lotufo LV. Marine drugs for cancer: Surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics*. 2018;73:1–7.
31. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018;2018(6):469–71.
32. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017;12(2):115–8.
33. van Meerloo J, Kaspers G, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. 2011;731(2nd):237–45.
34. Watters DJ. Ascidian toxins with potential for drug development. *Marine Drugs*. 2018;16(5).
35. Young J.Z. Subphylum Tunicata (sea squirts); Developments of ascidians; Various forms of tunicate; Class Ascidiacea. *The life of vertebrates*. 1962;(2th edition):62–70.
36. Shanmuga Priya D., Kohila Subathra Christy H., Sankaravadivu S. Qualitative and quantitative estimations of chemical constituents in a simple ascidian *Phallusia nigra*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2016;5(02):1492–7.

37. Palanisamy SK, Arumugam V, Peter MD, Sundaresan U. Patterns of chemical diversity in the marine ascidian *Phallusia* spp.: anti-tumor activity and metabolic pathway inhibiting steroid biosynthesis. 3 Biotech [Internet]. 2018;8(5):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1273-4>
38. Shanmuga Priya D., Kohila Subathra Christy H., Sankaravadivu S, Packiam CS. Antioxidant activity of the simple ascidian *Phallusia nigra* of Thoothukudi coast. International Journal of Pharmaceutical Chemistry [Internet]. 2015;05(12):410–2. Available from: <http://www.ssjournals.com/index.php/ijpc/article/view/1926>
39. Sarhadizadeh N, Afkhami M, Ehsanpour M. Evaluation of antibacterial , antifungal and cytotoxic agents of Ascidian *Phallusia nigra* (Savigny , 1816) from Persian Gulf. European Journal of Experimental Biology. 2014;4(1):250–3.
40. REGUIEG Aedwina , KUPFER Michel SA-P. *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815) [Internet]. DORIS (Data of Observations for Recognition and Identification of the fauna and flora Subaquatiques). 2019 [cited 2020 Oct 16]. Available from: <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/319>
41. Ueki T, Takemoto K, Fayard B, Salomé M, Yamamoto A, Kihara H, et al. Scanning x-ray microscopy of living and freeze-dried blood cells in two vanadium-rich ascidian species, *Phallusia mammillata* and *Ascidia sydneiensis samea*. Zoological Science. 2002;19(1):27–35.
42. McDougall A, Chenevert J, Dumollard R. Cell-Cycle Control in Oocytes and During Early Embryonic Cleavage Cycles in Ascidians. In: International Review of Cell and Molecular Biology [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc.; 2012. p. 235–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394308-8.00006-6>
43. Gomes NGM, Dasari R, Chandra S, Kiss R, Kornienko A. Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the

"supply problem." *Marine Drugs*. 2016;14(5).

44. Gopalakrishnan S, Shanmuga priya D, Meenakshi VK. Pharmacognostical and Preliminary Phytochemical Evaluation of *Phallusia nigra* Sav. *Global Journal of Pharmacology*. 2013;7(1):39–44.
45. Shanmuga Priya D., Sankaravadivu S, Kohila Subathra Christy H. HPTLC and IR Spectral studies of the ethanolic extract of *Phallusia nigra*. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*. 2016;06(10):218–23.
46. Kohila Subathra Christy H, Jothibai Margret R, Meenakshi V. CHEMICAL SCREENING AND ANAESTHETIC ACTIVITY OF *PHALLUSIA ARABICA* SAVIGNY, 1816. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applies Sciences*. 2014;4(1):24–8.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Šurlina Karlo

 Pletenci 24, 51000 Rijeka (Hrvatska)

 (+385) 95 553 76 62

 sukisurlina@gmail.com

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

10/2018–danas

Diplomski sveučilišni studij Istraživanje i razvoj lijekova

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

Tema diplomskog rada: Kemijska i biološka evaluacija organskih ekstrakata plaštenjaka, *Phallusia mammillata*, iz Jadranskog mora

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dean Marković

10/2015–07/2018

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija i istraživanje lijekova

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

Stečena titula: univ. bacc. biotech. et pharma inv. (s pohvalom - cum laude)

09/2011–06/2015

Srednja škola

Gimnazija Andrije Mohorovičića, Rijeka (Hrvatska)

Smjer: opća gimnazija

RADNO ISKUSTVO

02/2020–07/2020

Rad u laboratoriju u sklopu diplomskog rada

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Zavod za medicinsku kemiju, Laboratorij za organsku kemiju i sintezu te kemiju čvrstog stanja, Rijeka (Hrvatska)

- poznavanje rada s rotacijskim uparivačem
- provođenje DPPH esaja

09/07/2018–20/07/2018

Stručna praksa

Jadran-Galenski laboratorij d.d., Rijeka (Hrvatska)

Kontrola kvalitete

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik

Hrvatski

Strani jezici

engleski

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
C1	C1	C1	C1	C1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA

Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik

[Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu](#)

Osnovno znanje rada u programima Microsoft Office.

Osnovno znanje rada u programima za računalnu kemiju: Avogadro, UCSF Chimera, PyMOL, VMD, Gamess i Gromacs

Vozačka dozvola

B kategorija

DODATNE INFORMACIJE

Volontiranje

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci - projekt Studenti mentori (ak.god. 2018./2019.)

Članstva u udrugama

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (2015. – 2020.)