

# Citotoksičnost seskviterpenskih laktona cinaropikrina i kostunolida

---

Jovanović, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:718562>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-17**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Katarina Jovanović**

**CITOTOKSIČNOST SESKVITERPENSKIH LAKTONA CINAROPIKRINA I  
KOSTUNOLIDA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina 2019./2020.**

**Mentor: Dr. sc. Ivana Carev**

**Split, rujan 2020**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**  
**ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**Katarina Jovanović**

**CITOTOKSIČNOST SESKVITERPENSKIH LAKTONA CINAROPIKRINA I  
KOSTUNOLIDA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina 2019./2020.**

**Mentor: Dr. sc. Ivana Carev**

**Split, rujan 2020.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**MASTER STUDY OF CHEMISTRY**  
**ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**Katarina Jovanović**

**CYTOTOXIC ACTIVITY OF SESQUITERPENE LACTONES  
CYNAROPICRIN AND COSTUNOLIDE**

**Diploma thesis**

**Mentor: Dr. sc. Ivana Carev**

**Academic year: 2019./2020.**

**Split, Spetember 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet  
Diplomski studij Kemije: Organska kemija i biokemija

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Dr. sc. Ivana Carev

**Pomoć pri izradi:** Dr. sc. Ivana Carev i Anja Golemac, mag. chem.

### CITOTOKSIČNOST SESKVITERPENSKIH LAKTONA CINARAPIKRINA I KOSTUNOLIDA

Katarina Jovanović, 117

**Sažetak:** Seskviterpeni su prirodni kemijski spojevi koji su po svojoj kemijskoj strukturi C-15 terpenoidi. Pojavljuju se kao ugljikovodici ili u oksidiranoj formi kao alkoholi, aldehidi, kiseline ili laktoni u prirodi. Važni su sastojci biljnih ekstrakata i esencijalnih ulja koja imaju značajnu primjenu u medicinskim, mirisnim pripravcima ili sapunima. Seskviterpenski laktoni posjeduju značajna biološki aktivna svojstva koja mogu biti od iznimne koristi u liječenju mnogih bolesti. Mogu imati protuupalan, antitumorski, antimikrobni, učinak na živčani i kardiovaskularni sustav i druge biološke učinke. Od biološke aktivnosti značajan je njihov citotoksični, antitumorski učinak na ljudske stanice. Citotoksični učinak vezan je za  $\alpha,\beta$ -nezasićenu karbonilnu strukturu kao što je  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton, odnosno  $\alpha,\beta$ -nezasićeni ciklopentanon ili konjugirani ester. Seskviterpenski laktoni cinaropikrin i kostunolid mogu se izolirati iz biljaka porodice *Asteracea*, posebno iz biljaka njezinog roda *Centaurea*. Dobro je poznat i značajan njihov citotoksični učinak dokazan u brojnim istraživanjima. U ovom radu testiran je citotoksičan učinak seskviterpenskih laktona cinaropikrina i kostunolida na ljudske stanice fibroblaste. Pomoću MTT testa utvrđena je viabilnost stanica. Pokazali smo da je potrebno testirati koncentracije cinaropikrina više od 2,890  $\mu$ M i kostunolida više od 21,500  $\mu$ M kako bismo postigli vrijednosti inhibicije rasta stanica niže od 50%. Testiranja cinaropikrina pokazala su da manje koncentracije imaju i pozitivan učinak na rast stanica fibroblasta, te su potrebna dodatna istraživanja kako bismo utvrdili o kakvom se učinku i mehanizmu aktivacije radi.

**Ključne riječi:** cinaropikrin, kostunolid, MTT test, seskviterpenski laktoni

**Rad sadrži:** 6 tablica, 20 slika, 53 stranice

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu :**

1. Izv. prof. dr. sc. Mila Radan, predsjednik povjerenstva
2. Doc. dr. sc. Marina Zekić, član
3. Dr. sc. Ivana Carev, mentor

**Datum obrane:** 25. rujna 2020.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom formatu (pdf format) obliku pohranjen** u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology**  
**Master study of Chemistry : Organic Chemistry and Biochemistry**

**Scientific area:** Natural Science

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty of Chemistry and Technology Council, session no. 28.

**Mentor:** Ivana Carev, PhD

**Technical assistance:** Ivana Carev, PhD; Anja Golemac, mr.sc. chem.

### **CYTOTOXIC ACTIVITY OF SESQUITERPENE LACTONES CYNAROPICRIN AND COSTUNOLIDE**

Katarina Jovanović, 117

#### **Abstract :**

Sesquiterpenes are natural chemical compounds that are C-15 terpenoids by their chemical structure. They appear as hydrocarbons or oxidized form products as alcohols, aldehydes, acids or lactones in nature. They are important ingredients of plant extracts and essential oils that have significant application in medical, fragrant preparations or soaps. Sesquiterpene lactones own important biologically active properties that can be very useful in many disease treatments. They can have anti-inflammatory, antitumor, antimicrobial effects on central nervous and cardiovascular system as well as other biological effects. Of biological activities, cytotoxic, antitumor activity is significant on human cells. Cytotoxic activity is related to  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl structure such as  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone or to  $\alpha,\beta$ -unsaturated cyclopentanone or conjugated ester. Sesquiterpene lactones cynaropicrin and costunolide can be isolated from plants of *Asteracea* family, especially from plants of its genus *Centaurea*. Their cytotoxic activity is well known and proven in numerous studies. In this paper, the cytotoxic activity of cynaropicrin and costunolide sesquiterpene lactones was tested on human fibroblast cells. Cell viability was determined by MTT assay. We have shown that it is necessary to test higher concentrations of cynaropicrin of 2,890  $\mu$ M and costunolide of 21,500  $\mu$ M in order to achieve cell growth inhibition values lower than 50%. Cynaropicrin tests have shown that lower concentrations have positive effect on fibroblast cell growth and further research is needed in order to determine what the effect and mechanism of activation is.

**Keywords:** cynaropicrin, costunolide, MTT test, sesquiterpene lactones

**Thesis contains:** 6 tables, 20 pictures, 53 pages

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Prof. Mila Radan, PhD, associate prof - committee president
2. Prof. Marina Zekić, PhD; assistant prof. member
3. Ivana Carev, PhD, mentor

**Defence day:** 25th September 2020.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35





*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, a eksperimentalni dio rada na Mediteranskom institutu za istraživanje života pod mentorstvom dr. sc. Ivane Carev, u razdoblju od lipnja do rujna 2020. godine.*

*Zatvarajući još jedno poglavlje svoga života prisjećam se svih studentskih dana i onog što su nosili sa sobom.*

*Zahvalna sam na svim ljudima koji su bili dio moga puta i svojim ohrabrujućim riječima, djelima i gestama me usmjeravali ka cilju, prvenstveno mojoj obitelji: majci Nataši, ocu Igoru i bratu Hrvoju, obitelji i prijateljima koji su blizu i onima koji su daleko, profesorima i kolegama. Hvala što ste bili tu za mene za vrijeme školovanja, a i cijeli život.*

*Željela bih se zahvaliti i svojoj mentorici, profesorici Ivani Carev, na iznimnom trudu i zalaganju, svim lijepim riječima upućenim tijekom izrade ovog rada, ali i za vrijeme školovanja kao i Anji na velikoj pomoći u laboratoriju.*

*Hvala i Ivani i Mariji koje su, iako tako malene, me naučile mnogočemu.*

*Naposljetku, hvala i onom koji više nije među nama, a znam da bi bio osobito ponosan na današnji dan, ovaj rad posvećujem njemu.*

## **ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

- Definirati biološku aktivnost seskviterpenskog laktona
- Odrediti citotoksični učinak seskviterpenskog laktona cinaropikrina na ljudske fibroblaste pomoću MTT testa
- Odrediti citotoksični učinak seskviterpenskog laktona kostunolida na ljudske fibroblaste pomoću MTT testa

## SAŽETAK

Seskviterpeni su prirodni kemijski spojevi koji su po svojoj kemijskoj strukturi C-15 terpenoidi. Pojavljuju se kao ugljikovodici ili u oksidiranoj formi kao alkoholi, aldehidi, kiseline ili laktoni u prirodi. Važni su sastojci biljnih ekstrakata i esencijalnih ulja koja imaju značajnu primjenu u medicinskim, mirisnim pripravcima ili sapunima.

Seskviterpenski laktoni posjeduju značajna biološki aktivna svojstva koja mogu biti od iznimne koristi u liječenju mnogih bolesti. Seskviterpenski laktoni moduliraju veliki broj upalnih procesa, primjerice oksidativnu fosforilaciju, agregaciju trombocita i otpuštanje serotonina. Brojna su istraživanja pokazala da seskviterpenski laktoni imaju protuupalan, antitumorski, antimikrobni, učinak na živčani i kardiovaskularni sustav i druge biološke učinke. Od biološke aktivnosti značajan je njihov citotoksični, antitumorski učinak na ljudske stanice. Citotoksični učinak vezan je za  $\alpha,\beta$ -nezasićenu karbonilnu strukturu kao što je  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton, odnosno  $\alpha,\beta$ -nezasićeni ciklopentanon ili konjugirani ester. Ovi strukturni elementi reagiraju kao nukleofili, posebno cistein sulfhidrilne skupine putem reakcije Michaelove adicije. Tiolne skupine kao što su cisteinske rezidue u proteinima, zapravo su ciljana mjesta seskviterpenskih laktona. Razlika u aktivnosti između individualnih seskviterpenskih laktona može se objasniti različitim alkilacijskim strukturnim elementima no utjecaj na aktivnost mogu imati i ostali faktori kao što je lipofilnost, molekularna geometrija i slično.

Seskviterpenski laktoni cinaropikrin i kostunolid mogu se izolirati iz biljaka porodice *Asteracea*, posebno iz biljaka njezinog roda *Centaurea*. Dobro je poznat i značajan njihov citotoksičan učinak dokazan u brojnim istraživanjima. U ovom radu testiran je citotoksični učinak seskviterpenskih laktona cinaropikrina i kostunolida na ljudske stanice fibroblaste. Pomoću MTT testa utvrđena je viabilnost stanica. Pokazali smo da je potrebno testirati više koncentracije cinaropikrina od 2,890  $\mu\text{M}$  i kostunolida od 21,500  $\mu\text{M}$  kako bismo postigli vrijednosti inhibicije rasta stanica niže od 50%. Testiranja cinaropikrina pokazala su da manje koncentracije imaju i pozitivan učinak na rast stanica fibroblasta, te su potrebna dodatna istraživanja kako bismo utvrdili o kakvom se učinku i mehanizmu aktivacije radi.

**Ključne riječi:** cinaropikrin, kostunolid, MTT test, seskviterpenski laktoni.

## SUMMARY

Sesquiterpenes are natural chemical compounds that are C-15 terpenoids by their chemical structure. They appear as hydrocarbons or oxidized form products as alcohols, aldehydes, acids or lactones in nature. They are important ingredients of plant extracts and essential oils that have significant application in medical, fragrant preparations or soaps.

Sesquiterpene lactones own important biologically active properties that can be very useful in many disease treatments. Sesquiterpene lactones modulate large number of inflammatory processes, for example oxidative phosphorylation, platelet aggregation and release of serotonin. They can have anti-inflammatory, antitumor, antimicrobial effects on central nervous and cardiovascular system as well as other biological effects. Of biological activities, cytotoxic, antitumor activity is significant on human cells. Cytotoxic activity is related to  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl structure such as  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone or to  $\alpha,\beta$ -unsaturated cyclopentanone or conjugated ester. These structural elements react as nucleophiles, especially cysteine sulfhydryl groups by Michael addition reaction. Thiol groups, such as cysteine residues in proteins, are actually target places of sesquiterpene lactones. Activity difference between individual sesquiterpene lactones can be explained through different alkylating structural elements but activity impact can appear through other factors, such as lipophilicity, molecular geometry etc.

Sesquiterpene lactones cynaropicrin and costunolide can be isolated from plants of *Asteracea* family, especially from plants of its genus *Centaurea*. Their cytotoxic activity is well known and proven in numerous studies. In this paper, the cytotoxic activity of cynaropicrin and costunolide sesquiterpene lactones was tested on human fibroblast cells. Cell viability was determined by MTT assay. We have shown that it is necessary to test higher concentrations of cynaropicrin of 2,890  $\mu\text{M}$  and costunolide of 21,500  $\mu\text{M}$  in order to achieve cell growth inhibition values lower than 50%. Cynaropicrin tests have shown that lower concentrations have positive effect on fibroblast cell growth and further research is needed in order to determine what the effect and mechanism of activation is.

**Keywords:** cynaropicrin, costunolide, MTT test, sesquiterpene lactone

# SADRŽAJ

<b>1. OPĆI DIO</b> .....	1
1.1. Seskviterpeni .....	1
1.2. Seskviterpenski laktoni .....	1
1.2.1. Biljne vrste u kojima se nalaze seskviterpenski laktoni .....	4
1.2.2. Seskviterpenski laktoni u biljnim vrstama iz porodice Asteraceae .....	7
1.2.3. Biološka aktivnost seskviterpenskih laktona .....	8
1.2.3.1. Antitumorska i citotoksična aktivnost seskviterpenskih laktona .....	9
1.2.3.2. Antibakterijska i antifungalna aktivnost seskviterpenskih laktona ...	11
1.2.3.3. Protuupalna svojstva seskviterpenskih laktona .....	12
1.2.3.4. Kontaktni alergijski dermatitis .....	13
1.2.4. Citotoksičnost <i>Centaurea</i> vrsta i njihovih ekstrakata .....	15
1.2.5. Kostunolid .....	17
1.2.6. Cinaropikrin .....	20
1.3. Mehanizam djelovanja seskviterpena .....	23
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	25
2.1. Kemikalije i reagensi .....	25
2.2. Kultura stanica .....	25
2.3. Priprema molekula i otapala .....	28
2.4. Mjerenje citotoksičnosti spojeva na ljudske stanice – MTT test .....	31
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	33
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	37
<b>LITERATURA</b> .....	38

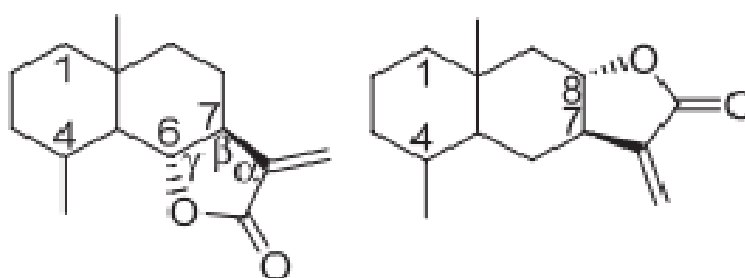
# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Seskviterpeni

Seskviterpeni su prirodni kemijski spojevi koji su po svojoj kemijskoj strukturi C-15 terpenoidi. Pojavljuju se kao ugljikovodici ili u oksidiranoj formi kao alkoholi, aldehidi, kiseline ili laktoni u prirodi. Važni su sastojci biljnih ekstrakata i esencijalnih ulja koja imaju značajnu primjenu u medicinskim, mirisnim pripravcima ili sapunima. Također, prisutni su i kao mirisne komponente u aromama. Esencijalna ulja imaju, u kemijskom pogledu, vrlo kompleksnu građu. Za optimalnu separaciju kao i identifikaciju i izolaciju individualnih komponenata potrebne su kromatografske tehnike. (1) Kao i mnoge druge klase terpena, seskviterpeni su osobito značajni zbog svoje biološke aktivnosti u živim organizmima. Ono što ih razlikuje od ostalih klasa prirodnih spojeva je velika raznolikost seskviterpenskih spojeva koji su izolirani iz prirodnih izvora i identificirani. Izvor ove različitosti leži u strukturnoj različitosti koja nastaje u spajanju 15-ugljikovih kostura gradeći okosnicu svih seskviterpena kao i slojevitosti funkcijskih skupina i supstituenata. Većina seskviterpena nastaje od farnezil difosfata (FPP), C<sub>15</sub> difosforiliranog intermedijera mevalonske kiseline (MVA). Biosintetski put mevalonske kiseline, niz je biokemijskih reakcija stvaranja biološki važnih seskviterpena. (2)

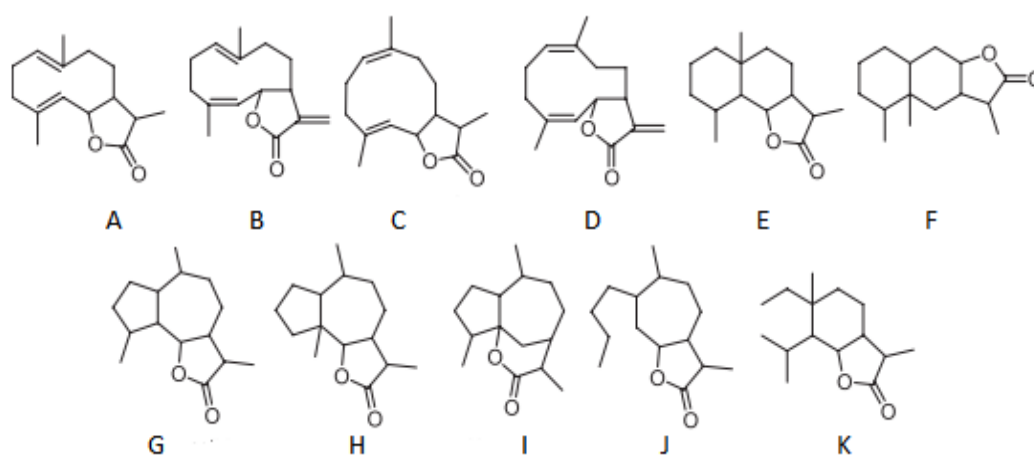
## 1.2. Seskviterpenski laktoni

Seskviterpenski laktoni (SLs) su velika skupina sekundarnih metabolita. Istraživanje ovih spojeva postalo je osobito značajno u posljednjem desetljeću jer veliki broj ovih spojeva posjeduje biološku i terapijsku aktivnost. Neke od njih su protuupalna, analgetska aktivnost, antitumorska, kao i antimikrobna svojstva, te su pripravci koji sadrže ove spojeve često korišteni za liječenje mnogih bolesti. Što se tiče kemijske strukture seskviterpenskih laktona, to su terpenoidi dobiveni putem mevalonske kiseline iz biljaka. Seskviterpenski laktoni su bezbojni, relativno stabilna podvrsta terpenoida koji imaju lipofilni karakter. Ovi sekundarni metaboliti su C<sub>15</sub> spojevi koji nastaju od tri izoprenske jedinice i regiospecifične oksidacije ( $\beta$ -karboksilacija na C<sub>7</sub> ugljiku), kao i pripajanja hidroksilne funkcionalne skupine na C<sub>6</sub> i C<sub>8</sub> ugljiku koja vodi laktonizaciju. Konfiguracija na C<sub>7</sub> ugljiku kod većine seskviterpenskih laktona prikazana je na slici 1.



**Slika 1.** Laktonizacija na C<sub>6</sub> i C<sub>7</sub> ugljiku kod seskviterpenskih laktona (3)

Važna karakteristika koja se pojavljuje kod većine seskviterpenskih laktona jest postojanje  $\gamma$ -laktonskog prstena koji sadrži  $\alpha$ -metilensku skupinu. Većina kombinacija  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -laktona sadrži istu estersku skupinu. Ostale modifikacije uključuju hidrokside i epoksidne prstenove. Također, prisutne su i konjugirane karbonilne strukture kao što su  $\alpha,\beta$ -nezasićene keto skupine. Podjela seskviterpenskih laktona po skupinama bazira se na karbocikličnom kosturu, koji ih svrstava u neke od sljedećih skupina : germakranolidi, melampolidi (deseteročlani prsten); eudesmanolidi i eremofilanolidi (dva spojena šesteročlana prstena); guaianolidi, pseudoguaianolidi, hipokretenolidi (peterociklički ili sedmerociklički spojevi ). (Slika 2.) Pojedini spojevi iz skupine elemanolida i ksantanolida imaju strukture s otvorenim prstenom.

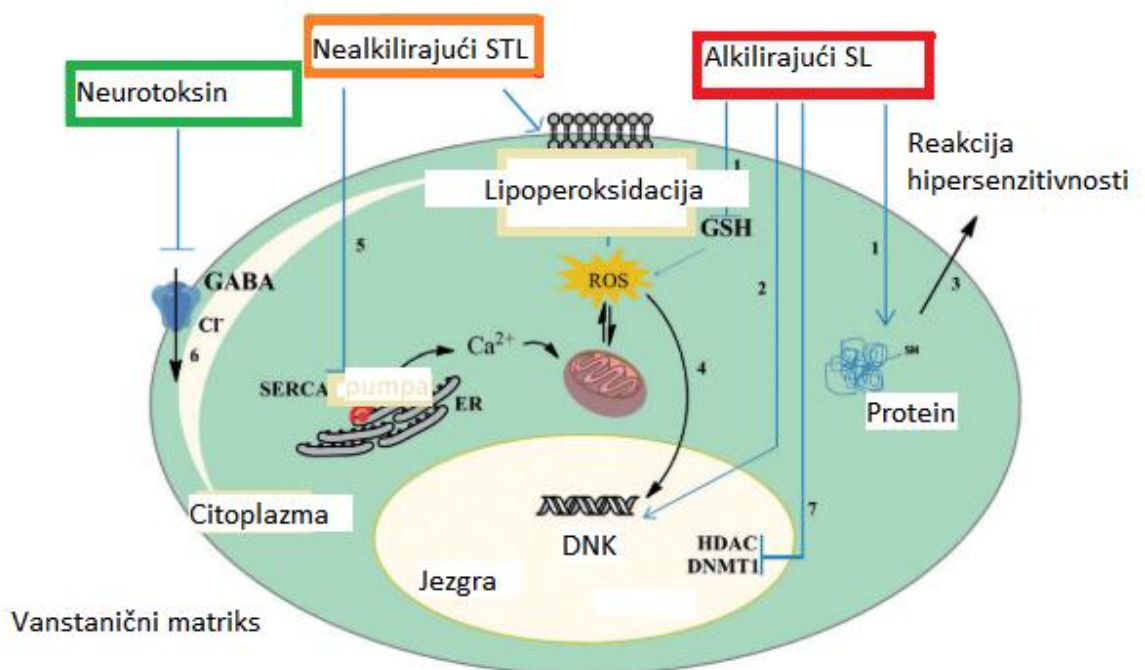


**Slika 2.** Strukture skupina seskviterpenskih laktona (3) ( A) Germakranolidi, B) Heliangolidi , C) Melampolidi, D) Germakradienlolidi, E) Eudesmanolidi, F) Eremofilanolidi, G) Guaianolidi, H) Pseudoguaianolidi, I) Hipokretenolidi, J) Ksantanolidi, K) Elemanolidi )



Germakranolidi su najveća skupina STL-a i predstavljaju biogenetske prekursore većine seskviterpenskikh laktona, predstavljajući izomernu konfiguraciju koja svrstava gore navedene spojeve u skupine. Guaianolidi i njihovi sekundarni derivati, ksantanolidi, su još jedna značajna skupina.

Ljudska populacija kao i životinje izložene su djelovanju SL-a na različite načine, posebice kroz direktni kontakt sa SL-a koje sadrže biljke. U današnje vrijeme, biljke predstavljaju značajan izvor spojeva koje se skoriste u farmaceutskoj industriji ( 67% lijekova za liječenje raka su prirodni spojevi ili derivati istih). No, primjena novih terapijskih supstanci za komercijalnu svrhu zahtjeva provjeru sigurnosti njihovog korištenja. Alkilacija se smatra glavnim mehanizmom protutumorskog djelovanja seskviterpenskikh laktona uz formiranje kovalentnih veza s biološkim makromolekulama. Ovaj osnovni mehanizam je vrlo nespecifičan, s niskom selektivnošću. Kovalentnim vezivanjem na sulfhidrilnu skupinu enzima i drugih funkcionalnih proteina Michaelovom adicijom elektrofilnih  $\alpha,\beta$ -nezasićenih karbonilnih ostataka oni alkiliraju i tako ometaju funkciju biomolekula na koje se vežu (DNA, proteina i sl.) Također, mogu i inhibirati membranske transportere, modulirati epigenetičke promjene genske ekspresije, ometati stanični redoks sustav na način da mijenjaju koncentraciju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i slobodnog glutationa u stanici, potom izazvati oštećenja DNA stvaranjem ROS-a i sl. (4)



**Slika 3.** Mehanizmi djelovanja seskviterpenskikh laktona u stanici

Mehanizam djelovanja seskviterpenskih laktona u stanici sadrži nekoliko biokemijskih reakcija i procesa. Alkilacija glutationa i proteina koja rezultira povećanim oksidativnim stresom, alkilacija DNA koja katkad dovodi do genetskih mutacija, alkilirani proteini su prepoznati kao "strana tijela" pa se izbacuju iz stanice, povećani oksidativni stres dovodi do genetskih mutacija, blokiranje pumpi SERCA, što dovodi do akumulacije Ca-iona pri čemu dolazi do neravnoteže koncentracije ROS-a u mitohondriju, neravnoteža transporta Cl<sup>-</sup> u stanicu zbog antagonističkog djelovanja na GABA receptor, ometanje epigenetičkih procesa. (5)

### 1.2.1. Biljne vrste u kojima se nalaze seskviterpenski laktoni

Seskviterpenski laktoni su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu te su prisutni u nekoliko biljnih porodica uključujući *Acanthaceae*, *Amaranthaceae*, *Apiaceae*, *Aristolochiaceae*, *Asteraceae*, *Bombacaceae*, *Burseraceae*, *Coriariaceae*, *Chloranthaceae*, *Euphorbiaceae*, *Illiciaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Menispermaceae*, *Orchidaceae*, *Polygonaceae* i *Winteraceae*. Prisutni su također i u biljkama iz reda mahovnjača, točnije zdenčara. Monoterpeni prevladavaju u porodici *Lamiaceae*, dok seskviterpenski laktoni uglavnom prevladavaju u skupini *Asteraceae*. Vrste iz ove porodice imaju najraznolikiju skupinu seskviterpenskih laktona, uključujući gotovo 5000 struktura s 30 različitih tipova kostura do sada identificiranih. (6) Seskviterpenoidi su uglavnom locirani u stanicama karakterističnim za većinu vrsta iz porodice *Asteraceae*, no mogu se naći i u vakuolama ostalih staničnih tipova kod biljaka, osobito izgrađenih prilikom odgovora na biotički stres. Glavni su sastojci lateksa, kod biljaka koji ga proizvode, a značajni su i kao antimikrobni agensi. Spojevi kao što je fitoaleksin<sup>1</sup>, molekule proizvedene "de novo" u reakciji mikrobnog napada, služe kao prirodna zaštita biljaka od UV zračenja. Biljke ne proizvode seskviterpenske laktone i ostale sekundarne metabolite za dobrobit ljudi nego vlastite funkcije. Najčešće su prisutni u lišću i cvjetnim glavicama, uglavnom proizvedeni u velikim količinama ili kod nekih vrsta u organima za skladištenje, primjerice trihomima. (7) Istraživanja pokazuju kako su seskviterpenski laktoni izrazito dobri spojevi za razlikovanje podrodova nekih od značajnijih porodica kao što su : *Vernoniae*, *Heliantheae* te *Mutisioideae* (Slika 4.). Kod rodova *Vernonia*, *Ambrosia*, *Iva*, *Parthenium*, *Tetragonotheca* te *Artemisia*, seskviterpenski laktoni su korisni markeri za razdvajanje

---

<sup>1</sup> izlučevina biljne stanice koja brani biljku od nametnika

podvrsta i sistematiku. Različite dvosupnice stvaraju germakranolidne seskviterpene, a samo porodicu *Asteraceae* karakterizira niz strukturno modificiranih i visoko supstituiranih spojeva. Preko 1300 različitih struktura seskviterpenskikh laktone izolirano je iz gotovo svih članova od 15 rodova ove porodice. (8)

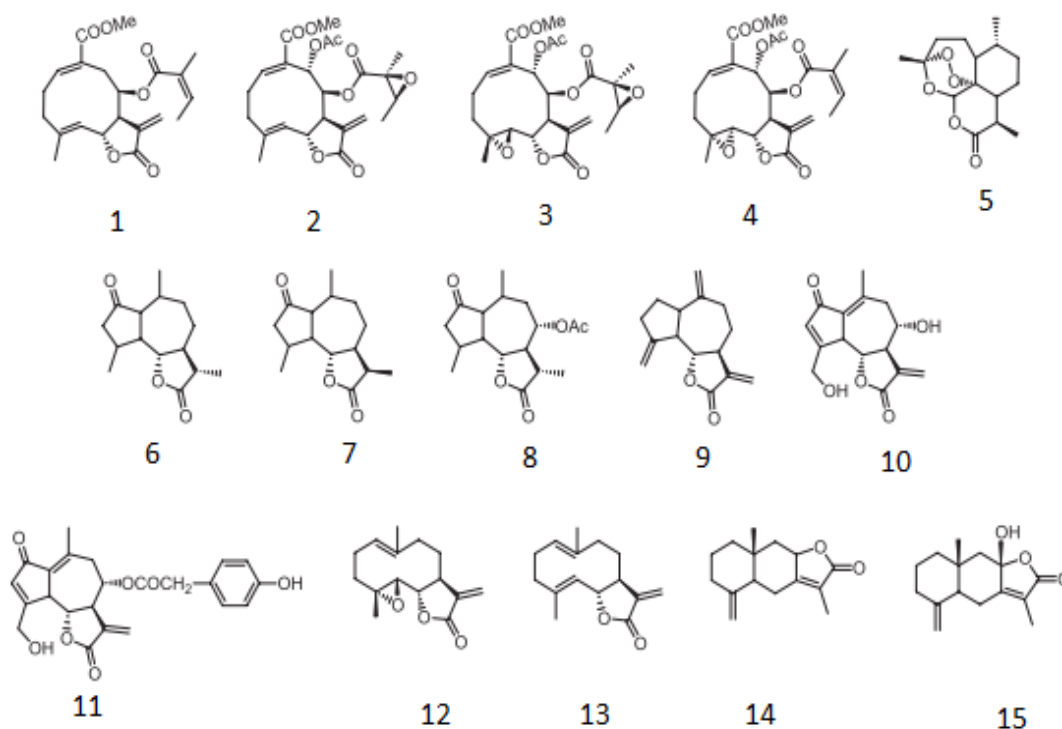


**Slika 4.** Neke biljne vrste iz porodice *Asteraceae* (s lijeva na desno) : *Centaurea rupestris*, *Centaurea jacea* (Autor: Ivana Carev)

Porodica *Asteraceae* smatra se najvećim izvorom strukturno različitih seskviterpenskikh laktone, iako su prisutni i u ostalim porodicama kao što su *Magnoliaceae*, *Apiaceae*, *Lauraceae* i *Acanthaceae*. Korijenje biljaka uglavnom sadrži manje SL, ali neki spojevi su i izolirani iz istih (primjerice laktone iz biljke *Michelia compressa*, helenalin iz *Inula helenium*, te laurenobiolidi iz biljke *Laurus nobilis*). Postotak laktone koji se može izolirati ovisi o vrsti i dijelu biljke iz kojeg je izoliran ali uglavnom varira između 0,001% do 5% suhe mase. (3) Neke biljne vrste iz rodova *Vernoniae*, *Heliantheae* i *Mutisioideae* su *Vernonia baldwinii*, *Helianthus annuus*, *Mutisia acerosa* (9–11)

Mnogobrojne biljke koje sadrže SL koriste se kao prirodni lijekovi ili konzumiraju kao hrana, a seskviterpenski laktone su zaslužni za okus gorčine tih biljaka. Ovi biološki aktivni spojevi imaju određena farmakološka svojstva. Neke od vrsta koje ih sadrže, su primjerice kamilica (*Matricaria recutitia*), jakon (*Smallanthus sonchifolius*), zelena salata (*Letuca spp.*) i slično. Brazilska arnika (*L. trichocarpha*), kao i europska, sadrže seskviterpenske laktone koji se primjenjuju kod nagnječenja, za tretiranje reumatizma, upala i boli. Cvjetovi kamilice imaju različite bioaktivne molekule, uključujući

guianolide s protuupalnim efektom. *Atractylodes macrocephala* sadrži SL kao što su atraktilenolid I i III (Slika 5.) s protuupalnim efektima na LPS-aktivirane makrofage, *in vitro* i *in vivo* antitumorsku aktivnost u stanicama raka pluća kao i citotoksičnu aktivnost na leukemijskim stanicama. *Artemisia annua* sadrži artemisinin, spoj koji se nalazi u sastavu lijekova protiv malarije i učinkovit je u njihovoj primjeni. (3)



**Slika 5.** Neki seskviterpenski laktoni s protuupalnom aktivnošću: 1. sonhifolin; 2. uvedalin; 3. enhidrin; 4. fluktuanin; 5. artemisinin; 6. leukodin; 7. ahilin; 8. matrikarin; 9. dehidrokostuslakton; 10. laktucin; 11. laktukopikrin; 12. partenolid; 13. kostunolid; 14. atraktilenolid I; 15. atraktilenolid III. (3)

### 1.2.2. Seskviterpenski laktoni u biljnim vrstama iz porodice *Asteraceae*

*Asteraceae* je jedna od najvećih i najekonomičnijih biljnih porodica, koja sadrži više od 23 000 biljnih vrsta raširenih unutar 1620 rodova. Veliki broj značajnih biljaka, primjerice *Hieracium sp.*, *Cirsium sp.*, i ostali predstavnici roda *Cardueae*, *Centaurea solstitialis L.*, *Taraxacum officinale*, pripadaju ovoj biljnoj vrsti. Istraživanja potvrđuju postojanje 287 različitih seskviterpena koji pripadaju rodovima ove biljne vrste. Za razliku od ostalih rodova iz porodice *Asteraceae* koji pripadaju različitim podvrstama, oksigenirana funkcija na C-7 ugljiku je gotovo uvijek  $\alpha$ -orijentirana te, ako postoji, esterski dio lanca je često povezan s ovim ugljikom. Najčešći spoj koji se pojavljuje je cnicin te cinaropikrin, janerin i klorohisopifolin. *A. Centaurea conifera*, *Centaurea incana*, *Centaurea salonitana*, *Centaurea scabiosa* and *C. solstitialis* sadrže germakrane, guianolide i eudesmane. Porodici *Asteraceae* pripadaju i suncokreti (*Helianthus annuus*) koji se uzgajaju zbog ulja u svojim sjemenkama, *Carthamus tinctorius* odavno se koristi kao tekstilna boja, a mnoge vrste se koriste kao aromatično bilje ili u medicinske svrhe. (12)

Artičoka je biljka koja predstavlja odličan izvor zdravih sastojaka kao što su polifenoli, seskviterpenski laktoni, vitamini i minerali. Najvažnije i najzastupljenije polifenolne komponente u artičokama jesu izomeri kafeoilkvinske kiseline kao i flavoni te antocijanini. Seskviterpenski laktoni (guaianolidi) su još jedna važna skupina bioaktivnih komponenta prisutna u artičokama koja je povezana s različitim pozitivnim učincima nastalih konzumiranjem istih. Najzastupljeniji spoj je cinaropikrin, koji pokazuje niz pozitivnih farmakoloških učinaka kao što su snižavanje nivoa lipida u krvi, čime se usporava razvoj ateroskleroze i smanjuje učestalost njezinih posljedica u kardiovaskularnom sustavu (antihiperlipidemi), sastojci lijekova protiv bolesti tripanosomijaze, poznatije kao uspavljivanje (antitripanosomsko djelovanje), spojevi koje sadrže lijekovi korišteni za liječenje malarije (antimalarici), antifeedanti, te lijekovi koji se koriste kao agenti za relaksaciju mišića (antispazmolitici) te antitumorske aktivnosti. (13–15)

Prisutnost polifenola i seskviterpenskih laktona u biljnim ekstraktima ovisi o uzgoju, uvjetima rasta kao i mnogim drugim faktorima. Biološki aktivne komponente artičoke prelaze crijevne i želučane barijere dospjevajući u ljudski krvotok. Međutim, neprobavljeni ostaci artičoke mogu dovesti do nakupljanja fenolnih komponenti u

debelom crijevu. U skorije vrijeme, nove hibridne vrste artičoka su se pokazale kao efektivni inhibitori neurodegenerativnih enzima (kao što je kolinesteraza) time potvrđujući farmakološki potencijal ekstrakata iz ove biljne vrste. Na spomenute biološke učinke polifenola i seskviterpenskih laktone značajno mogu utjecati fermentacijski i procesi probave. Ranije spomenuta frakcija koja dospijeva u debelo crijevo ima glavnu ulogu u određivanju zdravlja crijeva pružajući antioksidativnu komponentu ili pozitivan utjecaj na crijevnu mikrobiotu. Antioksidativni efekt artičoka prema gastrointestinalnom traktu je istražen *in vivo* kao i *in vitro*. Istraživanje je moguće provoditi putem UHPLC-QTOF maseno spektrometrijskog pristupa s naglaskom na polifenolne spojeve i seskviterpenske laktone. *In vitro* fermentacijom zabilježeni su slučajevi formiranja novih metabolita tijekom odvijanja enzimskih reakcija; primjer su formirani enterolignani<sup>2</sup> enterolaktoni i enterdioli. Ovi spojevi su formirani iz biljnih lignana putem mikroorganizama iz crijeva. Obzirom na klorogeničnu kiselinu iz početnog materijala, nastaju i pojedini metaboliti kroz mikrobiotu crijeva kao što je kofeinska kiselina te izomerne forme hidroksifenilpropionske kiseline. Najzastupljeniji seskviterpenski laktoni u ovoj biljnoj vrsti su dehidrocinaropikrin, grosheimin i cinaratriol. Za seskviterpenske laktone i polifenole prisutne u artičokama izrazito su bitni okolišni uvjeti, način skladištenja nakon samog uzgoja, uvjeti rasta i analiza biljnog tkiva. (13)

### 1.2.3. Biološka aktivnost seskviterpenskih laktone

Poznato je kako izoprenoidi formiraju najraznovrsniju skupinu sekundarnih metabolita, s preko 35 000 poznatih struktura, od kojih većina ima biološke aktivnosti, osobito seskviterpenski laktoni sintetizirani iz porodice *Asteraceae*. Posljednjih godina, farmaceutska industrija razvija sve veći broj anti-tumorskih lijekova baziranih na seskviterpenskim laktonima. Osim klasičnih, do sada poznatih struktura, počinju se istraživati i neobični laktoni s novim ugljikovim kosturom koji su izolirani različitim metodama i analizom prirodnih spojeva posebice plinskom kromatografijom, nuklearnom magnetskom rezonancijom, te proton magnetskom rezonancijom (NMR)-spektroskopijom. (16)

---

<sup>2</sup> metaboliti iz prehrambenih lignana koji nastaju u probavnom sustavu

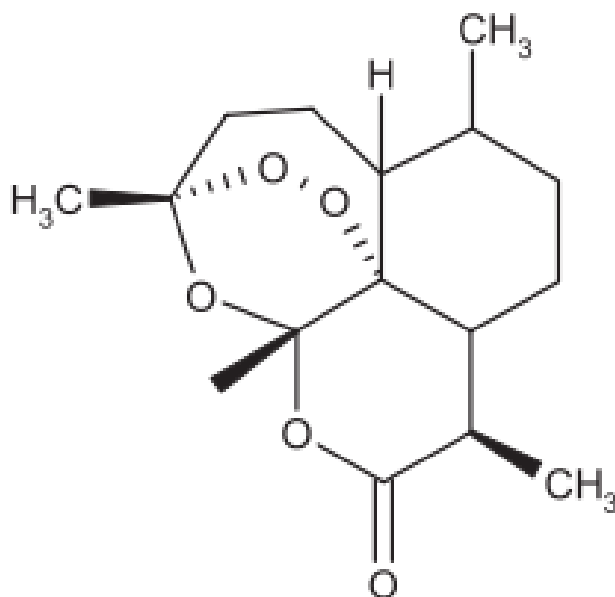
### 1.2.3.1. Antitumorska i citotoksična aktivnost seskviterpenskih laktona

Biljni ekstrakti koji posjeduju antitumorsku aktivnost postali su značajni u posljednjem desetljeću. Za preko 50 seskviterpena smatra se da imaju znatan potencijal kao inhibitori rasta velikog broja modela tumora. (17) Antitumorska aktivnost SL-a je prisutna kod različitih tipova stanica vezanih za različite tipove tumora primjerice gliome, grudi, jajnika, gušterače ili kod leukemije. Derivati artemisinina su pogodni za liječenje karcinome grkljana, melanome te su korišteni u fazama I i II kliničkih studija o raku dojke i tumorskim stanicama kod raka pluća. Derivati tansigargina su također bili učinkoviti u prvoj fazi kliničkih ispitivanja raka prostate i bubrega. Veza strukturne aktivnosti SL-a s njihovom citotoksičnošću zapravo se temelji na prisutnosti  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -laktonskog dijela molekule, Michaelovog akceptora koji reagira s biološkim nukleofilima formirajući stabilne spojeve. Većina poznatih organizama imaju enzime s cisteinom te se njihova sulfhidrilna skupina navodi kao meta alkilirajućih strukturnih elemenata. Promatrajući germakranolide navodi se da dvostruka veza između C<sub>5</sub> i C<sub>6</sub> ugljika reducira citotoksičnost u svim stanicama, dok ga epoksidna grupa povećava. Ta skupina u bočnom lancu na C<sub>9</sub> ugljiku povećava antileukemijski efekt. Postojanje konjugiranih estera predstavlja Michaelov akceptor koji omogućuje formiranje više produkata s biotiolima. Zajedničko svim seskviterpenskim laktovima jest to da što je veći broj alkilacijskih aktivnih centara, značajnija je i citotoksična aktivnost. (18)

<b>Spoj</b>	<b>Izvor spoja</b>
<b>ridentin</b>	<i>Artemisia sp.</i>
<b>partenolid</b>	<i>Ambrosia confertiflora</i>
<b>liatrin</b>	<i>Liatris sp.</i>
<b>eupaklorin acetat</b>	<i>Eupatorium sp.</i>
<b>plenolin</b>	<i>Baileya pleniradiata</i>
<b>helenalin</b>	<i>Helenium autumnale</i>
<b>aromaticin</b>	<i>Helenium aromaticum</i>

**Tablica 1.** Neki od seskviterpenskih laktova koji imaju antitumorsku aktivnost (17)

Derivati artemisininina (Slika 6.) kao što je dihidroartemisinin mogu formirati visoko reaktivne slobodne radikale u prisutnosti željezovih ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iona. (19) Artemisinin je neobičan seskviterpenski lakton endperoksid izoliran kao aktivni spoj biljke koja se koristi u liječenju malarije *Artemisia annua* L. (20) Ti derivati su značajni sastojci nekih lijekova za terapiju protiv malarije. Osim toga, posjeduju i farmaceutska svojstva kao što su antimikrobna, antituberkulozna, antitumorska i ujedno su dobri kandidati za sastojke lijekova protiv tumora. Artemisinin ima i neke nedostatke kao što je kratak poluživot, lošu topljivost i ograničenu bioraspodjeljivost rezultirajući s niskom aktivnošću prema stanicama raka što se može poboljšati hibridizacijom i uz to reducirati nuspojave. Posljednjih godina, veliki broj ovakvih hibridiziranih spojeva pokazali su se izvrsnim u in vivo i in vitro aktivnosti protiv vrsta raka osjetljivih i otpornih na lijekove zbog čega se mogu smatrati potencijalnim antitumorskim sredstvima. (19)



**Slika 6.** Kemijska struktura artemisininina (20)

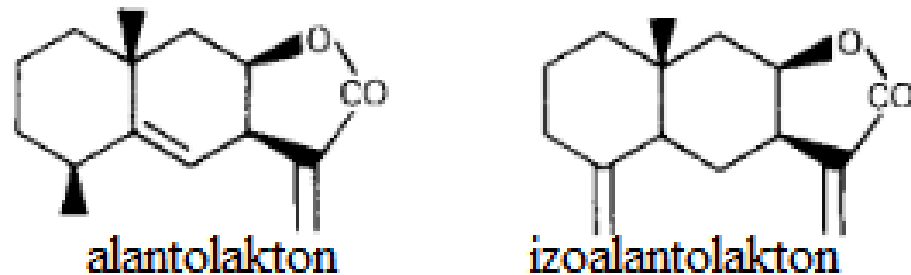


### 1.2.3.2. Antibakterijska i antifungalna aktivnost seskviterpenskih laktona

Biljke, kao i životinje moraju spriječiti napade bakterija. Česta su meta napada patogena te su podložniji infekcijama zbog sesilnog načina života, stoga kao način obrane od napada proizvode niz spojeva koji im omogućavaju obranu od napada gljivica, bakterija i virusa. Ti spojevi su najčešće alkaloidi, fenoli i terpenoidi. U porodici *Asteraceae*, seskviterpenski laktoni su jedan od glavnih biološki aktivnih komponenti takve obrane. Njihova uloga značajna je u sprječavanju mikrobnog napada, na način da dovode do narušavanja stanične membrane mikroba, učinkom koji se može pripisati polarnim skupinama ovih anti-mikrobnih spojeva koji narušavaju fosfolipidnu membranu. Od posebnog značaja su fitoaleksini kao odgovor na infekciju. Oni se stvaraju u stanicama koje su pod direktnim stresom. Na ovaj način stvara se značajan mehanizam obrane biljaka, smanjujući rast invazivnih patogena dok seskviterpenski laktoni sprječavaju širenje infekcije na površini čineći prvu liniju obrane. Iako postoji širok spektar antifungalnih seskviterpenskih laktona, mnogi mikrobi su otporni ili im se čak povećava rast kao odgovor na SL-e pa je konstantno prisutan kompleksan sustav koji čine vrste koje se prilagođavaju pojedinim tipovima seskviterpenskih laktona. (7) Ovi spojevi pokazuju osobito dobru antimikrobnu aktivnost u odnosu na gram-pozitivne bakterije kao što su *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*. Postojanje  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -laktonske skupine ( $\alpha$ M $\gamma$ L) vezano je za njihova antimikrobna svojstva ali su istraživanja pokazala da  $\beta$ -nesupstituirani ciklopentenonski prsten doprinosi antimikrobnoj aktivnosti SL-a i ujedno je neovisan o postojanju ili odsustvu  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -laktonske skupine. Ove nabrojane skupine nisu jedini čimbenici o kojima može ovisiti antimikrobna aktivnost, također ulogu imaju i dodatne skupine i njihove pozicije na ugljikovodičnom lancu. (21) Napolarni ili slabo polarni spojevi smatraju se više bioaktivnim. Za seskviterpene iz skupine guaianolida smatra se da imaju najveću antimikrobnu aktivnost. (7) Antibakterijska aktivnost seskviterpenskih laktona potvrđena je kod vrsta kao što su ksantin, iz *Xanthium pennsylvanicum*, zatim cnicin iz *Cnicus benedictus*, mikanolid i dihidromikanolid iz *Mikanie monagasensis*, kao i partenolid iz *Chrysanthemum parthenium*. (21)

Utjecaj seskviterpenskih laktona na rast četiri roda gljiva (*Colletotrichum*, *Fusarium*, *Botrytis* i *Phomopsis*), ukazao je da najznačajniji spojevi sadrže  $\alpha$ M $\gamma$ L skupinu, no to

ne uvjetuje citotoksičnost. Helenin (Slika 7.), mješavina dva izomera seskviterpenskikh laktona alantolaktona, izoalantolaktona i izohelenin (iz roda *Inula elenium*), su najpoznatiji SL-i s antifungalnom aktivnošću, s tim da helenin pokazuje i antimikrobna svojstva osobito prema gram-pozitivnim bakterijama. (21)



**Slika 7.** Kemijska struktura seskviterpenskikh laktona koji čine helenin (21)

### 1.2.3.3. Protuupalna svojstva seskviterpenskikh laktona

Seskviterpenski laktoni posjeduju i protuupalna svojstva koja mogu biti od iznimne koristi u liječenju kroničnih bolesti. Glavni mehanizam protuupalne aktivnosti je inhibicija ekspresije nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B<sup>3</sup> je protein koji regulira preko 150 gena i dio je ljudskog imunološkog sustava. On ujedno kontrolira reakciju ostalih utjecaja kao što su citokina, upalnih molekula, adhezijskih molekula itd. Inhibicija NF- $\kappa$ B smanjuje upalnu reakciju i suzbija rast raka. Smatra se da su guaianolidi snažni inhibitori NF- $\kappa$ B faktora.

Neki od SL-a s biološkim aktivnostima uključuju tapsigargin, specifični inhibitor intrastanične kalcijeve pumpe kao i pikrotoksini, koji antagoniziraju GABA kloridne kanale u centralnom živčanom sustavu te posjeduju konvulzivne, insekticidne i antiparazitske aktivnosti.

Artemisinin inhibira izlučivanje faktora nekroze tumora alfa (TNF)- $\alpha$ , interleukina-(IL-) 1 $\beta$  i IL-6 u ovisnosti o dozi, djelujući protuupalno na forbol-miristatacetat- (PMA-) inducirane THP-1 monocite. (22) Pored ostalih osobitosti, ovaj spoj odlikuje i visoka

---

<sup>3</sup> nuklearni faktor kapa B

selektivnost prema malarijskim parazitima. Kemijska reakcija kojom artemisinin i njegovi derivati reagiraju s biomolekulama razlikuje se od većine seskviterpenskikh laktona i uključuje selektivni unos inficiranih eritrocita te potom interakciju sa heminom, porfirinom koji sadrži željezo, nastalim kao produkt probave iz hemoglobina parazita. (6)

Malarija je bolest koja predstavlja globalni problem ugrožavajući živote 300-500 milijuna ljudi. Danas znamo da je to vektorska zarazna bolest uzrokovana parazitom Plasmodia. Postoje četiri tipa *Plasmodium* vrsta : *P. falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* i *Plasmodium ovale*, dok je vektor prijenosnik komarac koji širi bolest, vrste *Anopheles*, a sama je bolest raširena u području Amerike, Azije i Afrike. Za liječenje bolesti zaslužni su antimalarici iako pojedine vrste parazita postaju otporne na iste stoga se sve više u liječenju koriste terapije bazirane na artemisininu. Biljka koja se koristi u medicinske svrhe *A. annua* poznati je izvor seskviterpenskog laktona artemisinina te se koristi u ovoj vrsti liječenja. Za antimalarijsku aktivnost ovog spoja zaslužna je 1,2,4-trioksanska prstenasta struktura. Može se koristiti za liječenje infekcija uzrokovanih *P. falciparum*. Njegovi polusintetski analozi kao što su artemeter (metil-eter dihidroartemisinina) poboljšavaju farmakokinetička svojstva i također su u uporabi pri kliničkim istraživanjima i preporučeni su od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) osobito u liječenju vrsta malarije otpornih na postojeće lijekove. Smatra se da se mehanizam djelovanja ovog seskviterpenskog laktona sastoji od dva dijela. U prvom (aktivacija) željezo katalizira cijepanje endoperoksidnog mosta i oslobađanje slobodnih radikala. U drugom (alkilacija), slobodni radikali formiraju kovalentne veze s proteinima parazita. Visoko reaktivne molekule utječu na proteine u Plasmodiumu te se smatra da naposljetku ubija mikroorganizme. Ostali seskviterpenski laktoni s antimalarijskom aktivnošću su komponente listova i cvjetova *A. gorgonum*, koji su fitokemijski istraženi i izolirani, a koji spadaju u skupine guianolida (11 vrsta) i germakranolida (2 vrste). (20)

#### 1.2.3.4. Kontaktni alergijski dermatitis

Seskviterpenski laktoni su kemijski spojevi koji se nalaze u nekoliko vrsta biljaka koje uzrokuju kontaktni alergijski dermatitis (Slika 8.). Budući da je porodica *Asteracea* ili drugim imenom *Compositae* i njezine biljne vrste zaslužna za većinu slučajeva

dermatitisa, "Compositae dermatitis" i "Seskviterpenski dermatitis" postali su sinonimi. Više od 200 od oko prilike 25 000 vrsta iz porodice *Compositae* uzrokom su kontaktnog alergijskog dermatitisa. Gotovo polovica seskviterpenskih laktona iz ove porodice u mogućnosti je stvarati hipersenzitivnost. SL kao alergeni pronađeni su u skupinama eremofilanolida, germakranolida, eudesmanolida, guaianolida, pseudoguaianolida i ksantanolida. Kontakt se odvija kada se niskomolekularni spoj haptent kovalentno veže za protein (protein receptor) i formira antigen sposoban za senzibilizaciju limfocita. Ako se  $\alpha$ -metilenska skupina seskviterpenskih laktona reducira ( $R=CH_2$  na  $R-CH_3$ ), alergičnost se gubi, budući da više nije nezasićena i osjetljiva na nukleofilni napad. Redukcija ove skupine alantolaktone, SL-a pronađenog u porodici *Compositae*, konjugacijom s određenim aminokiselinama kao što su imidazolni prsten histidina, amino skupina lizina ili sulfhidrilna skupina cisteina, čini je imunološki neaktivnom. Postoji još faktora koji utječu na stvaranje alergijske reakcije osim postojanja  $\alpha$ -metilenske skupine jer nisu svi seskviterpenski laktoni s ovom skupinom alergeni. Lipofilnost pomaže senzibilizaciji olakšavajući apsorpciju i vezivanje za Langerhansove stanice, nedostatak oksigeniranih supstituenata u blizini laktonskog prstena stvara prostor za nukleofilni napad na  $\alpha$ -metilenskoj poziciji. (23)

Seskviterpenski lakton iz skupine pseudoguaianolida, partenin, smatra se glavnim alergenom iz roda *Parthenium hysterophorus*. Izrazito je agresivna biljka te je alergijski kontaktni dermatitis potaknut ovom biljkom postao veliki zdravstveni problem za opću populaciju. Još uvijek nije objašnjeno zašto su muške osobe sklonije ovoj bolesti pri kontaktu s ovom biljkom u odnosu na ženske osobe i djecu. Pored ostalih biljnih vrsta koje razvijaju bolest u kontaktu s biljkama, navodi se rod *Frullania* koja često uzrokuje alergijski dermatitis kod šumara. Seskviterpenski lakton, frulanolid, identificiran u ovim biljkama pokazuje svojstva senzibilizatora. Mnoge vrste *Chrysanthemum Costus Absolute*, sastojak parfema dobiven iz roda *Saussurea lappa*, uzrokom su dermatitisa i u sastavu svih pronađeni su seskviterpenski laktoni. Svi poznati SL-i sadrže exocikličku  $\alpha$ -metilensku funkciju koja može konjugirati sa sulfhidrilnim skupinama proteina u stanicama putem Michaelove adicije i formirati antigene sposobne za stvaranje alergijske reakcije. (17)

#### 1.2.4. Citotoksičnost *Centaurea* vrsta i njihovih ekstrakata

Rod *Centaurea* pripada porodici *Asteraceae*, i sadrži više od 500-600 vrsta koje su široko rasprostranjene po cijelom svijetu. Biljke ovog roda imaju različita biološka svojstva, antimikrobna, antifungalna, protuupalna, antioksidacijska, antiplazmodijalna, citotoksična, antitumorska, antihepatotoksična i druga. (24,25) Veliki broj vrsta koriste se pri liječenju različitih tegoba npr. dijabetes, dijareja, reumatizam, malarija, hipertenzija i slično. Skupina spojeva koja je najviše istražena su seskviterpensi laktoni a alkaloidi najmanje. Seskviterpensi laktoni klorohisopifolin A, cinaropikrin i deacilcinaropikrin iz ovog roda imaju citotoksična i citostatična svojstva. Seskviterpensi laktoni izolirani iz djelova biljaka *C. zuccariniana*, *C. achaia* i *C. thessala* imaju citotoksična svojstva na pet ljudskih staničnih linija. (26,27)



**Slika 8.** *Centaurea triumphetii* i *Centaurea jacea* (Autor : Ivana Carev)

*In vitro* istraživanja citotoksičnosti<sup>4</sup> biljnih ekstrakata prvi su korak u istraživanjima antitumorskih spojeva iz prirodnih izvora. (28) Citotoksičnost predstavlja mogućnost pojedinih spojeva da induciraju staničnu smrt. (29) Osjetljivost stanica na toksičnost u *in vitro* okolini veća je od osjetljivosti u *in vivo* okolini odnosno u ljudskom organizmu, stoga toksičnost materijala *in vitro* rezultira i toksičnošću u *in vivo* okolini. (30)

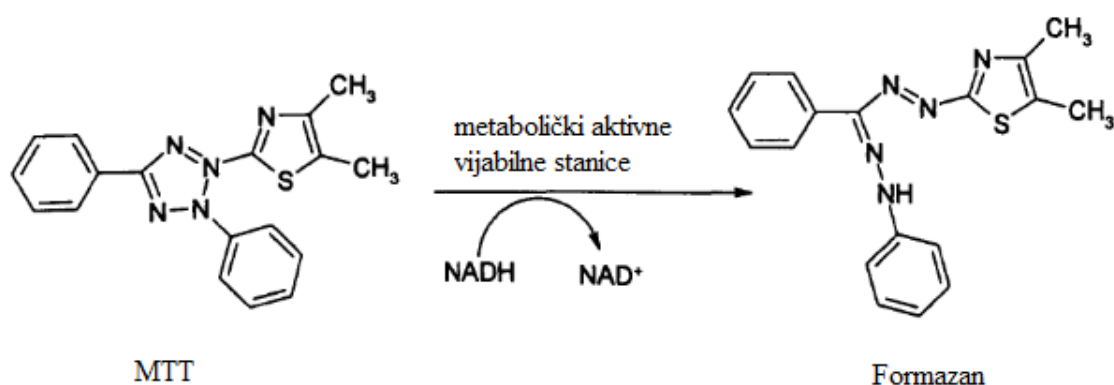
---

<sup>4</sup> *In vitro* testiranje je pokušaj simuliranja *in vivo* okruženja u strogo kontroliranim uvjetima

Tretiranje stanica citotoksičnim spojem dovodi do određenih staničnih stanja, a to mogu biti :

1. nekroza – nastaje kao posljedica znatnijeg oštećenja stanice koja ne može kontrolirati ravnotežu tekućine i iona stoga bubri i gubi se cjelovitost staničnih organela
2. apoptoza - aktivacija genetski programirane stanične smrti tj. ravnoteža između gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom života (31)

Test citotoksičnosti je metoda kojom je moguće otkriti kancerogene spojeve kao i ostale koji su rizični za ljudsko zdravlje. Temelji se na tretiranju živih stanica testnom kemikalijom pri čemu se u obzir uzima narušenost stanične membrane te se primjenjuje boja koja prodire u stanicu i vizualizira njezinu unutrašnjost. (32) Najčešći test koji se koristi za testiranje citotoksičnosti je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test). To je kalorimetrijska metoda bazirana na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan (Slika 9.). U nekim novijim izvedbama koriste se supstrati tzv. "u vodi topljivih tetrazolijevih soli" (eng. Water soluble tetrazolium salt ,WST-1) koji se metaboliziraju u produktu koji je topljiv u mediju za uzgoj stanica. Očitana apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica stoga se preživljenje stanica izražava kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih stanica. (33)



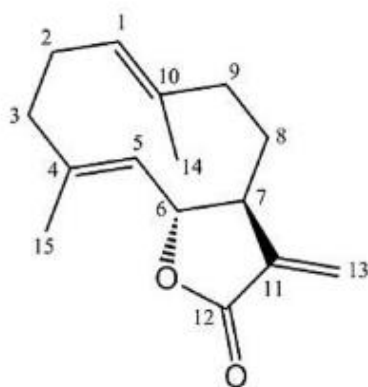
**Slika 9.** Transformacija MTT-a (26)

Strukture citotoksičnih seskviterpenskih laktona su različite: pokazuju različitosti u ugljikovom skeletu i sadrže različite funkcijske skupine. Smatra se da je za citotoksičnu aktivnost ovih spojeva najzaslužnije postojanje  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -laktona. (34) Kad govorimo o njihovoj toksičnosti, možemo ih podijeliti u tri grupe : alkilansi (npr. partenolid), ne-alkilansi (npr. tapsigargin) i neurotoksini (npr. tutin), pokazujući svoj toksični efekt kroz različite mehanizme: proteinska alkilacija, DNA alkilacija, antagonizam GABA<sub>A</sub> receptora ili indukcija hipersenzitivne reakcije. Većina alkilansa ponaša se kao elektrofil, reagirajući sa SH proteinskim reziduama u proteinima. (5)

Posljednjih godina, *Centaurea* rod privukao je iznimno zanimanje istraživača temeljem svojih kemijskih svojstava. Citotoksična aktivnost seskviterpenskih laktona izoliranih iz dijelova biljaka ovog roda na pet ljudskih staničnih linija : raka debelog crijeva (DLD1), glioblastomskim stanicama (SF268), tumorske stanične linije (MCF7), stanice karcinoma pluća (H460) , stanična linija karcinoma jajnika (OVCAR3) i spoj 8 $\alpha$ -O-dehidromelitensin pokazuje učinak inhibicije rasta prema OVCAR3 stanicama. *C. calolepis* sadrži spoj cnicin, čija je aktivnost citotoksična prema ljudskim malignim stanicama. (28) Dva seskviterpena koja imaju značajnu citotoksičnu aktivnost jesu arktiopikrin te 8-O-(4-hidroksi-3-metilbutanoil)-salonitenolid, s tim da arktiopikrin ima značajniju aktivnost. (26)

### 1.2.5. Kostunolid

Kostunolid (Slika 10.) je bezbojan kristalni prah molekulske formule C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> i molekulske mase 232,318 g/mol. Izoliran je iz velikog broja biljnih vrsta kao što su *Saussurea lappa*, *Aucklandia lappa* Decne, *Michelia floribunda*, *agnolia grandiflora*, *Podachenium eminens*, *Magnolia sieboldii*, *Cosmos pringlei*, *Laurus nobilis*, *Laurus novocanariensis*, *Magnolia kobus*, *Magnolia ovata* i drugih. (35) Kostunolid je spoj koji, zajedno s hehidrokostus laktonom, inhibira efekt suzbijanja funkcije citotoksičnih limfocita T, stvaranje dušikovog oksida (NO) i ekspresije antigena virusa hepatitisa B. Smatra se spojem s in vitro aktivnošću protiv parazita *Trypanosoma brucei*, patogena koji uzrokuju afričku tripanosomijazu (HAT), poznatiju kao "bolest spavanja" koja se prenosi ubodom muhe ce-ce (tsetse muhe) i ukoliko se ne liječi završava smrtnim ishodom. (41)



**Slika 10.** Kemijska struktura kostunolida (36)

Kostunolid odlikuje veliki broj bioloških aktivnosti kao što su antitumorska, protuupalna, antioksidacijska, antihepatična i sl. Istraživanja su pokazala kako ima dobar terapijski efekt prema velikom broju tipova raka. Sadrži  $\gamma$ -laktonski prsten s exocikličkim metilenom konjugiranim s karbonilnom grupom. Zbog dvostruke veze  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -butirolaktona, moguća je uloga elektrofilne skupine u reakciji s nukleofilnom skupinom u nekim esencijalnim grupama aktivnih mjesta u organizmu, npr. veze  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -butirolakton može reagirati s aminokiselinama ili peptidima (kao što su L-cistein, glutation) i nekim enzimima koji sadrže sulfhidrilnu grupu (kao što je fosfofruktokinaza, glikogen sintaza<sup>5</sup> i DNA polimeraza u reakciji Michaelove adicije). Putem ove reakcije između  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -butirolaktona i sulfhidrilne skupine (-SH), enzim koji ima značajnu ulogu u dijeljenju stanica je aktiviran i uzrokuje prikladnu reakciju koja može biti potencijalni citotoksični mehanizam seskviterpenskih laktona koji sadrže ovaj prsten (kostunolid, partenolid, eupatolid, helenalin itd.) (36)

Antimikrobna svojstva kostunolida prema *Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium avium* upućuju na njegovu potencijalnu primjenu kao antituberkuloznog lijeka. Nadalje, antimikrobna aktivnost pokazana je i prema *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* bakterijama te inhibira rast *H. pylori*, obično vezane za gastro i duodenalni ulkus. Antifungalna aktivnost pokazana je prema *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae* i *Colletotrichum gleosporioides*, a antivirusno svojstvo kostunolida bilo je vidljivo u inhibiciji ekspresije hepatitis B antigena (HbsAg) u humanim hepatoma Hep3B stanicama. (37) :

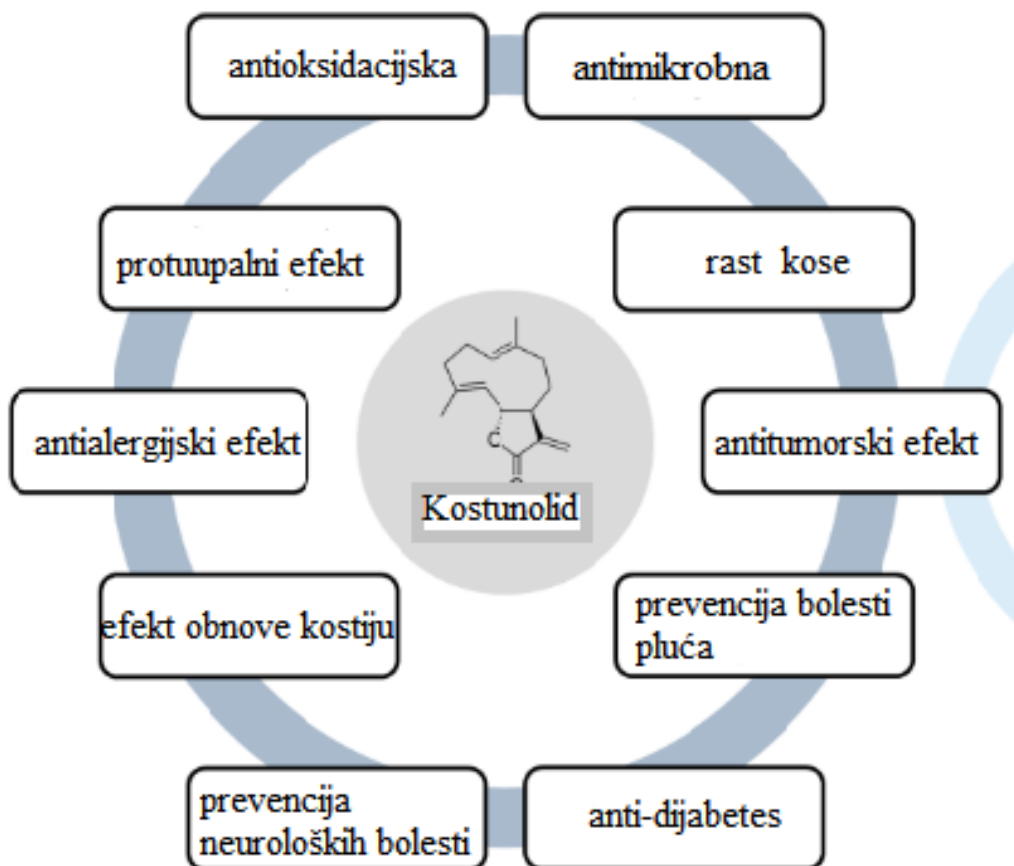
<sup>5</sup> enzim koji u stanicama katalizira reakciju povezivanja molekula glukoze u glikogen



<b>Efekt</b>	<b>Testirani organizmi</b>
<b>Antibakterijska aktivnost</b>	<i>M. tuberculosis</i>
	<i>S. aureus</i>
	<i>E. coli</i>
	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>M. avium</i>
	<i>H. pylori</i>
<b>Antifungalna aktivnost</b>	<i>T. simum</i>
	<i>T. rubrum</i>
	<i>Epidermophyton floccosum</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Carvulari lunata</i>
	<i>Colletotrichum acutatum</i>
	<i>Colletotrichum fragariae</i>
<i>C. echinulata</i>	
<b>Antivirusno djelovanje</b>	<i>Hepatitis B virus (HBV)</i>

**Tablica 2.** Antimikrobne aktivnosti kostunolida (37)

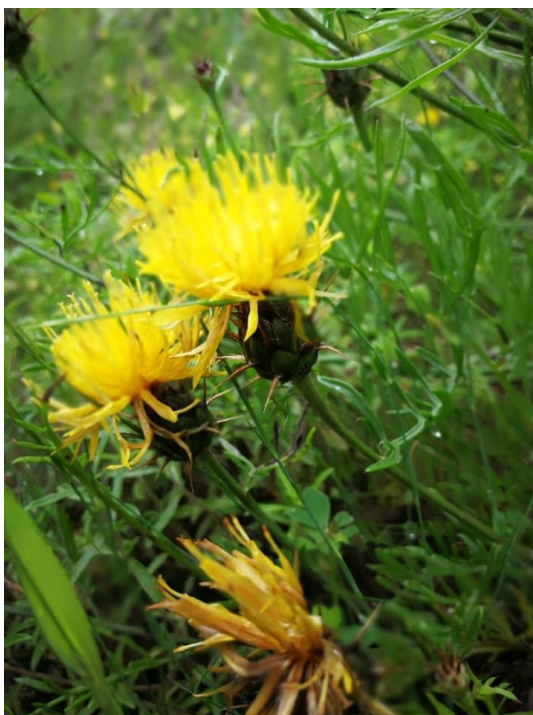
Upotreba biljnih produkata u kozmetičke svrhe, osobito u prevenciji gubitka kose ili promoviranju rasta kose dugo se prakticira. Biljne terapije korištene kao promotori rasta kose trebale bi imati nisku toksičnost, biti jednostavne za korištenje te imati nisku cijenu. U današnje vrijeme sve više se istražuju njihove osnove te je potvrđen pozitivan efekt kostunolida u rastu kose. (37) Alopecija je poznatija kao termin za gubitak kose često prisutan kod muškaraca, odlikovana genetskom predispozicijom ili lošim nutritivnim balansom, korištenjem određenih lijekova može dovesti do hormonalnog disbalansa koji rezultira gubitkom kose. Kostunolid je ispitan kao seskviterpenski lakton koji utječe na proliferaciju stanica ljudskih folikula dlake (hHFDPC) te se pokazao uspješnim, a ispitivanjem njegovog inhibicijskog efekta na aktivnost 5 $\alpha$ -reduktaze, enzima koji katalizira pretvaranje testosterona u androgeni metabolit dihidrotestosterona gdje je pokazao 50%-tnu inhibiciju zajedničkom primjenom s testosteronom. (38)



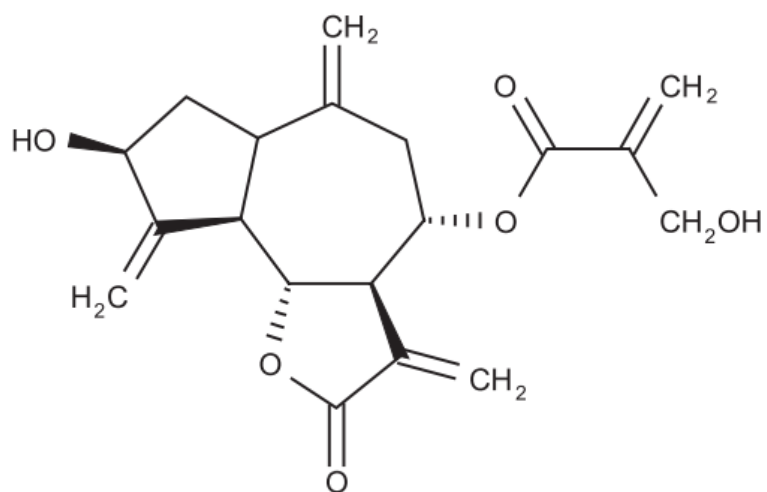
**Slika 11.** Biološke aktivnosti kostunolida (37)

### 1.2.6. Cinaropikrin

Cinaropikrin, gorki sastojak artičoka, prvi put je izoliran 1960.-te godine iz vrste *Cynara scolymus*. On doprinosi oko 80%-tnom karakterističnom okusu artičoka što je povezano s aktivacijom senzora za gorčinu. Listovi artičoka smatraju se efektivnim u liječenju akutnog gastritisa, a cinaropikrin tome osobito pridonosi. (12,39) Spoj je kasnije pronađen i u ostalim vrstama porodice *Asteraceae*, kao što je *Centaurea solstitialis* L.(Slika 12.), *Hemisteptia lyrata* B. i *Saussurea calcicola*. Spada u skupinu guaianolida, seskviterpenskih laktona, te sadrži 5-7-5 triiklički okvir sa šest ugljikovih stereocentara, četiri exo-olefina i dvije hidroksilne skupine (Slika 13.). Odlikuju ga biološke aktivnosti kao što su protuupalna, supresija NF- $\kappa$ B faktora te aktivacija receptora za gorčinu.



**Slika 12.** *Centaurea solstitialis* (Autor : Ivana Carev)



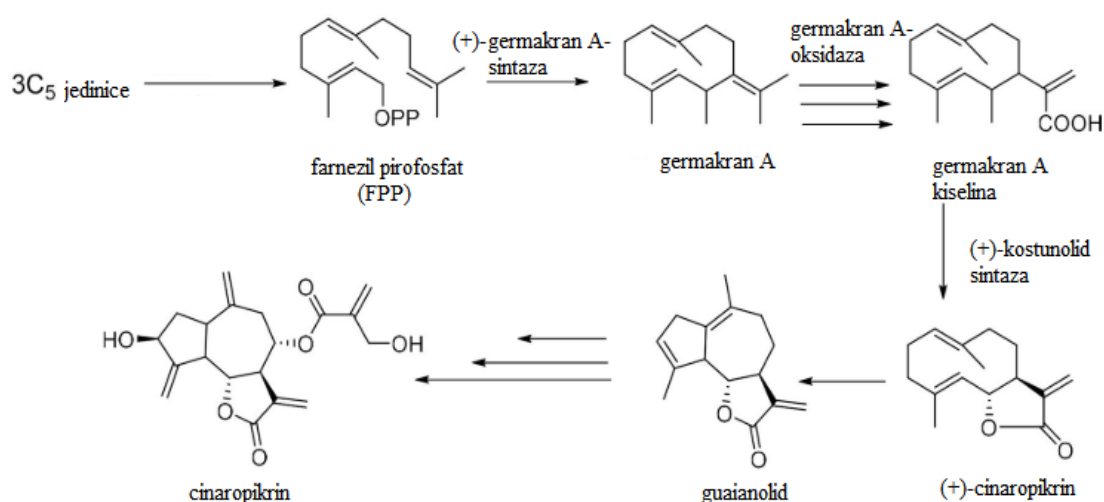
**Slika 13.** Kemijska struktura cinaropikrina (40)

Starenje kože je karakterizirano pigmentacijom, boranjem kože i potaknuto nizom bioloških faktora, a najčešći je ultraljubičasto zračenje. Time dolazi do narušavanja vitalnih makromolekula kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline u keratinocitama, a cinaropikrin se pokazao korisnim u prevenciji starenja kože u *in vivo* eksperimentima koji su se izvodili.

Cinaropikrin je ireverzibilni inhibitor bakterijskog enzima MurA<sup>6</sup> što je od velike važnosti za bakterijske stanice obzirom da je enzim odgovoran za prvi korak u citoplazmatskoj biosintezi peptidoglikanskih prekursor molekula. On se kovalentno veže za tiolnu skupinu cistein115 (Cys115) putem Michaelove adicije. Nezasićeni esterski dio lanca cinaropikrina jako je važan za inhibiciju MurA za razliku od  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -butirolaktonske skupine i exo-cikličkog metilenskog dijela u monocikličkom dijelu cinaropikrina, koja ne igra veliku ulogu.

Osim niza uloga koji ovaj spoj ima, značajan je i antifeedant predstavljajući ekološki siguran spoj za kontrolu insekata, pokazao se korisnim za niz vrsta leptira.

Najveća koncentracija cinaropikrina nalazi se u lišću pa se smatra da je to mjesto gdje je sintetiziran i pohranjen, akumulira se u trihomima. Formiran je iz tri izoprenske jedinice i sintetiziran mevalonatnim putem prikazanim na slici 14. Izoliran je iz velikog broja biljnih vrsta; neke od njih potječu iz Centaurea vrsta, a to su: *C. ptosimopappoides*, *C. bella*, *C. solstitialis*, *C. hermannii*, *C. scabiosa*, *C. tharacica*, *C. americana*, *C. ragusina*, *C. repens*. (39)



**Slika 14.** Biosintetski put cinaropikrina. Ciklizacija farnezil pirofosfata (FPP) katalizirana je (+)-germakran A sintazom (GAS) čime se stvara germakran A koji je podvrgnut trima stupnjevima oksidacije kataliziranim germakran A oksidazom stvarajući željenu kiselinu koja se potom hidrolizira putem (+)-kostunolid sintaze u nestabilni međuproduct koji se podvrgava neenzimskoj laktonizaciji dajući kostunolid, prekursor za stvaranje cinaropikrina (39)

<sup>6</sup> uridin-difosfat N-acetilglukozamin-3-o-enolpiruvil-transferaza

### 1.3. Mehanizam djelovanja seskviterpena

Poznato je kako seskviterpenski laktone sadrže niz bioloških i farmakoloških aktivnosti kao što su antimikrobna, antitumorska, protuupalna, efekt na živčani i kardiovaskularni sustav i slično. Te biološke aktivnosti vezane su za  $\alpha,\beta$ -nezasićenu karbonilnu strukturu kao što je  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton, odnosno  $\alpha,\beta$ -nezasićeni ciklopentanon ili konjugirani ester. Ovi strukturni elementi reagiraju kao nukleofili, posebno cistein sulfhidrilne skupine putem reakcije Michaelove adicije. Tiolne skupine kao što su cisteinske rezidue u proteinima, zapravo su ciljana mjesta seskviterpenskih laktone. Razlika u aktivnosti između individualnih seskviterpenskih laktone može se objasniti različitim alkilacijskim strukturnim elementima no utjecaj na aktivnost mogu imati i ostali faktori kao što je lipofilnost, molekularna geometrija i slično.

Seskviterpenski laktone moduliraju veliki broj upalnih procesa, primjerice oksidativnu fosforilaciju, agregaciju trombocita, otpuštanje serotonina. (42)

Inhibicija signalnog puta nuklearnog faktora  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) jedan je od mehanizama zaslužan za antitumorska svojstva seskviterpenskih laktone. Ovaj faktor u tumorskim stanicama inhibira apoptozu, proliferaciju stanica, transformaciju istih, metastaziranje, otpornost na kemoterapiju i radioterapiju. Sastoji se od dvije podjedinice; p50 i p65 u normalnim okolnostima, a koje inhibira citoplazmatski inhibitor  $\kappa B$  (I $\kappa B$ ). Za vrijeme stimulacije stanica citokininima aktivira se protein-kinaza IKK $\beta$  koja uzrokuje fosforilaciju i ubikvitinizaciju<sup>7</sup> I $\kappa B$ -a te postepeno degradaciju kompleksom proteasoma rezultirajući uklanjanjem inhibicije NF- $\kappa B$  te ulaskom dimera p50 i p65 u nukleus povećavajući ekspresiju ciljanih gena. Oba spoja, cinaropiktrin kao i kostunolid pokazala su inhibiciju aktivacije ovog faktora. (39,43)

Brojna istraživanja potvrdila su pozitivan učinak kostunolida i njegove antitumorske sposobnosti osobito izražene u inhibiciji proliferacije tumorskih stanica, indukciji apoptoze i diferencijacije, inhibicije metastaziranja i rješavanju problema otpornosti na pojedine lijekove.

Mikrotubule koje se sastoje od  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulin heterodimera, glavnih sastojaka staničnog citoskeleta, imaju glavnu ulogu u različitim staničnim funkcijama kao što su unutarstanični transport, metabolizam, oblik stanica, migracije i slično. Trenutno se

---

<sup>7</sup> glavni put selektivne razgradnje proteina u eukariotskim stanicama

taksani i vinka alkaloidi koriste kao tubulin-ciljani antitumorski lijekovi te se njihov mehanizam može povezati s rekonstrukcijom i reorganizacijom mikrotubula. Kostunolid izražava selektivnost prema tubulinima te inhibira povezivanje tumorskih stanica neovisno o nuklearnom faktoru  $\kappa B$  i povećava detrozirane mikrotubule ne ugrožavajući ukupni sustav mikrotubula te u konačnici pokazuje antitumorsku aktivnost, nisku toksičnost i terapijski potencijal za tumorske terapije.

Kompleksi humane telomerase sastoje se od reverzne transkriptaze, komponente telomerase RNA i ostalih proteina ali je reverzna transkriptaza, ribonukleoprotein, glavna komponenta telomerase koja ima ulogu u staničnoj proliferaciji kao zaštitni mehanizam protiv problema s krajnjom replikacijom dodavanjem TTAGGG ponavljanja telomerama. U usporedbi s normalnim stanicama, mnoge tumorske stanice imaju visoku aktivnost telomerase što dovodi do proliferacije tumorskih stanica i razvitka malignih tumora, a još jedna aktivnost kostunolida jest regulacija reverzne transkriptaze kao i inhibicija aktivnosti telomerase pa ima potencijal u istraživanjima molekularnog mehanizma inhibicije telomerase. (44)

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Kemikalije i reagensi

Medij za stanice korišten i za razrjeđenje svih molekula kojima će se tretirati fibroblasti Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich); fetalni goveđi serum (FBS, Gibco); antibiotici dodaci mediju penicilin- streptomycin (Pen/Strep); tripsin – EDTA (0,25%) u HBSS s fenol crvenim (100 mL) (TRYPsin, TRY-3B, Capricorn Scientific); Dulbecco fosfatni pufer za pranje fibroblasta (PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich); cinaropikrin (Cayman Chemical); kostunolid (Cayman Chemical); 99.8% etilni alkohol (Lachner) za otapanje cinaropikrina; dimetil sulfoksid (DMSO, Lachner) za otapanje kostunolida; tiazol plavi tetrazolij bromid (Sigma-Aldrich); čista destilirana voda (Molecular Biology Water AccuGENE, ddH<sub>2</sub>O, Lonza) i stanice fibroblasta (Axol Bioscience).

### 2.2. Kultura stanica

Određivanje biološke aktivnosti prirodnih spojeva iz biljaka se provodi izvedbom velikog broja testova na različitim organizmima (*in vivo*) ili kulturama stanica (*in vitro*) na temelju čega se procjenjuje učinak na ljude. Kulturu životinjskih stanica možemo definirati kao pojedinačne stanice koje su izdvojene iz organa ili tkiva, a koje možemo održavati u umjetnom okolišu tj. *in vitro* uvjetima. Prvi je korak uspostavljanje primarne kulture životinjskih stanica odnosno izolacija stanica iz organizma i naciepljivanje u hranjivom mediju kao i održavanje kulture u *in vivo* uvjetima. Primarna kultura odražava uvjete primarnog okoliša i najprikladnija je za ispitivanje svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice. (33)

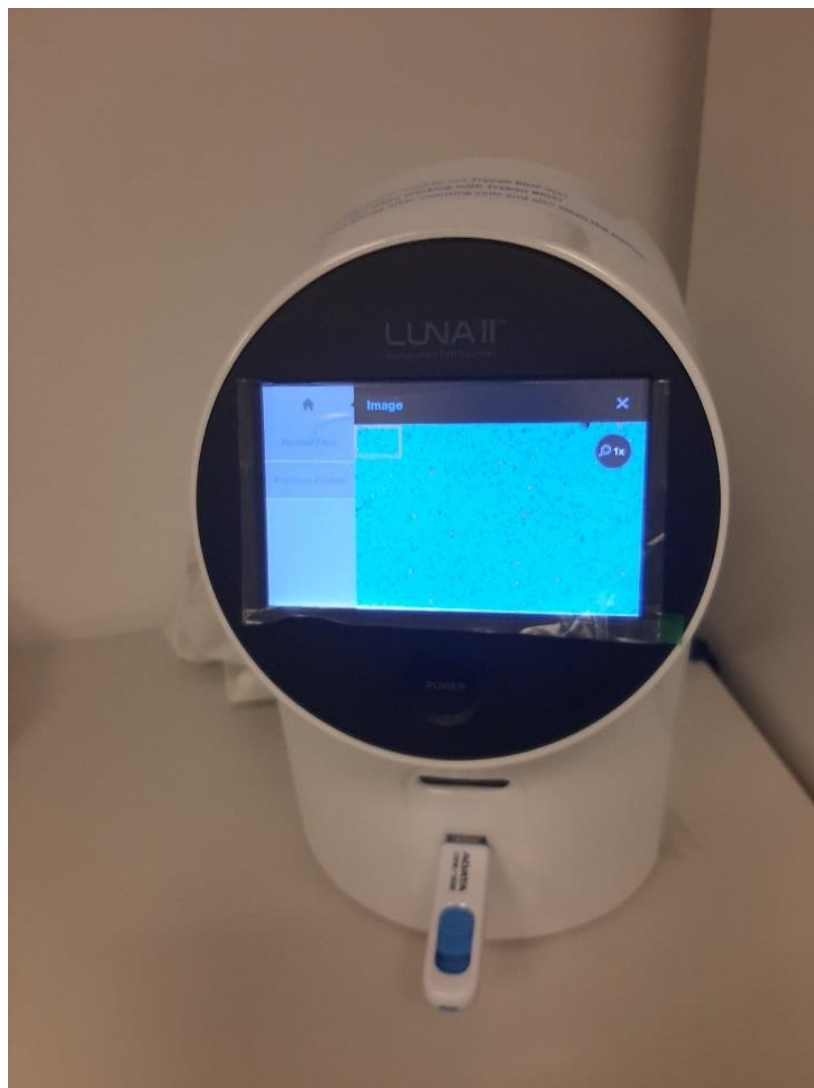


**Slika 15.** Rad u laboratoriju – kultura stanica

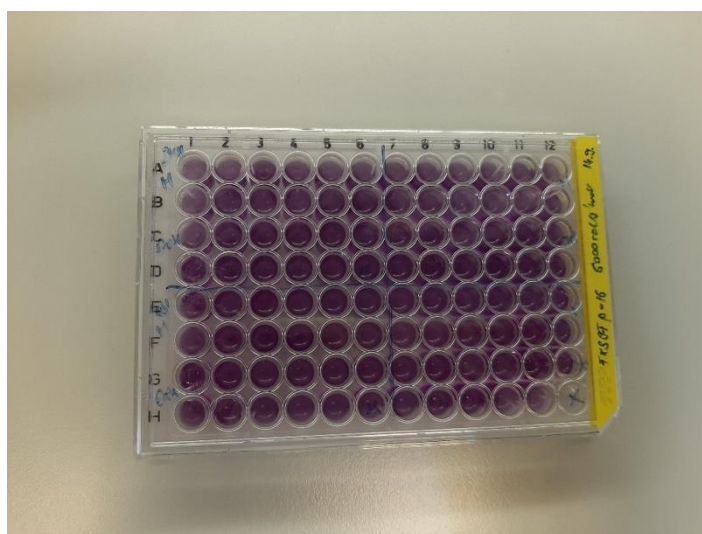
Kada primarna kultura fibroblasta dostigne konfluenciju od oko 80-100 %, stanice se tripsiniziraju (Trypsin-EDTA, 0,25 %), centrifugiraju (2300 rpm, 3 minute na +4 °C) i izbroje koristeći automatski brojač stanica LUNA-II (Logos Biosystems) (Slika 16). Nakon toga stanice se posade na mikroploču s 96 jažica s poklopcem (engl. 96-well plate with lid) (Slika 17.), 6000 stanica u svaku jažicu. Posađene stanice se inkubiraju minimalno 24 sata u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> (Slika 18.) te se koriste za trestiranje kroz 24 i 48 sata otapalima i dvama biološki aktivnim molekulama:

- Cinaropikrin je već otopljen u etanolu (1 mg u 1 mL etanola) i koncentracija molekule je 2,89 mM.
- Kostunolid je otopljen u DMSO (1 mg u 1 mL DMSO) i koncentracija molekule je 4, mM.

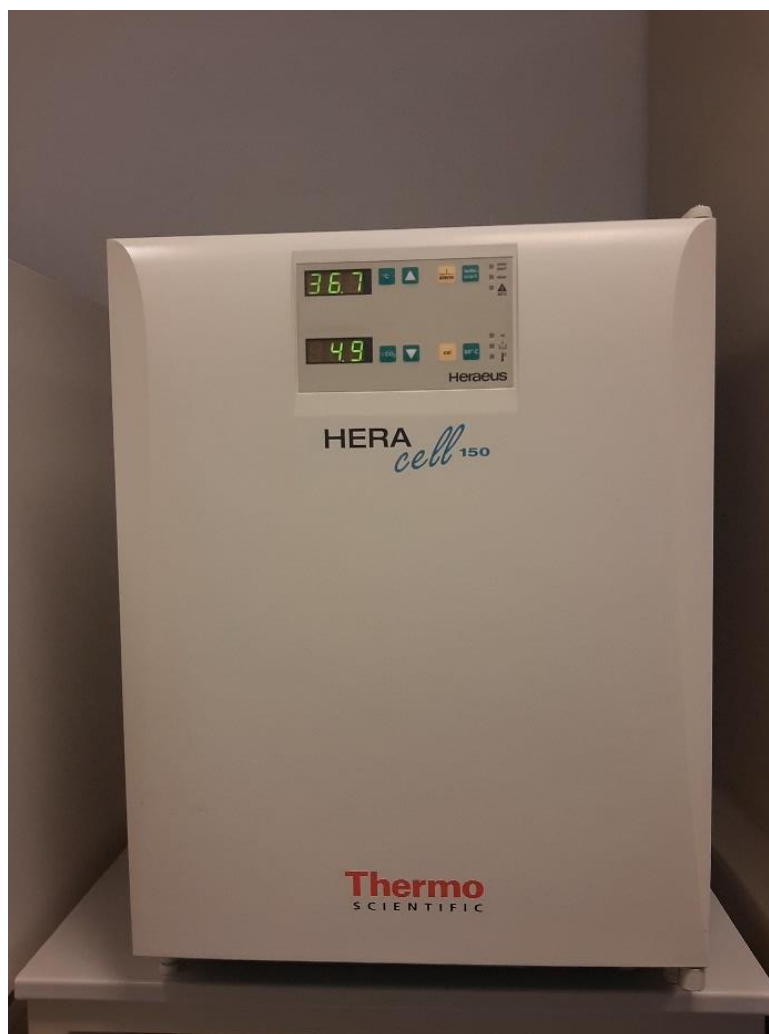




**Slika 16.** Automatski brojač stanica



**Slika 17.** Mikroploča s 96 jažica



**Slika 18.** Inkubator

Medij za fibroblaste pripremi se miješanjem 500 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 50 mL Fetal Bovine Serum (South American) i 5 mL Penicillin-Streptomycin (100x).

### 2.3. Priprema molekula i otapala

- **Cinaropikrin**

$M = 346,4 \text{ g/mol}$

$m = 1 \text{ mg}$

$V (\text{etanola}) = 1 \text{ mL}$

$c = 2,89 \text{ mM}$

100 % etanol

Prilikom tretiranja fibroblasta najveća koncentracija etanola može biti 0.1 % stoga izračunavamo kojoj koncentraciji odgovara 0.1 % etanola :

$$2,89 \text{ mM} = 100 \%$$

$$2,89 \text{ }\mu\text{M} = 0,10 \%$$

početna koncentracija cinaropikrina : 2,89  $\mu\text{M}$

početna koncentracija etanola : 0,10 %

- Priprema :

2,89  $\mu\text{M}$  : 2  $\mu\text{L}$  2,89 mM cinaropikrina + 1998  $\mu\text{L}$  DMEM

0,10 % : 2  $\mu\text{L}$  99,8% etanola + 1998  $\mu\text{L}$  DMEM

- **Kostunolid**

M= 232,3 g/mol

m = 1 mg

V (DMSO) = 1 mL

C = 4,3 mM

100 % DMSO

Prilikom tretiranja fibroblasta najveća koncentracija DMSO može biti 0,5 % stoga izračunavamo kojoj koncentraciji odgovara 0,5 % DMSO :

$$4,3 \text{ mM} = 100\%$$

$$21,5 \text{ }\mu\text{M} = 0.5 \%$$

početna koncentracija kostunolida : 21,52  $\mu\text{M}$

početna koncentracija DMSO : 0,5 %

- Priprema :

21,5  $\mu\text{M}$  : 10  $\mu\text{L}$  4.3 mM kostunolida + 1990  $\mu\text{L}$  DMEM

0,5 % : 10  $\mu\text{L}$  100% DMSO + 1990  $\mu\text{L}$  DMEM

Na titarsku pločicu dodano je nekoliko različitih koncentracija biološki aktivnih spojeva cinaropikrina i kostunolida, kao i otapala u kojima su otopljeni, te su tretirani 24 i 48 sati kako je opisano u tablici 3. i 4.

### CINAROPIKRIN

<b>24h</b>	Koncentracija molekule ( $\mu\text{M}$ )	2,890	1,445	0,723	0,361	0,181	0,090
	Koncentracija otapala (%)	0,100	0,050	0,025	0,013	0,006	0,003
<b>48h</b>	Koncentracija molekule ( $\mu\text{M}$ )	2,890	1,445	0,723	0,361	0,181	0,090
	Koncentracija otapala (%)	0,100	0,050	0,025	0,013	0,006	0,003

**Tablica 3. Testirane koncentracije cinaropikrina**

### KOSTUNOLID

<b>24h</b>	Koncentracija molekule ( $\mu\text{M}$ )	21,500	10,750	5,375	2,688	1,344	0,672
	Koncentracija otapala (%)	0,500	0,250	0,125	0,063	0,031	0,016
<b>48h</b>	Koncentracija molekule ( $\mu\text{M}$ )	21,500	10,750	5,375	2,688	1,344	0,672
	Koncentracija otapala (%)	0,500	0,250	0,125	0,063	0,031	0,016

**Tablica 4. Testirane koncentracije kostunolida**

#### 2.4. Mjerenje citotoksičnosti spojeva na ljudske stanice – MTT test

Najčešće korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti biološki aktivnih molekula putem kulture stanica je test redukcije tetrazolijeve soli poznatiji kao MTT test. To je kalorimetrijska metoda bazirana na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan tj. u nekim novijim izvedbama te metode koriste se supstrati tzv. WST-1 i MTS koji se metaboliziraju u produkt topiv u mediju za uzgoj stanica zbog čega taj protokol ima jedan korak manje nego klasični test. Dehidrogenaze reduciraju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT), žutu tetrazolijsku boju topivu u vodi, u ljubičasti formazanski produkt netopiv u vodi. Apsorbancija koja se očita proporcionalna je broju živih stanica u uzorku pri čemu se preživljenje stanica može izraziti kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica. (33)



**Slika 19.** Kultura stanica-laboratorij

Nakon 48 sati od tretmana odstranjen je medij u kojemu su stanice rasle, te je u svaku jažicu dodano 200  $\mu\text{L}$  svježeg medija i 20  $\mu\text{L}$  MTT reagensa (5 mg/mL Thiazolyl Blue-Tetrazolium Bromide, otopljen u vodi), uključujući i jažice bez stanica (slijepa proba). Nakon 4 sata inkubacije pri 37 °C u tami, formazanski talozi su otopljeni u 200  $\mu\text{L}$  DMSO uz tresenje. Apsorbancija (OD, optička gustoća) je izmjerena na spektrofotometru mikrotitarskih pločica EnSight (PerkinElmer, SAD) pri valnoj duljini od 595 nm pri kojoj formazanski produkt maksimalno apsorbira svjetlost.



**Slika 20.** Spektrofotometar

Postotak rasta svih staničnih linija računa se prema jednom od slijedećih izraza :

- ako je  $(\text{srednja } OD_{\text{test}} - \text{srednja } OD_{\text{tzero}}) \geq 0$ , kemijski spoj pokazuje citostatički učinak i onda je :  

$$\text{postotak rasta (\%)} = 100 \times (\text{srednja } OD_{\text{test}} - \text{srednja } OD_{\text{tzero}}) / (\text{srednja } OD_{\text{ctrl}} - OD_{\text{tzero}})$$
- ako je  $(\text{srednja } OD_{\text{test}} - \text{srednja } OD_{\text{tzero}}) / (\text{srednja } OD_{\text{tzero}})$   
gdje je :
  - srednja  $OD_{\text{test}}$  – srednja vrijednost optičkih gustoća tretiranih stanica nakon 48 h
  - srednja  $OD_{\text{tzero}}$  – srednja vrijednost optičkih gustoća netretiranih stanica (dan 0.)
  - srednja  $OD_{\text{ctrl}}$  – srednja vrijednost optičkih gustoća netretiranih stanica nakon 48 h

Od svih vrijednosti optičkih gustoća ( $OD_{\text{test}}$ ,  $OD_{\text{tzero}}$  i  $OD_{\text{ctrl}}$ ) oduzeta je izmjerena OD slijepe probe

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Citotoksična aktivnost cinaropikrina i kostunolida testirana je na ljudskim fibroblastima (FX39F) pomoću MTT testa. Apsorbancija (OD, optička gustoća) je izmjerena na spektrofotometru mikrotitarskih pločica EnSight (PerkinElmer, SAD) pri valnoj duljini od 595 nm pri kojoj formazanski produkt maksimalno apsorbira svjetlost, a rezultati su prikazani u tablicama 5. i 6

		<b>Koncentracija cinaropikrina (µM)</b>					
		<b>2,890</b>	<b>1,445</b>	<b>0,723</b>	<b>0,361</b>	<b>0,181</b>	<b>0,090</b>
<b>24 h</b>	Cinaropikrin	81%	95%	94%	106%	100%	106%
	Etanol	71%	102%	92%	110%	110%	114%
<b>48 h</b>	Cinaropikrin	72%	91%	106%	105%	100%	96%
	Etanol	85%	89%	102%	107%	104%	109%

**Tablica 5.** Rezultati MTT testa za cinaropikrin u etanolu

Iz prikazanih rezultata u tablici 5. vidljivo je da cinaropikrin pokazuje citotoksičnost od 81% pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 2,890 µM nakon tretmana od 24h, dok je nakon 48h njegova citotoksičnost porasla te je ostalo viabilnih 72 % stanica. Važno je uočiti da iz navedenih podataka gdje vidimo da u ovisnosti o koncentraciji dolazi do poticanja rasta stanica, cinaropikrin utječe na njihovu proliferaciju i poticanje rasta. Budući da otapalo etanol u kojem je otopljen cinaropikrin pokazuje višu citotoksičnost, koja pri najvećoj koncentraciji iznosi 71 %, kao i trend pozitivnog učinka na rast stanica sa smanjenjem koncentracije etanola, moglo bi se zaključiti da su koncentracije cinaropikrina bile male za pokazati značajan citotoksičan učinak, dok u malim koncentracijama on može imati i povoljan učinak na rast stanica. Cinropikrin pri nižim koncentracijama potiče rast stanica tj. pozitivno utječe na rast stanica dok pri višim koncentracijama dolazi do inhibicije rasta koja se nije značajno promijenila niti nakon 48-satnog tretmana.

		<b>Koncentracija</b>					
		<b>kostunolida</b>					
		<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>					
		<b>21,500</b>	<b>10,750</b>	<b>5,375</b>	<b>2,688</b>	<b>1,344</b>	<b>0,672</b>
<b>24</b>	Kostunolid	79%	93%	92%	100%	95%	100%
	DMSO	100%	105%	94%	109%	93%	93%
<b>48</b>	Kostunolid	60%	76%	75%	90%	82%	86%
	DMSO	91%	95%	87%	93%	88%	86%

**Tablica 6.** Rezultati MTT testa za kostunolid u DMSO

Iz prikazanih rezultata u tablici 6. vidljivo je da kostunolid pokazuje citotoksičnost od 79% pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 21,500  $\mu\text{M}$  nakon tretmana od 24h, dok je nakon 48h njegova citotoksičnost porasla te je ostalo viabilnih 60% stanica. Što se tiče otapala DMSO u kojem je testirani kostunolid otopljen, on nije imao značajan citotoksičan učinak na stanice, bez obzira na promjenu koncentracije. Logičan je rezultat i da kostunolid pokazuje veću citotoksičnost nego cinaropikrin jer su korištene početne veće koncentracije u odnosu na cinaropikrin. U svakom slučaju kostunolid nije pokazao pozitivan utjecaj na rast stanica pri nižim koncentracijama, za razliku od cinaropikrina, dok pri višim koncentracijama dolazi do inhibicije rasta koja se značajno promijenila nakon 48-satnog tretmana.

Testirani rezultati predstavljaju preliminarna istraživanja vezana za koncentraciju navedenih seskviterpenskih laktona i njihovu citotoksičnost. Budući da ni jedan spoj nije dosegao inhibiciju rasta stanica od 50%, trebali bismo napraviti još nekoliko otopina veće koncentracije od testiranih kako bismo utvrdili koncentraciju pri kojoj dolazi do 50% inhibicije rasta stanica spojevima cinaropikrin i kostunolid.

Testirani spojevi u prijašnjim istraživanjima pokazali su značajan biološki učinak vezan za citotoksičnost. Tako je kostunolid pokazao značajne protuupalne aktivnosti u



velikom broju kliničkih istraživanja. Oksidativni stres koji proizlazi iz stanične redoks neravnoteže dovodi do mnogih bolesti kao što su dijabetes, ateroskleroza i kardiovaskularne bolesti. Antioksidacijska aktivnost kostunolida istražena je na životinjskom modelu s dijabetesom induciranim streptozotocinom koji je pokazao značajno smanjenje razine glutaciona (GSH) u mozgu, srcu, jetri, gušterači i bubrezima. Oralna primjena kostunolida obnovila je nivo glutaciona u ovim tkivima. Povećana razina glutaciona povećava i razinu glutation ovisnih enzima kao što su glutation peroksidaze (GPx) i glutation-S-transferaze (GST), smanjujući uništenje tkiva. Trajna upala tkiva ima ulogu u patogenezi različitih upala kao i neupalne bolesti kao što je reumatoidni artritis, Alzheimerova bolest i ateroskleroza. (37)

Apoptoza kao proces stanične smrti posredovana je aktivacijom specifičnih proteaza, kaspaza i karakterizirana fragmentacijom DNA. Indukcija apoptoze u tumorskim stanicama važan je mehanizam za uspješnost kemoterapijskih lijekova. Između ostalih seskviterpenskikh laktona, kostunolid je zapažen kao spoj koji inducira apoptozu u tumorskim stanicama. Ovaj spoj inhibira proliferaciju<sup>8</sup> ljudskih staničnih linija, staničnih predstavnika hepatocelularnog karcinoma, karcinoma prostate te stanica raka želudca. (35)

Angiogeneza predstavlja rast novih krvnih žila iz već postojećih. Kada dođe do ugrožavanja balansa između angiogenetskih i angiostatičnih faktora, tumorske stanice mogu početi stvarati nekontrolirane angiogenetske faktore, uključujući vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i fibroblastni faktor rasta (bFGF). Ovi faktori stimuliraju endotelijalnu staničnu proliferaciju te nove formirane endotelijalne stanice uništavaju ekstracelularni matriks, migriraju prema tumorskim stanicama i počinju formirati lumen. Tumorska angiogeneza ima značajnu ulogu u rastu tumora i metastaza te su angiogenetski inhibitori potencijalni terapijski agensi za liječenje raka. Prema istraživanjima, kostunolid inhibira proliferaciju stanica endotela ljudske umbilikalne vene (HUVEC) i migraciju blokirajući angiogenetski faktorni signalni put stoga se smatra potencijalnim sredstvom u antitumorskoj terapiji. (35)

Osteoporozna je progresivna metabolička bolest kostiju karakterizirana resorpcijom kostiju uslijed slabe osteoblastične (stvaranje nove kosti) i pojačane osteoklastične

---

<sup>8</sup> umnožavanje stanica, bujanje tkiva u vrijeme embrijskog razvitka ili u doba rasta te u upalnim, regeneracijskim i tumorskim procesima

aktivnosti (razgradnja kosti) i česta je kod starije populacije. Iako se u današnje vrijeme koristi kalcij i vitamin D3, paratiroidni hormonski analozi, javlja se potreba za razvitkom novih lijekova, a kostunolid se pokazao kao spoj pogodan za poboljšanje zdravlja kostiju.

Farmakološki i biokemijski dokazi upućuju na to da reaktivne kisikove vrste i protein kinaze (PK) C $\delta$  imaju značajnu ulogu posredovanja između pro-apoptotičke aktivnosti cinaropikrina. L-cistein i N-acetil-L-cistein, reaktivne kisikove vrste, kao i rotlerin, selektivni PKC $\delta$  inhibitor, umanjuju citotoksičnost cinaropikrina i morfološke promjene te cinaropikrin inducira proteolitičko cijepanje PKC $\delta$ . Ove značajke ukazuju da je cinaropikrin potencijalno antitumorsko sredstvo protiv nekih leukocitnih tumorskih stanica kao što su limfome ili leukemija, putem pro-apoptotičke aktivnosti. (40)

Zaraza virusom hepatitisa C prepoznata je kao glavni uzrok kroničnih bolesti jetre kao što su hepatička steatoza, ciroza jetre te hepatocelularni karcinom (HCC) koji zahtijevaju transplantaciju jetre. Divlja artičoka podrijetlom iz Egipta pokazala je obećavajuću aktivnost protiv hepatitisa C što je povezano sa seskviterpenskim laktonima, osobito cinaropikrinom koji je pokazao izvanrednu aktivnost od prvog puta kada su izvedena *in vitro* istraživanja koja su pokazala da on ima spektar aktivnosti kao inhibitor ulaska u stanicu svih genotipova HCV (hepatitis C virusa).

Faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) je citokin kojeg proizvodi veliki broj stanica posebno limfociti i makrofagi te ima osnovnu ulogu u kroničnim i akutnim upalnim reakcijama. Ove stanice se tijekom upale množe i aktiviraju putem upalnih signala (npr. bakterijskih produkata kao što su lipopolisaharidi). TNF- $\alpha$  citotoksin je dobiven iz monocita i pokreće upalnu reakciju te je njegova deregulacija povezana s bolestima kao što su reumatoidni artritis, psorijaza, Alzheimerova bolest, astma, rak i sl. Cinaropikrin ima snažan supresivni učinak na TNF- $\alpha$  i stoga se smatra korisnim sredstvom protiv akutnih i kroničnih bolesti. (39)

## 4. ZAKLJUČAK

Seskviterpeni su prirodni kemijski spojevi koji su po svojoj kemijskoj strukturi C-15 terpenoidi. Pojavljuju se kao ugljikovodici ili u oksidiranoj formi kao alkoholi, aldehidi, kiseline ili laktoni u prirodi. Važni su sastojci biljnih ekstrakata i esencijalnih ulja koja imaju značajnu primjenu u medicinskim, mirisnim pripravcima ili sapunima.

Seskviterpenski laktoni posjeduju značajna biološki aktivna svojstva koja mogu biti od iznimne koristi u liječenju mnogih bolesti. Seskviterpenski laktoni moduliraju veliki broj upalnih procesa, primjerice oksidativnu fosforilaciju, agregaciju trombocita, i otpuštanje serotonina. Brojna su istraživanja pokazala da seskviterpenski laktoni imaju protuupalni, antitumorski, antimikrobni, učinak na živčani i kardiovaskularni sustav i druge biološke učinke. Od biološke aktivnosti značajan je njihov citotoksični, antitumorski učinak na ljudske stanice. Citotoksični učinak vezan je za  $\alpha,\beta$ -nezasićenu karbonilnu strukturu kao što je  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton, odnosno  $\alpha,\beta$ -nezasićeni ciklopentanon ili konjugirani ester. Ovi strukturni elementi reagiraju kao nukleofili, posebno cistein sulfhidrilne skupine putem reakcije Michaelove adicije. Tiolne skupine kao što su cisteinske rezidue u proteinima, zapravo su ciljana mjesta djelovanja seskviterpenskog laktona. Razlika u aktivnosti između individualnih seskviterpenskog laktona može se objasniti različitim alkilacijskim strukturnim elementima no utjecaj na aktivnost mogu imati i ostali faktori kao što je lipofilnost, molekularna geometrija i slično.

Seskviterpenski laktoni cinaropikrin i kostunolid mogu se izolirati iz biljaka porodice *Asteracea*, posebno iz biljaka njenog roda *Centaurea*. Dobro je poznat i značajan njihov citotoksični učinak dokazan u brojnim istraživanjima. U ovom radu testiran je citotoksični učinak seskviterpenskog laktona cinaropikrina i kostunolida na ljudske stanice fibroblaste. Pomoću MTT testa utvrđena je viabilnost stanica. Ovim radom je pokazano da je potrebno testirati koncentracije cinaropikrina više od 2,890  $\mu\text{M}$  i kostunolida više od 21,5  $\mu\text{M}$  kako bismo postigli vrijednosti inhibicije rasta stanica niže od 50%. Testiranja cinaropikrina pokazala su da manje koncentracije imaju i pozitivan učinak na rast stanica fibroblasta, te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo o kakvom se učinku i mehanizmu aktivacije radi.

## LITERATURA

1. Merfort I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones
2. Chappell J, Coates RM. 1.16 - Sesquiterpenes. In: Liu H-W (Ben), Mander L, editors. *Comprehensive Natural Products II* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2010. p. 609–41.
3. Hohmann MSN, Longhi-Balbinot DT, Guazelli CFS, Navarro SA, Zarpelon AC, Casagrande R, et al. Sesquiterpene Lactones: Structural Diversity and Perspectives as Anti-Inflammatory Molecules. *Stud Nat Prod Chem*. 2016;49:243–64.
4. Öksüz, Sevil, Serin, Sema, Topçu, Gülaçti Sesquiterpene lactones from *Centaurea hermannii*. *Phytochemistry*, 1994. ,vol. 35, 435-438
5. Amorim MHR, Gil Da Costa RM, Lopes C, Bastos MMSM. Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. Vol. 43, *Critical Reviews in Toxicology*. 2013. p. 559–79.
6. Padilla-Gonzalez GF, dos Santos FA, Da Costa FB. Sesquiterpene Lactones: More Than Protective Plant Compounds With High Toxicity. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 2016;35(1):18–37.
7. Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C. Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):12780–805.
8. Seaman FC. The botanical review sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae, 1982., vol. 48, no. 2
9. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VEBA>: (31.7.2020.)
10. <https://en.wikipedia.org/wiki/Heliantheae> (31.7.2020.)
11. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Mutisieae> (31.7.2020.)
12. Bruno M, Bancheva S, Rosselli S, Maggio A. Sesquiterpenoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort (tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution, <sup>13</sup>C NMR spectral data and biological properties. *Phytochemistry* [Internet]. 2013;95:19–93.
13. Rocchetti G, Giuberti G, Lucchini F, Lucini L. Polyphenols and sesquiterpene lactones from artichoke heads: Modulation of starch digestion, gut bioaccessibility, and bioavailability following in vitro digestion and large intestine fermentation. *Antioxidants*. 2020;9(4):1–13.
14. Anggraini AR, Oliver J. Summary for Policymakers. In: Intergovernmental Panel on Climate Change, editor. *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2019. p. 1–30. [pe/book\\_part](#)
15. In vitro i in vivo antitripanosomsko djelovanje tri peptidna antibiotika: leucinostatina a i b, alameticina i i tushimicina | časopis o antibioticima

16. Adekenov SM. Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. *Fitoterapia* [Internet]. 2017;121(March):16–30.
17. Rodriguez E, Towers GHN, Mitchell JC. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*. 1976;15(11):1573–80.
18. da Silva Castro E, Alves Antunes LA, Revoredo Lobo JF, Ratcliffe NA, Borges RM, Rocha L, et al. Antileukemic Properties of Sesquiterpene Lactones: A Systematic Review. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(3):323–34.
19. Gao F, Sun Z, Kong F, Xiao J. Artemisinin-derived hybrids and their anticancer activity. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2020;188:112044.
20. Abad Martínez MJ, Del Olmo LMB, Ticona LA, Benito PB. The *Artemisia* L. genus: A review of bioactive sesquiterpene lactones [Internet]. Vol. 37, *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier; 2012. 43–65 p.
21. Picman AK. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. Vol. 14, *Biochemical Systematics and Ecology*. 1986.
22. Ivanescu B, Miron A, Corciova A. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *J Anal Methods Chem*. 2015;2015.
23. Warshaw EM. Feature Article. *Appl Spectrosc*. 2005;59(12):287A-288A.
24. Boğa M, Alkan H, Ertuş A, Oral EV, Yılmaz MA, Yeşil Y, et al. Phytochemical profile and some biological activities of three *Centaurea* species from Turkey. *Trop J Pharm Res*. 2016;15(9):1865–75.
25. Beltagy AM. Chemical composition and cytotoxic activity of *Centaurea scoparea* Sieb against four human cell lines. *J Pharm Sci Res*. 2014;7(3):103–7.
26. Shoeb M. Cytotoxic Compounds From the Genus *Centaurea*. 2005;1–318.
27. M., Radan I., Carev V., Tešević O., Politeo V., Čikeš Čulić. Qualitative HPLC-DAD-ESI-TOF-MS analysis, cytotoxic and apoptic effect of Croatian endemic *Centaurea ragusina* L. aqueous extracts. *Chem Biodivers*. 2017;14.
28. Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan S, Yavasoglu NUK, et al. Bioactivity screening of five *Centaurea* species and in vivo anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharm Biol*. 2014;52(6):775–81.
29. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, et al. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(2–3):193–236.
30. Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(7):1026–30.
31. Žlender V. Apoptoza - Programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2003;54(4):267–74.
32. Izdanje DČ i IČ. Štrausova Medicinska biokemija. Treće. :518.-519.str.
33. Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Hrvat časopis za prehrambenu Tehnol Biotehnol i Nutr*. 2016;11(3–4):169–75.

34. Kupchan SM, Eakin MA, Thomas AM. Tumor Inhibitors. 69. Structure-Cytotoxicity Relationships among the Sesquiterpene Lactones. *J Med Chem.* 1971;14(12):1147–52.
35. Rasul A, Parveen S, Ma T. Costunolide: A novel anti-cancer sesquiterpene lactone. *Bangladesh J Pharmacol.* 2012;7(1):6–13.
36. Li Q, Wang Z, Xie Y, Hu H. Antitumor activity and mechanism of costunolide and dehydrocostus lactone: Two natural sesquiterpene lactones from the Asteraceae family. *Biomed Pharmacother [Internet].* 2020;125:109955.
37. Kim DY, Choi BY. Costunolide — A Bioactive Sesquiterpene Lactone with Diverse Therapeutic Potential. 2019;
38. Kim YE, Choi HC, Nam G, Choi BY. Costunolide promotes the proliferation of human hair follicle dermal papilla cells and induces hair growth in C57BL/6 mice. *J Cosmet Dermatol.* 2019;18(1):414–21.
39. Elsebai MF, Mocan A, Atanasov AG. Cynaropicrin: A comprehensive research review and therapeutic potential as an anti-hepatitis C virus agent. *Front Pharmacol.* 2016;7(DEC).
40. Cho JY, Kim AR, Jung JH, Chun T, Rhee MH, Yoo ES. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *Eur J Pharmacol.* 2004;492(2–3):85–94.
41. Sato T, Hara S, Sato M, Ogawa K, Adams M, Usuki T. Synthesis of cynaropicrin-d4. *Bioorganic Med Chem Lett*
42. Rüngeler P, Castro V, Mora G, Gören N, Vichnewski W, Pahl HL, et al. Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B by sesquiterpene lactones: A proposed molecular mechanism of action. *Bioorganic Med Chem.* 1999;7(11):2343–52.
43. Babaei G, Aliarab A, Abroon S, Rasmi Y, Aziz SGG. Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomed Pharmacother*
44. Lin X, Peng Z, Su C. Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):10888–906.