

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET  
I  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vedrana Papac**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE HLAPLJIVIH IZOLATA  
ODABRANIH BILJAKA IZ RODA *BRASSICA* SPP. DOBIVENIH  
RAZGRADNJOM POTPOMOĞNUTOM MIKROVALOVIMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2018./2019.**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, rujan, 2019. godine**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Medicinska kemija i biokemija  
**Tema rada** je prihvaćena na 1. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 1. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 1. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

### CITOTOKSIČNO DJELOVANJE HLAPLJIVIH IZOLATA ODABRANIH BILJAKA IZ RODA *BRASSICA* SPP. DOBIVENIH RAZGRADNJOM POTPOMOGNUTOM MIKROVALOVIMA

Vedrana Papac, broj indeksa 132

#### Sažetak:

Cilj istraživanja je bio ispitati citotoksični učinak hlapljivih izolata iz biljaka koje pripadaju rodu *Brassica* spp. na dvije stanične linije humanih karcinoma: A549 i T24. Korišteni su destilati i ekstrakti iz *Brassica oleracea* var. *italica*, *Brassica oleracea* var. *gongylodes*, *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*. Obe stanične linije tretirane su koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama biljnih izolata te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj nam je citotoksične aktivnosti korištenih izolata. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica stanične linije T24 ostvaruje mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju A549 ostvaruje također mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Ispitivani izolati pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje izolata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak hlapljivih izolata, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma mokraćnog mjehura i pluća kod životinja. Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom „**Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala**“ (IP-2016-06-1316).

**Ključne riječi:** biljke, karcinom, citotoksičnost, MTTmetoda

**Rad sadrži:** 65 stranica, 36 slika, 8 tablica, 29 referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. prof. dr. sc. Maja Valić, predsjednik
2. dr. sc. Shelly Pranić, član
3. izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 30. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Medical Chemistry and Biochemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 1 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 1 and Faculty Council of School of Medicine, session no.1  
**Mentor:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD  
**Technical assistance:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

### **The cytotoxic effect of volatile isolates of the plants from the *Brassica* genus on various cell lines of human cancers measured by the MTT assay**

Vedrana Papac, index number 132

#### **Summary:**

The aim of this research was to examine cytotoxic effects of certain volatile isolates from the *Brassica* genus of plants on two cell lines of human carcinomas, T24 and A549. We used distillates and extracts from *Brassica oleracea* var. *italica*, *Brassica oleracea* var. *gongyloides*, *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*. Both cell lines cells were treated with concentrations of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Cytotoxicity was established after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours, using the MTT assay. The ratio of absorbance of cells treated with volatile isolates in aqueous solutions and the ones not treated showed the cytotoxic activity of used isolates. The most prominent effect on the reduction of metabolically active cells in cell line T24 is achieved by microwave extract of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* at the concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time. In cell line A549 the most significant effect on the reduction of metabolically active cells is achieved also by *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* at the concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time. Volatile isolates tested showed cytotoxic effects dependent on incubation time and concentration. The effectiveness of volatile isolates was not always correspondent to the increase of concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurred. The cytotoxic effect of volatile isolates is confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next step is the analysis of these effects by *in vivo* studies on the models of animal urinary bladder and lung cancers.

This research has been fully supported by the Croatian Science Foundation under the project “**Plants as a source of bioactive sulphur compounds and their ability to hyperaccumulate metals**” (IP-2016-06-1316).

**Keywords:** plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay

**Thesis contains:** 65 pages, 36 figures, 8 tables, 29 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

1. Maja Valić, PhD, full prof., chair person
2. Shelly Pranić, PhD, member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member - supervisor

Defence date: September 30, 2019

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	RAK.....	2
1.1.1	<i>ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI.....</i>	<i>3</i>
1.2	KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA.....	4
1.2.1	<i>EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA.....</i>	<i>4</i>
1.2.2	<i>PATOHISTOLOGIJA.....</i>	<i>5</i>
1.2.3	<i>SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA.....</i>	<i>5</i>
1.2.4	<i>KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA.....</i>	<i>7</i>
1.2.5	<i>LIJEČENJE.....</i>	<i>12</i>
1.3	RAK PLUĆA.....	13
1.3.1	<i>ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA.....</i>	<i>13</i>
1.3.2	<i>KLINIČKA SLIKA.....</i>	<i>14</i>
1.3.3	<i>DIJAGNOSTIKA I ODREĐIVANJE STADIJA BOLESTI.....</i>	<i>14</i>
1.3.4	<i>LIJEČENJE.....</i>	<i>21</i>
1.4	BRASSICA SPP. ....	21
1.4.1	<i>Brassica oleracea var. italica.....</i>	<i>22</i>
1.4.2	<i>Brassica oleracea var. gongylodes.....</i>	<i>23</i>
1.4.3	<i>Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra.....</i>	<i>24</i>
<b>2</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>28</b>
3.1	STANIČNE LINIJE.....	29
3.2	BILJNI MATERIJALI.....	31
3.2.1	<i>Brassica oleracea var. italica.....</i>	<i>31</i>
3.2.2	<i>Brassica oleracea var. gongylodes.....</i>	<i>32</i>
3.2.3	<i>Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra.....</i>	<i>33</i>
3.3	POSTUPAK.....	34
3.4	TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI.....	35
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>36</b>

<b>4.1</b>	<b>KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA- STANIČNA LINIJA T24.....</b>	<b>37</b>
4.1.1	<i>Brassica oleracea var. italica – mikrovalni destilat.....</i>	37
4.1.2	<i>Brassica oleracea var. italica – mikrovalni ekstrakt.....</i>	38
4.1.3	<i>Brassica oleracea var. gongylodes – mikrovalni destilat.....</i>	39
4.1.4	<i>Brassica oleracea var. gongylodes – mikrovalni ekstrakt.....</i>	40
4.1.5	<i>Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra – mikrovalni destilat.....</i>	41
4.1.6	<i>Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra – mikrovalni ekstrakt.....</i>	42
<b>4.2</b>	<b>KARCINOM PLUĆA – STANIČNA LINIJA A549 .....</b>	<b>43</b>
4.2.1	<i>Brassica oleracea var. italica – mikrovalni destilat.....</i>	43
4.2.2	<i>Brassica oleracea var. italica – mikrovalni ekstrakt.....</i>	44
4.2.3	<i>Brassica oleracea var. gongylodes – mikrovalni destilat.....</i>	45
4.2.4	<i>Brassica oleracea var. gongylodes – mikrovalni ekstrakt.....</i>	46
4.2.5	<i>Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra – mikrovalni destilat.....</i>	47
4.2.6	<i>Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra – mikrovalni ekstrakt.....</i>	48
<b>5</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>62</b>
<b>10</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>64</b>

## **1 UVOD**

## 1.1 RAK

Rak je skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici, te posljedično, i po načinu liječenja. Rak može nastati zbog poremećaja proliferacije bilo koje vrste stanica u tijelu, tako da postoji više od stotinu vrsta raka koji se jako razlikuju po ponašanju i odgovoru na liječenje. Najvažnija stvar u patologiji raka jest razlikovati benigne (dobročudne) od malignih (zloćudnih) tumora. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu koja može biti benigna ili maligna. Dobročudni tumor ostaje ograničen na mjesto na kojem je nastao, dok je zloćudni tumor u stanju proširiti se na susjedna normalna tkiva i čitavo tijelo preko krvožilnog ili limfatičkog sustava, tada govorimo o metastazama. Pojam rak odnosi se samo na zloćudne tumore. Tumori se klasificiraju prema vrsti stanica iz kojih nastaju te se većina tumora može svrstati u jednu od tri glavne skupine: karcinomi, sarkomi, leukemije ili limfomi. Karcinomi su zloćudne bolesti epitelnih stanica i oni čine oko 90% slučajeva raka kod ljudi. Sarkomi su solidni tumori vezivnih tkiva poput mišića, kosti, hrskavice i veziva u užem smislu. Leukemije i limfomi nastaju iz krvotvornih stanica i iz stanica imunostava (1,2).

Svim vrstama raka zajedničko je da nastaju od zdravih stanica organizma procesom koji se zove zloćudna pretvorba. Zbog određenih promjena stanica gubi sposobnost adekvatnog odgovaranja na brojne signale kojima se njezino ponašanje stalno usklađuje s „potrebama“ organizma, što rezultira nekontroliranom diobom zloćudno preobražene stanice. Promjena koja je odgovorna za zloćudnu pretvorbu stanica je genska mutacija. Mutacije povezane s nastankom raka mogu se u manjem broju slučajeva naslijediti, ali najčešće nastaju u somatskim stanicama kao posljedica djelovanja raznih mutagena ili nasumično uslijed grešaka pri umnažanju DNA. Ključna obilježja prema kojima se svaki rak razlikuje od zdravog tkiva, prema modelu Douglas Hanahana i Robert A. Weinberga iz 2001.godine: samodostatnost s obzirom na signale rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, zaobilaznje programirane stanične smrti (apoptoze), neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza, sposobnost tkivne invazije i presađivanja, poremećen metabolizam, sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora, genomska nestabilnost i upala. Rak se klinički najčešće očituje kao nakupina velikog broja zloćudno preobraženih stanica čiji se broj zbog nekontrolirane stanične diobe progresivno povećava. Sam je proces nastanka raka od zdravih stanica složen, dugotrajan i odigrava se u više koraka. Proces kojim iz zdravog tkiva u više koraka nastaje rak, naziva se tumorska progresija (1).

Rak je značajan javnozdravstveni problem stanovništva Hrvatske. Drugi je najvažniji uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila. Incidenciju raka u Hrvatskoj prati i proučava Registar za rak Republike Hrvatske, populacijski registar pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo (3).

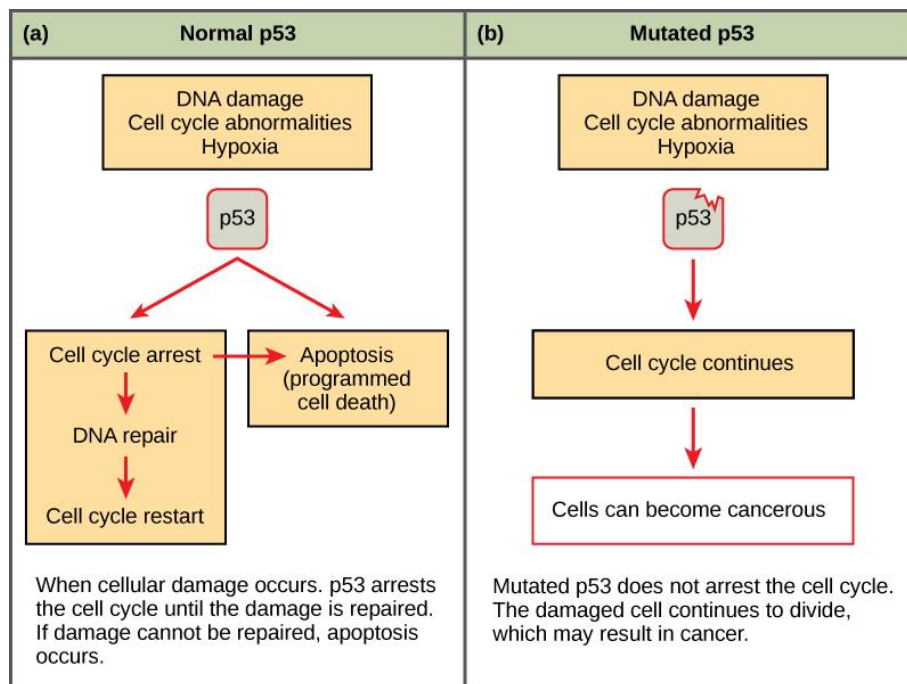
### **1.1.1 ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI**

Onkogeni su prvi geni za koje se pokazalo da imaju središnju ulogu u nastanku raka. Oni su promijenjena inačica normalnih staničnih gena koje nazivamo proto-onkogenima i koji sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije. Proto-onkogeni su uključeni u prijenos signala u stanici i svi su evolucijski dobro očuvani, što upućuje na njihovu ulogu u bitnim staničnim procesima. Putevi prijenosa signala u stanici način su na koji se stanični rast, dioba, diferencijacija i preživljenje usklađuju s uvjetima u okolišu stanice. Signali koje stanica prima iz okoliša često su oblik malih molekula, čimbenika rasta, koje se najčešće vezuju za receptore na staničnoj membrani. Time ih aktiviraju, što dovodi do prijenosa signala putem brojnih drugih molekula u stanici sve do transkripcijskih čimbenika koji potiču ekspresiju određenih gena. Ako se proto-onkogeni promijene tako da sami ili njihovi proteinski produkti postanu aktivniji, tada nastaju onkogeni. Taj proces nazivamo aktivacijom onkogenena. Posljedica aktivacije onkogenena jest nekontrolirani rast i dioba stanice, što uzrokuje nastanak raka. Do aktivacije onkogenena može doći na nekoliko načina. Proteinski produkti onkogenena nazivaju se onkoproteinima. Onkogen se može aktivirati zbog mutacija u samom genu, kao posljedica genske amplifikacije (povećanja broja kopija gena), kao posljedica kromosomske translokacije (dio kromosoma se „odlomi“ i premjesti na drugi kromosom). Razumijevanje uloge onkogenena i puteva prijenosa signala u nastanku raka omogućilo nam je razvoj ciljanih lijekova kao što su monoklonska protutijela te inhibitori protein-kinaza (1).

Za razliku od onkogenena čija pojačana aktivnost dovodi do nastanka raka, tumor supresorski geni su geni čiji gubitak ili inaktivacija njih samih, odnosno njihovih proteinskih produkata dovodi do nastanka raka. Različiti tumor supresorski geni imaju različite funkcije u stanici. Posebno važan tumor supresorski gen je P53. Taj gen je često mutiran u različitim tipovima raka u ljudi. Proteinski produkt gena P53, transkripcijski čimbenik p53, aktivira se zbog oštećenja stanične DNA ili drugih poremećaja povezanih sa staničnim stresom. Aktivirani p53 ima dva osnovna načina djelovanja: zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA te potiče apoptozu. Oštećenje stanične



DNA znatno povećava mogućnost da se stanica pretvori u stanicu raka. Zaustavljajući prolazak stanice kroz stanični ciklus, p53 omogućuje da se oštećenja stanične DNA poprave prije nego se oštećena DNA replicira. Ako se ta oštećenja ne uspiju popraviti, djelovanjem proteina p53, stanica ulazi u apoptozu i umire. Na taj se način „žrtvuje“ ta stanica kako bi se spriječio mogući razvoj raka. Ako gen P53 nedostaje u stanici ili je inaktiviran, tada u diobu ulaze i stanice s oštećenom DNA, čime se povećava vjerojatnost nastanka raka. Inaktivacija p53 u stanicama raka povezana je i s tumorskom angiogenezom te rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju (1).



Slika 1. Uloga proteina p53

Preuzeto s: <https://opentextbc.ca/biology/chapter/6-3-cancer-and-the-cell-cycle/>

## 1.2 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

### 1.2.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Rak mokraćnog mjehura je 9. najčešća maligna bolest u svijetu. Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura je 3.5 puta veća kod muškaraca nego kod žena (4). U Republici Hrvatskoj je 2014. godine zabilježeno 1005 slučajeva. Prosječna dob bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura iznosi 73 godine. Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura iznosi 19,8/100.000 (5).

Dokazani čimbenici rizika za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura su pušenje, izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, određenim lijekovima (ciklofosamid, fenacetin), kamenci, kronična upala te shistosomijaza (povezana je s rakom pločastih stanica) (5).

### **1.2.2 PATOHISTOLOGIJA**

Postoje tri vrste karcinoma mokraćnog mjehura koji počinju u stanicama u podlozi mokraćnog mjehura. Ovi se karcinomi nazivaju po vrstama stanica koje postaju maligne.

Karcinom prijelaznog epitela (urotelni karcinom): karcinom koji počinje u stanicama u najdubljim slojevima tkiva mokraćnog mjehura. Te se stanice mogu rastezati kada je mjehur pun i skupljati kada se isprazni. Većina karcinoma mokraćnog mjehura počinje u stanicama prijelaznog epitela. Karcinom prijelaznog epitela može biti niskog ili visokog stupnja:

Karcinom prijelaznog epitela niskog stupnja često se vraća nakon liječenja, ali se rijetko širi u mišićni sloj mokraćnog mjehura ili na druge dijelove tijela.

Karcinom prijelaznog epitela visokog stupnja često se javlja nakon liječenja i često se širi u mišićni sloj mokraćnog mjehura, na druge dijelove tijela i na limfne čvorove. Gotovo sve smrti od karcinoma mokraćnog mjehura su visokog stupnja bolesti.

Karcinom pločastih stanica: karcinom koji počinje u pločastim stanicama, koje su tanke, ravne stanice koje mogu nastati u mjehuru nakon dugotrajne infekcije ili iritacije.

Adenokarcinom: karcinom koji počinje u žljezdanim (sekretornim) stanicama koje se nalaze u podlozi mokraćnog mjehura. Ovo je vrlo rijetka vrsta karcinoma mokraćnog mjehura.

Karcinom koji se nalazi u podlozi mjehura zove se površinski karcinom mokraćnog mjehura. Karcinom koji se proširio kroz podlogu mjehura i napada mišićni zid mjehura ili se proširio na obližnje organe i limfne čvorove zove se invazivni karcinom mokraćnog mjehura (6).

### **1.2.3 SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA**

U 90% bolesnika karcinom mokraćnog mjehura očituje se bezbolnom hematurijom (krv u urinu), mikroskopskom ili makroskopskom. Također, pojavljuje se učestalo mokrenje

zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili rjeđe, simptoma urinarne infekcije. Znakovi lokalnog širenja tumora su hidronefroza, opstipacija, limfedem te palpabilna masa u maloj zdjelici. Kod uznapredovale bolesti pojavljuju se simptomi vezani uz sijela presadnica. Urotelni karcinom najčešće metastazira u trbušne limfne čvorove, jetru, pluća i u kosti (5).

Testovi koji ispituju urin i mjehur, te služe za otkrivanje i dijagnosticiranje karcinoma mokraćnog mjehura:

a) Fizikalni pregled i anamneza: pregled tijela kako bi se provjerili opći znakovi zdravlja, uključujući provjeru znakova bolesti, kao što su izrasline ili bilo što drugo što se čini neobičnim. Također i anamneza pacijentovih zdravstvenih navika i prošlih bolesti i tretmana.

b) Analiza urina: ispitivanje boje urina i njegovog sadržaja, kao što su šećer, proteini, crvene krvne stanice i bijele krvne stanice.

c) Citologija urina: laboratorijski test u kojem se uzorak urina provjerava pod mikroskopom na abnormalne stanice.

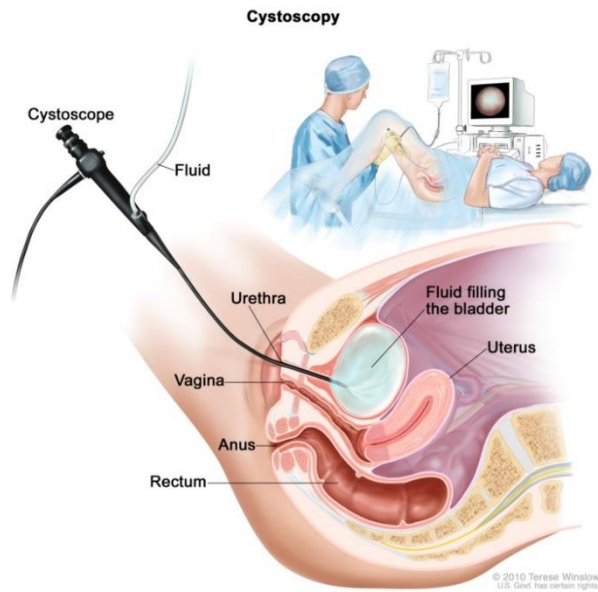
d) Cistoskopija: postupak gledanja unutar mokraćnog mjehura i uretre radi provjere abnormalnih područja. Cistoskop se umetne kroz mokraćnu cijev u mjehur. Cistoskop je tanak, cijevni instrument sa svjetlom i objektivom za gledanje. Može također imati alat za uklanjanje uzoraka tkiva, koji se zatim provjeravaju pod mikroskopom na znakove karcinoma (Slika 2.)

e) Intravenska pijelografija (IVP): pomoću x-zraka i kontrastnog sredstva koje se ubrizgava u venu, dobija se slika bubrega, mokraćne cijevi i mokraćnog mjehura kako bi se utvrdilo je li karcinom prisutan u tim organima

f) Biopsija: uklanjanje stanica ili tkiva kako bi ih patolog pregledao pod mikroskopom kako bi provjerio znakove karcinoma. Biopsija za karcinom mokraćnog mjehura obično se obavlja tijekom cistoskopije.

Nakon što je dijagnosticiran karcinom mokraćnog mjehura, provode se testovi kako bi se ustanovilo jesu li se stanice karcinoma proširile unutar mjehura ili na druge dijelove tijela (6).

Za procjenu proširenosti bolesti služi MSCT ili MR trbuha i male zdjelice te RTG-prikaz pluća. U slučaju povišene vrijednosti alkalne fosfataze ili prisutnih simptoma uz koštani sustav, potrebno je učiniti scintigrafiju kostiju (5).



Slika 2. Cistoskopija

Preuzeto s:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_98](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705_98)

#### 1.2.4 KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Zbog odgovarajućeg izbora terapije te prognoze bolesnika potrebna je što točnija procjena proširenosti bolesti. Procjenu proširenosti bolesti najčešće izražavamo TNM-klasifikacijom Američkog združenog odbora za rak (American Joint Committee on Cancer, AJCC) (Tablica 1.) (5).

Tablica 1. TNM-klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura

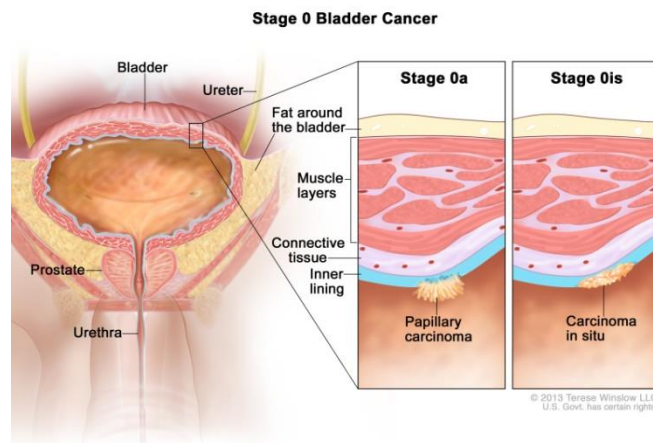
Preuzeto s: <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>

Stadij	Grupa	Opis stadija
0a	Ta N0	Neinvazivni papilarni karcinom (Ta). Narastao je prema šupljem središtu mokraćnog mjehura, ali nije narastao u vezivno tkivo ili mišiće zida mokraćnog mjehura.

	<b>M0</b>	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili udaljena mjesta (M0).
<b>0is</b>	<b>Tis</b> <b>N0</b> <b>M0</b>	Neinvazivni karcinom (Tis), također poznat kao karcinom <i>in situ</i> (CIS). Karcinom raste samo u unutarnjem sloju mokraćnog mjehura. Nije narastao prema unutra, prema šupljem dijelu mjehura, niti je napao vezivno tkivo ili mišiće zidova mjehura. Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili udaljena mjesta (M0).
<b>I</b>	<b>T1</b> <b>N0</b> <b>M0</b>	Karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura, ali nije dosegaio sloj mišića u zidu mjehura (T1). Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
<b>II</b>	<b>T2a ili T2b</b> <b>N0</b> <b>M0</b>	Karcinom je narastao u unutarnji (T2a) ili vanjski (T2b) mišićni sloj zida mjehura, ali nije prošao kroz mišiće do sloja masnog tkiva koji okružuje mjehur. Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
<b>IIIA</b>	<b>T3a,</b> <b>T3b ili T4a</b> <b>N0</b> <b>M0</b>	Karcinom je narastao kroz mišićni sloj mokraćnog mjehura i u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur (T3a ili T3b). Možda se proširio u prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a). Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
	<b>III</b>	
	<b>T1-4a</b> <b>N1</b> <b>M0</b>	Karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura (T1), ili u mišićni sloj zida mokraćnog mjehura (T2), ili u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur, (T3a ili T3b) ili se možda proširio na prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u

		<p>zdjelici ili trbušnom zidu (T4a)</p> <p>i karcinom se proširio na obližnji limfni čvor u zdjelici (N1).</p> <p>Karcinom se nije proširio na udaljena mjesta (M0).</p>
<b>IIIB</b>	<p><b>T1-T4a</b></p> <p><b>N2 ili N3</b></p> <p><b>M0</b></p>	<p>karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura (T1), ili</p> <p>u mišićni sloj zida mokraćnog mjehura (T2), ili</p> <p>u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur, (T3a ili T3b) ili</p> <p>se možda proširio na prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a)</p> <p>i karcinom se proširio na 2 ili više limfnih čvorova u zdjelici (N2) ili u limfne čvorove duž zajedničke ilijačne arterije (N3).</p> <p>Karcinom se nije proširio na udaljena mjesta (M0).</p>
<b>IVA</b>	<p><b>T4b</b></p> <p><b>N0</b></p> <p><b>M0</b></p>	<p>Karcinom je izrastao kroz zid mokraćnog mjehura u zdjelicu zdjelice ili trbušne zidove (T4b).</p> <p>Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (NE) ili na udaljena mjesta (M0).</p>
	<b>III</b>	
	<p><b>Bilo koji T</b></p> <p><b>Bilo koji N</b></p> <p><b>M1a</b></p>	<p>Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T).</p> <p>Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N).</p> <p>Proširio se na udaljeni skup limfnih čvorova (M1a).</p>

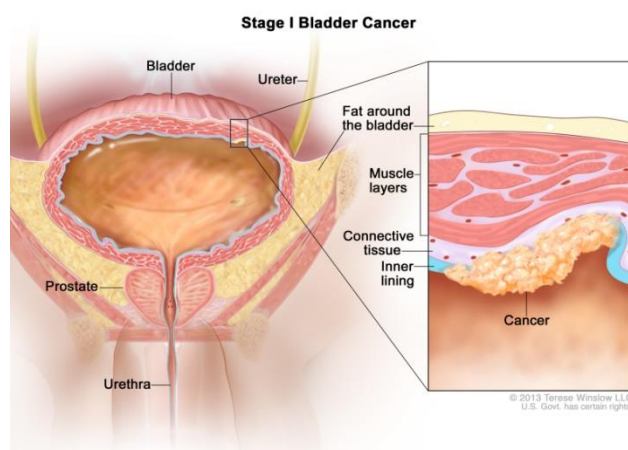
<b>IVB</b>	<b>Bilo koji T</b>	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T).
	<b>Bilo koji N</b>	Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N).
	<b>M1b</b>	Proširio se na 1 ili više udaljenih organa (kosti, jetra ili pluća) (M1b).



Slika 3. Stadij 0 karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s:

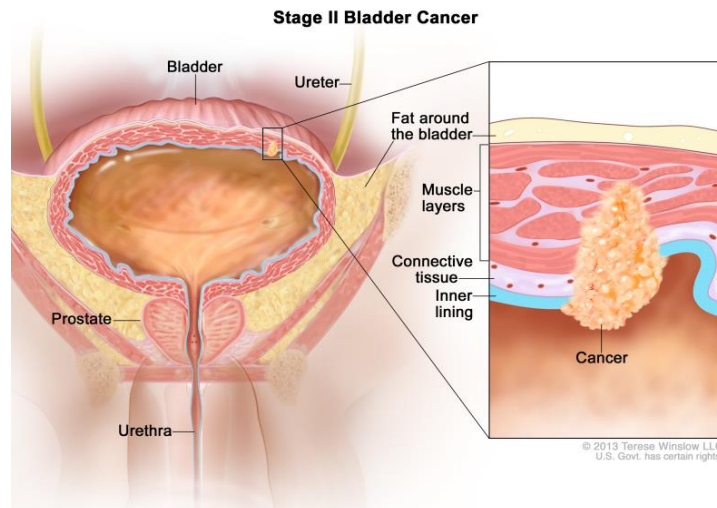
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)



Slika 4. Stadij I karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s:

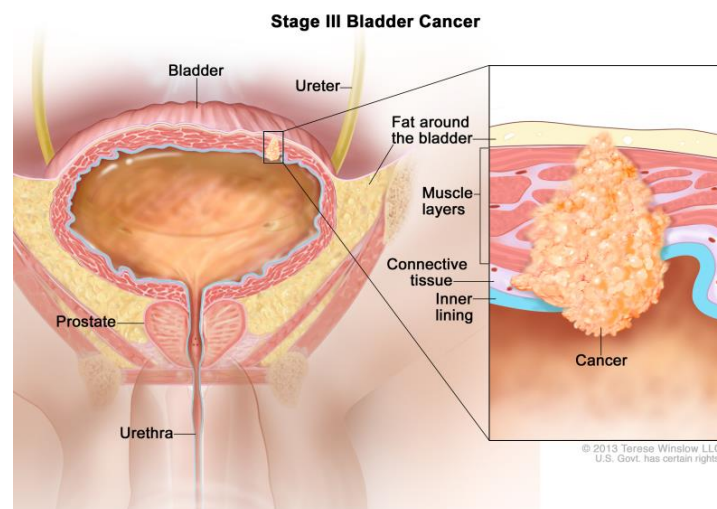
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)



Slika 5. Stadij II karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)

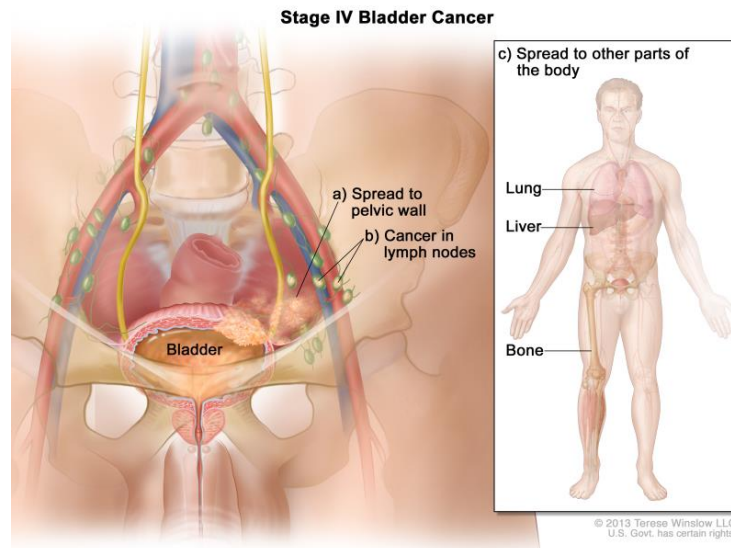


Slika 6. Stadij III karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)





Slika 7. Stadij IV karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)

### 1.2.5 LIJEČENJE

Liječenje karcinoma prijelaznog epitela se temelji na stupnju proširenosti bolesti. Stoga se razlikuje pristup neinvazivnom i invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti. Primarni oblik liječenja površinskog raka mokraćnog mjehura je transuretralna endoskopska resekcija (TUR). S obzirom na visoku stopu lokalnog povratka bolesti, nakon resekcija, potrebno je u tromjesečnim intervalima ponavljati cistoskopiju. Adjuvantno se intravezikalno aplicira imunoterapija ili kemoterapija. U imunoterapiji površinskog karcinoma mokraćnog mjehura primjenjuje se BCG (Bacillus Calmette-Guérin), dok se od citostatika najčešće primjenjuje mitomicin C. Rjeđe se primjenjuje doksorubicin. Nakon aplikacije citostatika bolesnik ne mokri jedan sat te hoda, kako bi se zadržao kontakt lijeka s endotelom. Intravezikalna imunoterapija i kemoterapija produljuju preživljenje bez znakova bolesti te smanjuju broj recidiva (5).

Osnovni oblik liječenja invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura jest radikalna cistektomija, s neoadjuvantnom kemoterapijom temeljenom na cisplatinu uz adjuvantnu kemoterapiju ovisno o patohistološkoj slici tumora, statusu regionalnih limfnih čvorova i stadiju bolesti. Rjeđe se primjenjuje parcijalna cistektomija. U izabranih se bolesnika može provesti konkomitantna kemoiradijacija (usporedna aplikacija radioterapije i kemoterapije

temeljene na cisplatinu) u svrhu očuvanja mokraćnog mjehura. Bolesnici koji zbog općeg stanja ili znatnog komorbiditeta ne mogu tolerirati kemoradioterapiju, samo se zrače. Metastatska se bolest liječi kemoterapijom i imunoterapijom. Danas je standardna prvolinijska kemoterapija kombinacija gemcitabina i cisplatina (GC protokol). Za pacijente koji ne mogu podnijeti liječenje cisplatinom u 1. liniji liječenja može se primjeniti imunoterapija atezolizumabom ili pembrolizumabom. U drugoj liniji liječenja anti-PD1 ili anti-PDL1 imunoterapija je preferirana terapijska opcija pred citostatskom terapijom te je pokazala izuzetnu djelotvornost kod raka mokraćnog mjehura (5).

## **1.3 RAK PLUĆA**

### **1.3.1 ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA**

Rak pluća je najčešći karcinom u svijetu, a procjenjuje se da je 2012. godine oboljelo 1,8 milijuna ljudi, što čini 12,9% svih novodijagnosticiranih zloćudnih tumora. S obzirom na lošu prognozu u takvih bolesnika, omjer umrlih i oboljelih od ove bolesti iznosi 0,87. Rak pluća zauzima vodeće mjesto po smrtnosti od zloćudnih bolesti. Godine 2012. od raka pluća umrlo je 1,59 milijuna ljudi, odnosno 19,4% svih umrlih od zloćudnih bolesti (7).

U Hrvatskoj je 2014.godine rak pluća u muškaraca prvi po incidenciji (stopa incidencije iznosi 55,9/100 000, 2128 je oboljelih, što predstavlja 19% svih zloćudnih bolesti) i po mortalitetu, a u žena je treći po incidenciji (stopa incidencije iznosi 16,1/100 000, 787 oboljelih, 8% svih zloćudnih bolesti), a drugi po mortalitetu. Vrh incidencije pojavljuje se u osmom desetljeću života (7).

Najvažniji čimbenik rizika za razvoj raka pluća jest aktivno pušenje cigareta, cigara ili lula. U cigareti postoji više od 50 kancerogenih spojeva: nitrozamini, policiklički aromatski ugljikovodici i anorganski spojevi (arsen). Učestalost raka pluća češća je kod ljudi nižeg socioekonomskog statusa i obrazovanja te u područjima jače onečišćenosti zraka što govori o važnoj ulozi inhalacijskih karcinogena u razvoju raka pluća, kao što su azbest, radioaktivni materijali, nikal krom i arsen. Pozitivna obiteljska anamneza je također važan čimbenik rizika (7).

### 1.3.2 KLINIČKA SLIKA

Simptomi i znakovi raka pluća mogu biti posljedica lokacije primarnog tumora ili kompresije susjednih torakalnih struktura, udaljenih metastaza ili paraneoplastičnih bolesti. Najčešći simptomi su kašalj koji se pogoršava i bol u prsištu. Ostali simptomi koji se mogu javiti jesu: hemoptiza, slabost, gubitak tjelesne težine, dispneja te promuklost (8).

### 1.3.3 DIJAGNOSTIKA I ODREĐIVANJE STADIJA BOLESTI

Postupci koji se koriste za utvrđivanje bolesti uključuju sljedeće: pregled povijesti bolesti, fizikalni pregled, rutinski laboratorijski testovi, rendgenski pregled toraksa, CT toraksa te biopsija (8).

Dijagnoza raka pluća postavlja se na osnovi patohistološke ili citološke potvrde bolesti. Patohistološka dijagnoza najčešće se postavlja pregledom bronhoskopski uzetog tkiva. Alternativno, citološka dijagnoza se postavlja analizom iskašljaja, odnosno bronhoskopski uzetih uzoraka (ispirak, otisak, bronhoalveolarna lavaža) (7).

Prije nego pacijent počne primati terapiju za rak pluća potrebno je patološki materijal dati patologu na procjenu. Ovisno o kojem je tipu raka pluća riječ, razlikovat će se terapijski pristup. Najvažnije dvije vrste raka pluća su rak pluća nemalih stanica i rak pluća malih stanica. Najčešći tipovi raka pluća nemalih stanica su: adenokarcinom, rak pločastih stanica te rak velikih stanica. Rak pluća malih stanica obično se uspješno liječi kemoterapijom i nije potrebno kirurško liječenje, dok je skupina raka pluća nemalih stanica generalno neosjetljiva na kemoterapiju i radioterapiju (8).

Za određivanje stadija bolesti primjenjuje se TNM klasifikacija (AJCC – American Joint Committee on Cancer) (Tablica 1., Tablica 2.) (7).

Tablica 2. Stadiji bolesti, petogodišnje preživljenje (7)

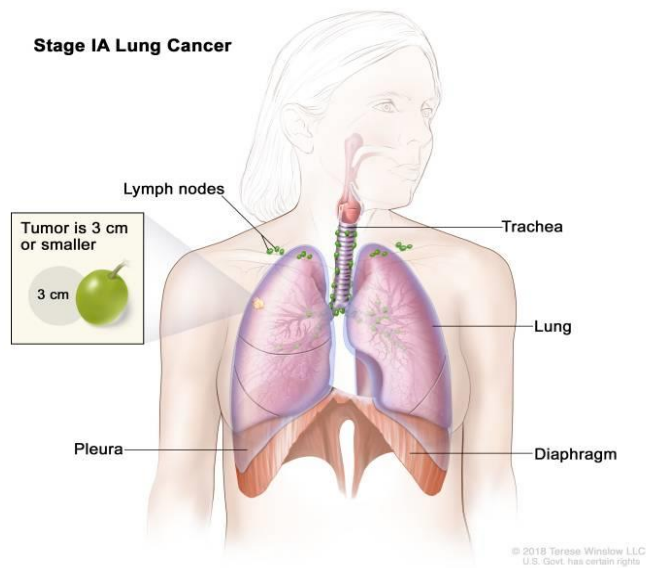
Stadij 0	Tis	N0	M0	
Stadij I A1	T1a(mi)	N0	M0	49%
	T1a	N0	M0	
	Stadij I A2	T1b	N0	
Stadij I A3	T1c	N0	M0	
Stadij I B	T2a	N0	M0	45%
Stadij II A	T2b	N0	M0	30%

Stadij II B	T1a-c	N1	M0	31%
	T2a	N1	M0	
	T2b	N1	M0	
	T3	N0	M0	
Stadij III A	T1a-c	N2	M0	14%
	T2a-b	N2	M0	
	T3	N1	M0	
	T4	N0	M0	
	T4	N1	M0	
Stadij III B	T1a-c	N3	M0	5%
	T2a-b	N3	M0	
	T3	N2	M0	
	T4	N2	M0	
Stadij III C	T3	N3	M0	
	T4	N3	M0	
Stadij IV A	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a	1%
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b	
Stadij IV B	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c	

Tablica 3. TNM klasifikacija karcinoma pluća (7)

Primarni tumor (T)	
TX	Primarni se tumor ne može procijeniti ili je tumor dokazan prisutnošću zloćudnih stanica u sputumu ili bronhalnom ispirku, ali se ne može vizualizirati slikovnim metodama ili bronhoskopijom
T0	Nema dokaza o postojanju tumora
Tis	karcinom in situ
T1	tumor $\leq 3$ cm u najvećem promjeru, okružen plućima ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopskog dokaza invazije proksimalno od lobarnog bronha (npr. tumor nije vidljiv u glavnom bronhu)
T1a(mi)	minimalno invazivan karcinom
T1a	tumor $\leq 1$ cm u najvećem promjeru
T1b	tumor $> 1$ cm, ali $\leq 2$ cm u najvećem promjeru

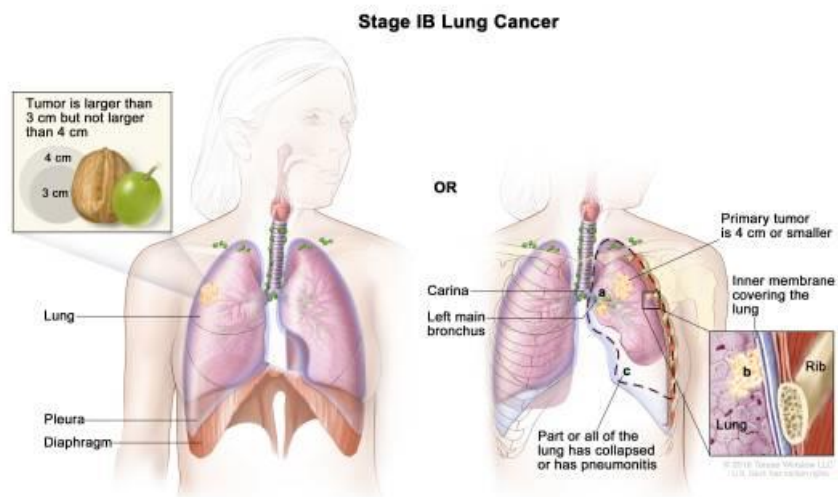
T1c	tumor > 2cm, ali ≤ 3 cm u najvećem promjeru
T2	tumor > 3cm, ali ≤ 5cm ili tumor sa bilo kojom od navedenih značajki: zahvaća glavni bronh neovisno o udaljenosti od karine ali ne zahvaća karinu, invadira visceralnu pleuru, povezan je s atelektazom ili opstruktivnim pnmeumonitisom koji se širi u hilarnu regiju te zahvaća dio ili cijela pluća
T2a	tumor > 3cm, ali ≤ 4cm u najvećem promjeru
T2b	tumor > 4cm, ali ≤ 5cm u najvećem promjeru
T3	tumor > 5cm, ali ≤ 7cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u istom režnju kao i primarni tumor ili tumor koji direktno zahvaća bilo koju od sljedećih struktura: stijenku prsnog koša (uključujući parijetalnu pleuru i tumore gornjeg sulkusa), frenički živac, parijetalni perikard
T4	Tumor > 7cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u različitom režnju ipsilateralnog pluća kao i primarni tumor ili tumor bilo koje veličine koji direktno zahvaća bilo koju od sljedećih struktura: ošit, medijastinum, srce, velike krvne žile, traheju, nervus laryngeus recurrens, jednjak, kralježnicu i karinu
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Nx	Ne može se procijeniti zahvaćenost limfnih čvorova
N0	Bez presadnica u regionalne limfne čvorove
N1	Presadnice u ipsilateralne peribronhalne i/ili ipsilateralne hilarne limfne čvorove i intrapulmonalne čvorove, uključujući i direktnu zahvaćenost
N2	Presadnice u ipsilateralne medijastinalne i/ili supkarinalne limfne čvorove
N3	Presadnice u kontralateralne medijastinalne, kontralateralne hilarne, ipsilateralne ili kontralateralne skalenske ili supraklavikularne limfne čvorove
Udaljene presadnice (M)	
Mx	nepoznato
M0	Bez udaljenih presadnica
M1	Prisutne udaljene presadnice
M1a	Odvojeni tumorski čvorovi u kontralateralno pluće; tumor sa pleuralnim ili perikardijalnim čvorovima ili maligni pleuralni ili perikardijalni izljev
M1b	Jedna ekstratorakalna presadnica
M1c	Multiple ekstratorakalne presadnice u jedan ili više organa



Slika 8. Stadij IA raka pluća

Preuzeto s:

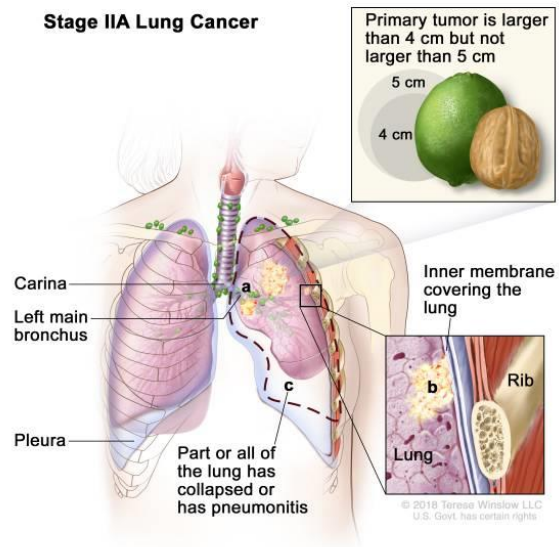
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kluQ15loK-kynjs9E>



Slika 9. Stadij IB raka pluća

Preuzeto s:

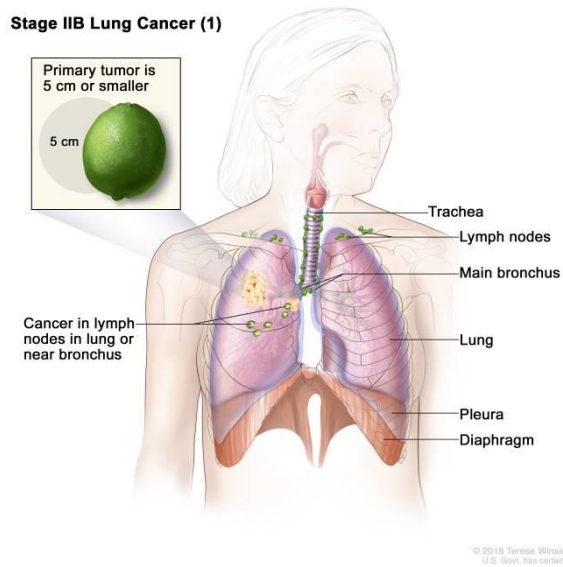
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kluQ15loK-kynjs9E>



Slika 10. Stadij IIA raka pluća

Preuzeto s:

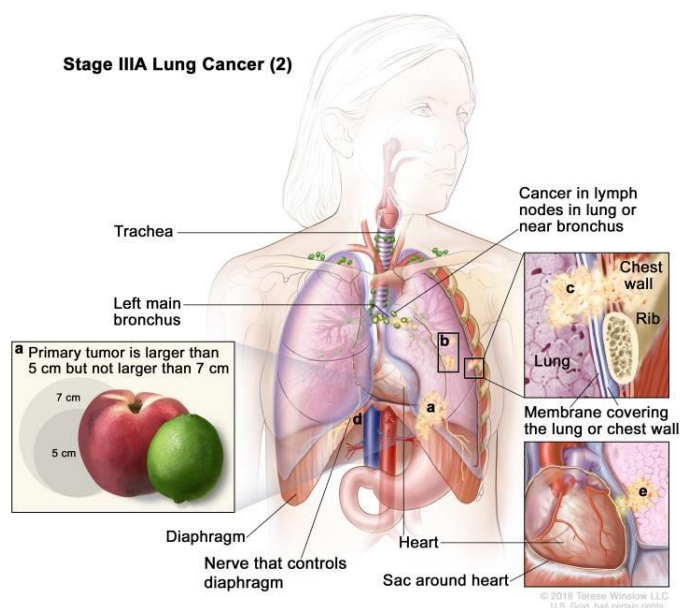
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ15loK-kynjs9E>



Slika 11. Stadij IIB raka pluća

Preuzeto s:

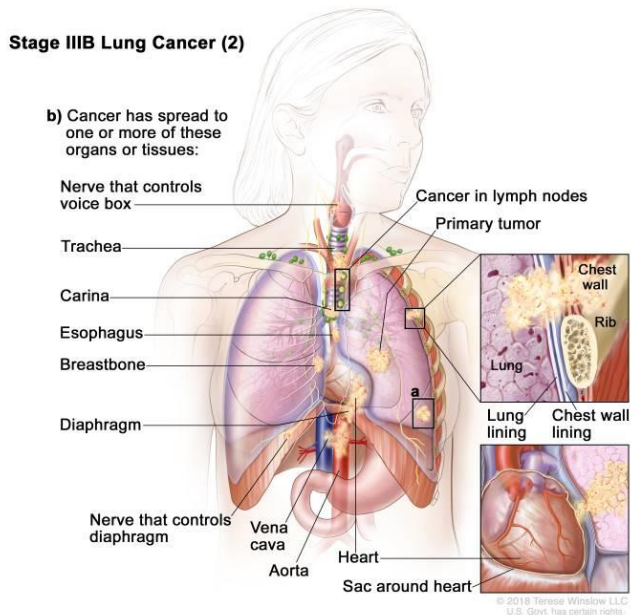
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ15loK-kynjs9E>



Slika 12. Stadij IIIA raka pluća

Preuzeto s:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfglc3G1kluQ15loK-kynjs9E>



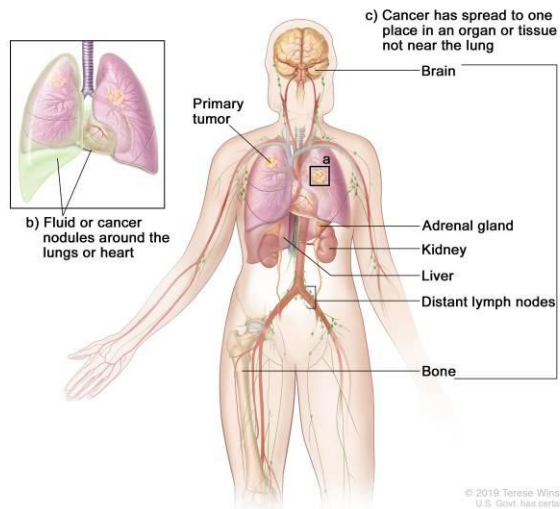
Slika 13. Stadij IIIB raka pluća

Preuzeto s:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfglc3G1kluQ15loK-kynjs9E>



### Stage IVA Lung Cancer

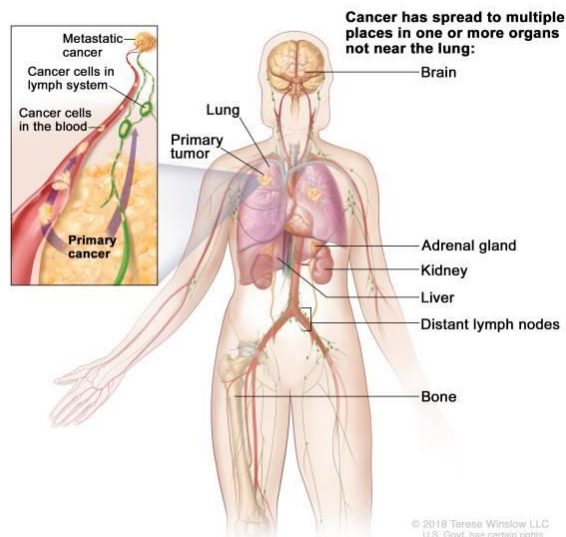


Slika 14. Stadij IVA raka pluća

Preuzeto s:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kluQ15loK-kynjs9E>

### Stage IVB Lung Cancer



Slika 15. Stadij IVB raka pluća

Preuzeto s:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kluQ15loK-kynjs9E>

### 1.3.4 LIJEČENJE

Terapijski izbor kod pacijenata oboljelih od raka pluća nemalih stanica ovisit će o pacijentovom stanju. U većini slučajeva potencijalno najkorisnija opcija jest kirurško liječenje kojem slijedi postoperativna kemoterapija (8).

Osnovu liječenja bolesnika s diseminiranom bolešću čini kemoterapija. Ukoliko je riječ o bolesniku dobrog općeg stanja ordinirat će se kemoterapija koja se temelji na kombinacijama spojiva platine (cisplatin, karboplatin) s drugim citostaticima, poglavito gemcitabinom, paklitakselom, docetakselom. Bolesnicima lošijeg općeg stanja i/ili onima starije životne dobi potrebno je ordinirati monokemoterapiju (7).

Posljednjih su se godina u kliničku praksu uspješno implementirale tzv. ciljane terapija koja svoj učinak ostvaruje inhibicijom pojedinih staničnih signalnih puteva koji inače omogućuju staničnu proliferaciju (bevacizumab, cetuksimab, osimertinib, itd.) te imunoterapija, terapija protutijelima usmjerenim na ključne molekule odgovorne za imunski odgovor (atezolizumab, durvalumab, itd.) (7).

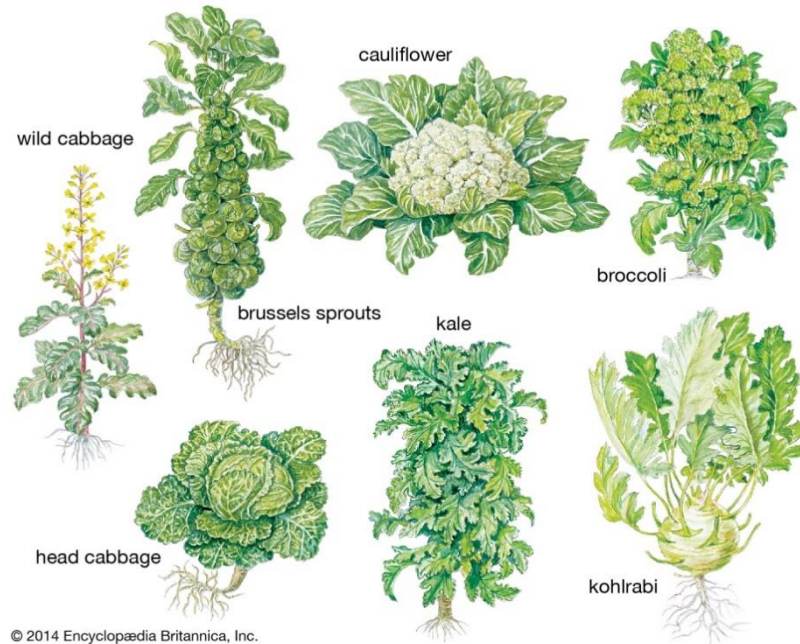
## 1.4 BRASSICA SPP.

*Brassica* spp., rod od 37 vrsta koje pripadaju porodici *Brassicaceae* od koji su mnoge važne poljoprivredne kulture. Vrste iz roda *Brassica* su porijetlom iz Europe i iz azijskih zemalja u kojima prevladava umjerena kontinentalna klima, a najčešće su u području Mediterana. Ekonomski najvažnije vrste uključuju brokulu, prokulicu, cvjetaču, kelj, korabu, uljanu repicu i sl. Biljke uglavnom imaju razdijeljene ili cjelovite listove, raspoređene naizmjenično, često su voštani i plavo-zelene boje. Većina vrsta su dvogodišnje biljke. Cvjetovi imaju četiri latice i nalaze se u obliku grozdastih cvatova te imaju suhe plodove poznate kao komuška ili komuščica, ovisno o njihovoj duljini (9).

Jedinstvena učinkovitost biljaka iz porodice krstašica (*Brassicaceae*) kod zaštite od neoplastičnih bolesti pripisuje se činjenici da su one najveći izvor glukozinolata u ljudskoj prehrani. Glukozinolate ( $\beta$ -tioglikozid-N-hidroksisulfati) hidrolizira biljni enzim mirozinaza kada su biljne stanice oštećene (npr. usitnjavanjem, žvakanjem i sl.) oslobađajući biološki aktivne izotiocijanate. Ako se enzim mirozinaza inaktivira, npr. kuhanjem, u ljudskom organizmu će se osloboditi izotiocijanati razgradnjom glukozinolata pomoću crijevnih bakterija. Glukozinoladni profili i koncentracije se razlikuju unutar pojedinih *Brassica* vrsta kao i kod različitih uvjeta rasta biljke (10). Hidrolizom glukozinolata pomoću mirozinaza ( $\beta$ -

tioglukozidaza) osim izotiocijanta nastaju i drugi produkti razgradnje kao što su tiocijanati, indoli, oksazolidin-2-tioni, epitionitrili i nitrili (11).

Biološke aktivnosti glukozinolata su raznolike. Modulacija signalnih puteva Nrf2 i NF- $\kappa$ B posebno je važna za prevenciju karcinoma jer oksidativni stres i upala značajno doprinose razvoju i progresiji karcinoma. Na različitim životinjskim modelima potvrđeno je da neki prirodni izotiocijanati i njihovi metaboliti inhibiraju razvoj kemijski induciranih karcinoma pluća, jetre, jednjaka, želudca, tankog i debelog crijeva te dojke (12).



Slika 16. Različite vrste biljaka iz porodice *Brassicaceae*

Preuzeto s: <https://www.britannica.com/plant/broccoli/media/1/80614/148670>

#### 1.4.1 *Brassica oleracea* var. *italica*

Brokula je dvogodišnja zeljasta biljka. Prve godine na zadebljalim stabljikama visine do 100 cm razvijaju se cvjetne, zelene glavice, dok tek druge godine biljka daje sjeme. Raste na sunčanom ili polusjenovitom mjestu, prozračnom tlu bogatom hranjivim tvarima. Jestivi su cvjetovi biljke sa stapkom te listovi (13).

Brokula sadrži veliku količinu antioksidansa koji mogu osigurati zaštitu od razvoja niza različitih bolesti. Cvijet brokule je bogat vitaminima, mineralima, vlaknima te sekundarnim metabolitima. Važna skupina bioaktivnih spojeva koje sadrži brokula su karotenoidi koje ljudi i životinje ne mogu sintetizirati te se moraju unositi hranom. No, brokula sadrži malu količinu masti koja je potrebna za apsorpciju karotenoida. Sadrži polifenole, one male molekularne mase s jednim aromatskim prstenom u strukturi, kao i

složene tanine te derivate polifenola. Glavni učinak polifenola jest antioksidativan učinak, ali pokazuju i protuupalni, anti-kancerogeni te antitrombotski učinak (14).



Slika 17. *Brassica oleracea* var. *italica*

Preuzeto s: <https://www.britannica.com/plant/broccoli/media/1/80614/138043>

#### **1.4.2 *Brassica oleracea* var. *gongylodes***

Koraba je, kao i brokula, dvogodišnja zeljasta biljka. Stabljika je u prvoj godini nerazgranata i naraste do 40 cm visine, a u drugoj godini se stvaraju cvjetovi skupljeni u produžene rahle grozdove. Cvjetovi su dvospolni, pravilni, čine ih četiri žute laticice, a prašnika je šest i sa svake strane prašnika se nalaze nektariji. Plod je komuška duga do 12 cm koja sadrži okrugaste, crvenkaste, male sjemenke. Jestivi dijelovi biljke su zadebljala stabljika i listovi. Ovisno o kultivaru razlikujemo zelene, bijele i ljubičaste sorte (15).

Jestivi izdanak korabe pokazuje znatan antioksidacijski učinak zahvaljujući visokom sadržaju fenola (luteolina, miricetina, apigenina i kemferola) te vitamina C. Fenoli i flavonoidi imaju i protuupalni učinak. Biljka sadrži veliku količinu izotiocijanata, sulforafana te indol-3-karbinola, spojeve za koje se smatra da sprječavaju nastanak raka prostate i raka debelog crijeva. Ekstrakt korabe, naročito ljubičaste korabe, pokazuje i snažan inhibicijski učinak prema PTP1B enzimu, enzimu za kojeg se tvrdi da ima veliki utjecaj na razvoj inzulinske rezistencije povezane s pretilošću te kod dijabetesa mellitusa koji nije ovisan o inzulinu (16).



Slika 18. *Brassica oleracea* var. *gongylodes*

Preuzeto s: <https://www.plantea.com.hr/koraba/#koraba-2>

### 1.4.3 *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*

Kupus je također svogodišnja zeljasta biljka. Stabljika je jednostavna, uspravna, nerazgranata i naraste do 60 cm visine no u fazi cvatnje naraste i do 2 metra. Korijen je vretenast, dug i razgranat. Na vrhu zadebljale stabljike nalazi se glavičasti pup sačinjen od savnutih listova. U drugoj godini stabljika stvara naizmjenične listove i cvjetove koji su skupljeni u rahle grozdaste cvatove. Cvjetovi su dvospolni, pravilni, karakterističnog izgleda za krstašice, s četiri žute latice smještene u križ. Plodovi su do 12 cm duge komuške koje sadrže 15-20 okruglih sjemenki. Postoje zelene, bijele i ljubičaste sorte. Ime vrste *oleracea* znači da je biljka upotrebljiva kao povrće. Listovi se konzumiraju sirovi, termički obrađeni ili ukiseljeni. Kupus sadrži mnogo vitamina i minerala, naročito vitamina C, no njegova prekomjerna konzumacija može uzrokovati nadutost zbog velike količine trisaharida rafinoze koju ljudsko tijelo ne može probaviti (17).

Crveni kupus ima karakterističnu ljubičasto-crvenu boju koja dolazi od antocijanina na bazi cijanidina koji nastaju acilacijom jedne ili više kiselina (kumarinska kiselina, sinapinska kiselina, kafeinska kiselina). Antocijanini pokazuju i antioksidativan i protuupalni učinak. Crveni kupus se često koristi u prehrambenoj industriji kao prirodna boja za hranu (18).



Slika 19. *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*

Preuzeto s:

[http://www.agroatlas.ru/en/content/cultural/Brassica\\_oleracea\\_capitata\\_rubra\\_K/index.html](http://www.agroatlas.ru/en/content/cultural/Brassica_oleracea_capitata_rubra_K/index.html)

## **2 CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja je utvrditi citotoksično djelovanje hlapljivih izolata određenih biljaka iz roda *Brassica* spp. dobivenih razgradnjom potpomognutom mikrovalovima na staničnoj liniji T24 karcinoma mokraćnog mjehura i staničnoj liniji A549 karcinoma pluća.



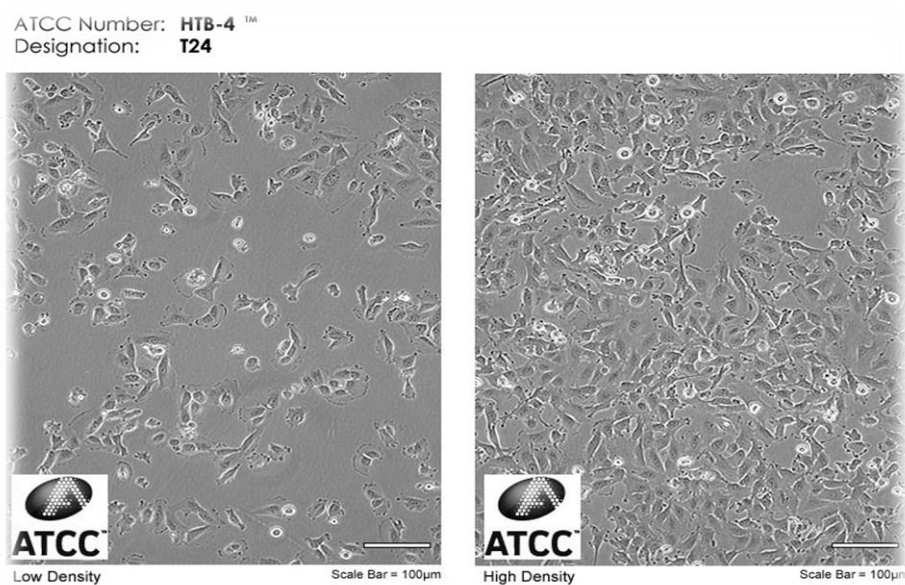
### **3 MATERIJALI I METODE**

### 3.1 STANIČNE LINIJE

*In vitro* istraživanje ispitivanja djelovanja određenih biljaka iz porodice kupusnjača se provodilo na karcinomskim stanicama T24 i A549. Obilježja tih staničnih linija su prikazana u tablicama.

Tablica 4. Obilježja T24 stanične linije (preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-4.aspx>)

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Tkivo</b>	mokraćni mjehur
<b>Forma proizvoda</b>	smrznuto
<b>Morfologija</b>	epitelna
<b>Obilježje kulture</b>	adherentna
<b>Bolest</b>	karcinom prijelaznih stanica
<b>Dob i spol</b>	81 godina, žena



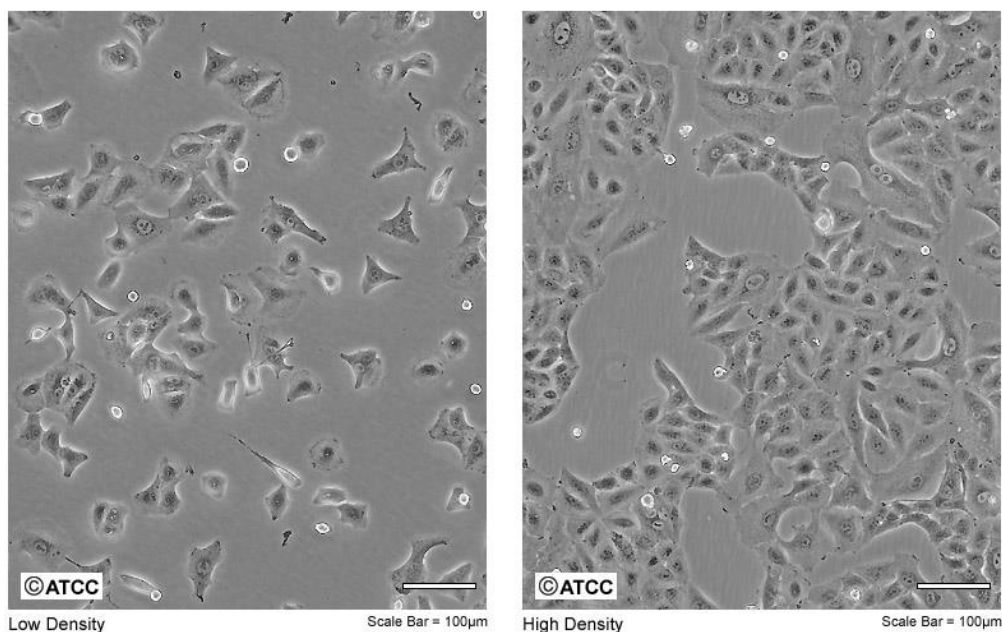
Slika 20. Karcinomske stanice T24 stanične linije

Preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/9/C/2/6/25933.ashx>

Tablica 5. Obilježja T24 stanične linije (preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#generalinformation>)

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Tkivo</b>	pluća
<b>Vrsta stanica</b>	epitelne
<b>Forma proizvoda</b>	smrznuto
<b>Morfologija</b>	epitelna
<b>Obilježje kulture</b>	adherentna
<b>Bolest</b>	karcinom
<b>Dob i spol</b>	58 godina, muškarac

ATCC Number: **CCL-185**  
Designation: **A-549**



Slika 21. Karcinomske stanice A549 stanične linije

Preuzeto s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CCL-185.ashx>

## 3.2 BILJNI MATERIJALI

### 3.2.1 *Brassica oleracea* var. *italica*

Tablica 6. Taksonomija *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck (19)

<b>Porodica</b>	<i>Brassicaceae</i> (alt. <i>Cruciferae</i> )
<b>Pleme</b>	<i>Brassiceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Brassica</i>
<b>Vrsta</b>	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck
<b>Sinonimi</b>	<i>Brassica oleracea</i> subvar. <i>cymosa</i> Duchesne <i>Brassica oleracea</i> var. <i>cymosa</i> (Duchesne) DC.
<b>Uobičajena imena</b>	Brokula, ljubičasta brokula, zimska brokula, itd.
<b>Ekonomska važnost</b>	Hrana (povrće) Lijek u tradicionalnoj medicini Otrov za preživaače

### 3.2.2 *Brassica oleracea* var. *gongylodes*

Tablica 7. Taksonomija *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L. (20)

<b>Porodica</b>	<i>Brassicaceae</i> (alt. <i>Cruciferae</i> )
<b>Pleme</b>	<i>Brassiceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Brassica</i>
<b>Vrsta</b>	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gongylodes</i> L.
<b>Sinonimi</b>	<i>Brassica caulorapa</i> (DC.) Pasq. <i>Brassica gongylodes</i> (L.) Mill. <i>Brassica oleracea</i> subsp. <i>gongylodes</i> (L.) Schübl. & G. Martens <i>Brassica oleracea</i> var. <i>caulorapa</i> DC.
<b>Uobičajena imena</b>	Koraba, zeljasta repa, repa, itd.
<b>Ekonomska važnost</b>	Hrana (povrće)

### 3.2.3 *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*

Tablica 8. Taksonomija *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* (21)

<b>Porodica</b>	<i>Brassicaceae</i> (alt. <i>Cruciferae</i> )
<b>Pleme</b>	<i>Brassiceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Brassica</i>
<b>Vrsta</b>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>rubra</i> L.
<b>Sinonimi</b>	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L. <i>Brassica oleracea</i> f. <i>alba</i> DC. <i>Brassica oleracea</i> subsp. <i>capitata</i> (L.) Schübl. & G. Martens <i>Brassica oleracea</i> var. <i>conica</i> DC.
<b>Uobičajena imena</b>	Kupus, crveni kupus, bijeli kupus, itd.
<b>Ekonomska važnost</b>	Hrana (povrće) Lijek u tradicionalnoj medicini, potencijalno kao sustav isporuke za cjepiva i lijekove u jestivom obliku Otrov za domaće životinje

### 3.3 POSTUPAK

Nakon odmrzavanja stanične linije su uzgojene u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru na temperaturi 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. DMEM medij sadrži FBS (goveđi serum), potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline i minerali, te antibiotike i Red fenol indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti.

Adherirane stanice, nakon uklanjanja DMEM-a, odvojene su od podloge enzimom tripsinom.

Brojanje stanica odvija se tako da se 10 µl stanica pomiješa s 90 µl Trypan Blue boje koja oboji mrtve stanice i omogućava brojenje živih stanica koje nisu obojane. Zatim se jednak broj stanica presađuje u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu.

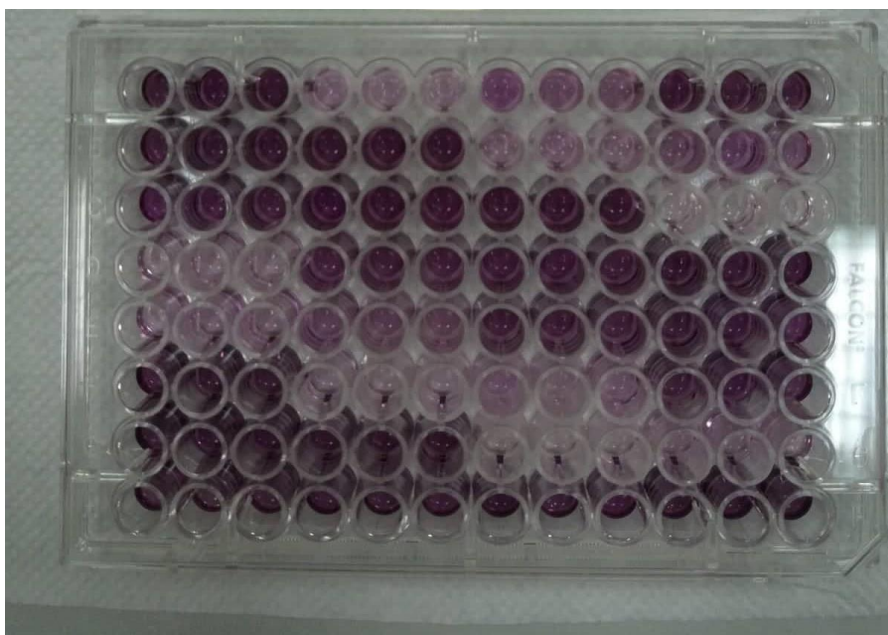
U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim vodenim otopinama izolata kupusnjača u koncentracijama 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Šest jažica koje predstavljaju kontrolu su ostavljene u samom mediju te u njih nisu dodani izolati kupusnjača.



Slika 22. Vlažni inkubator za uzgoj stanica (Preuzeto s: <http://www.nuve.com.tr/> )

### 3.4 TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Živost i proliferacija stanice određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu. MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) je prah žute boje koji se pripremi otapanjem u fosfatnom puferu (PBS). U metabolički aktivnim stanicama se reducira, dok ga metabolički neaktivne stanice ne vežu. Metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Odumrle stanice nemaju sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Novonastali unutarstanični ljubičasti spoj se može mjeriti spektrofotometrijski, a da bi se mogla očitati apsorbancija potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid). Sat vremena nakon što se doda MTT, supernatant se odsiše i doda se DMSO. Pločice su inkubirane na 37°C uz treskanje tijekom 10 minuta. Apsorbancija je mjerena na 570 nm.



Slika 23. Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO

Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama izolata biljaka te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih dijelova biljaka.



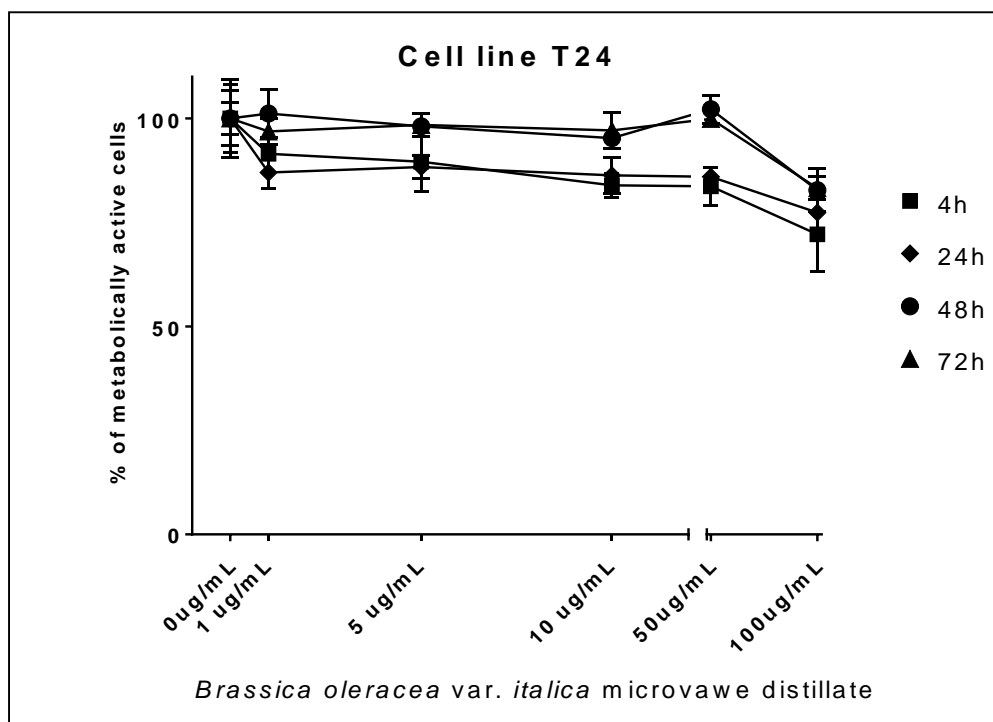
## **4 REZULTATI**

## Empirijska obrada:

Kao ograničenje uzima se premala serija podataka.

### 4.1 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA- STANIČNA LINIJA T24

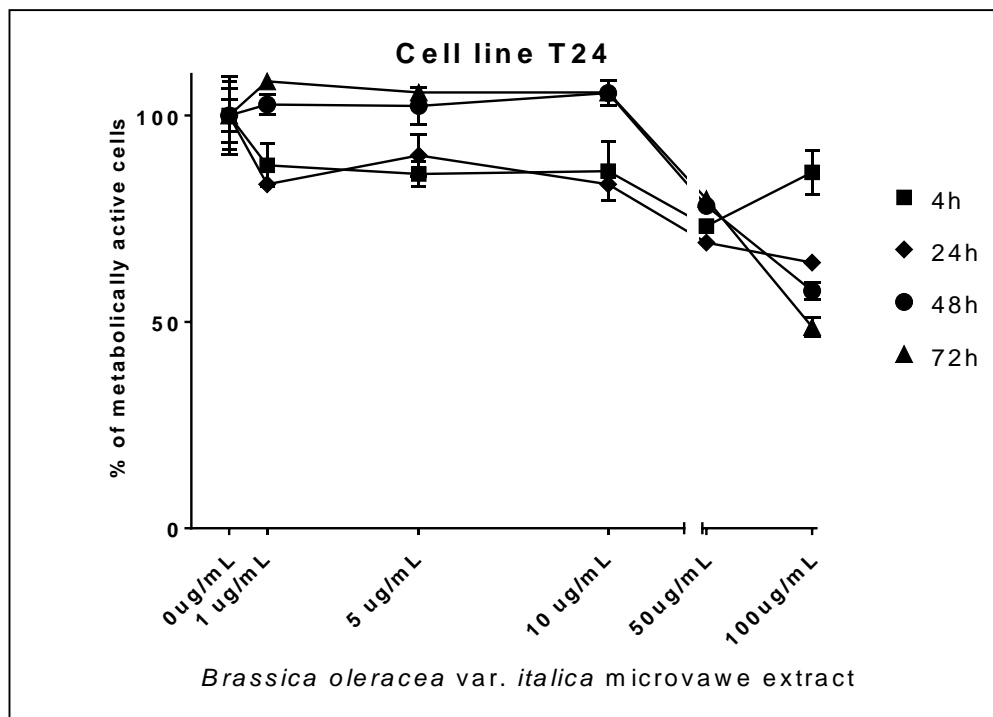
#### 4.1.1 *Brassica oleracea* var. *italica* – mikrovalni destilat



	4h	24h	48h	72h
IC50	Not determined	Not determined	Not determined	Not determined

Slika 24. Mikrovalni destilat *Brassica oleracea* var. *italica* najbolji učinak ostvaruje već nakon 4h za koncentraciju od 100 µg/mL. Daljnjom inkubacijom pri istoj koncentraciji dolazi do oporavka stanica.

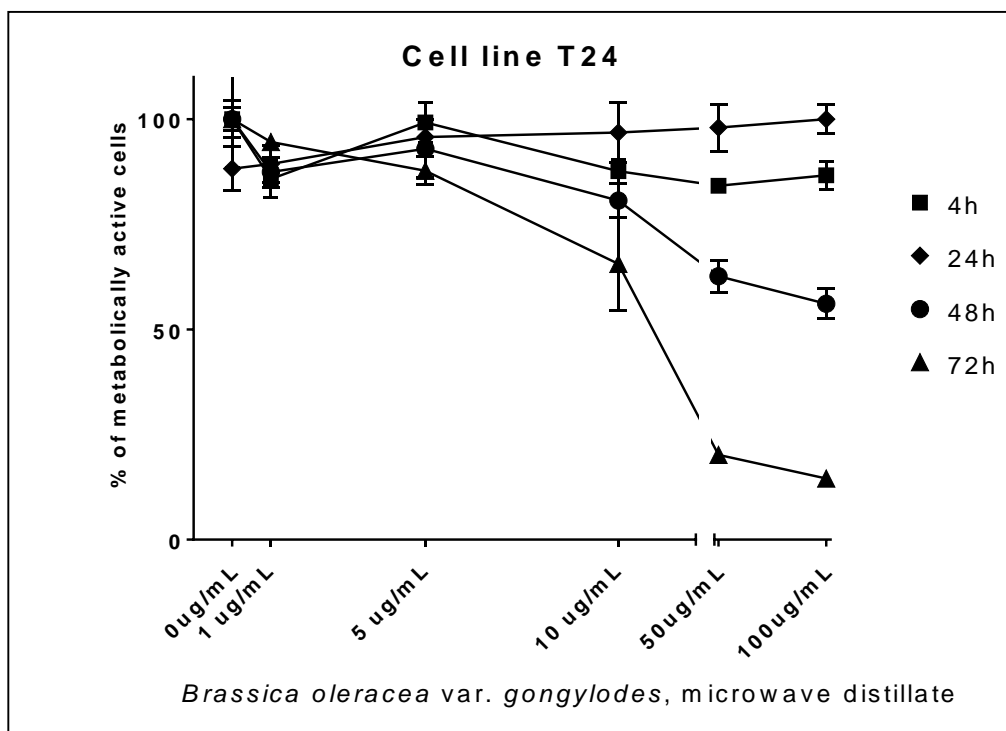
#### 4.1.2 *Brassica oleracea* var. *italica* – mikrovalni ekstrakt



	4h	24h	48h	72h
IC50	Not determined	Not determined	Not determined	Not determined

Slika 25. Mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* var. *italica* najbolji učinak ostvaruje pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Pri koncentraciji od 100 µg/mL povećanjem vremena inkubacije broj metabolički aktivnih stanica se smanjuje.

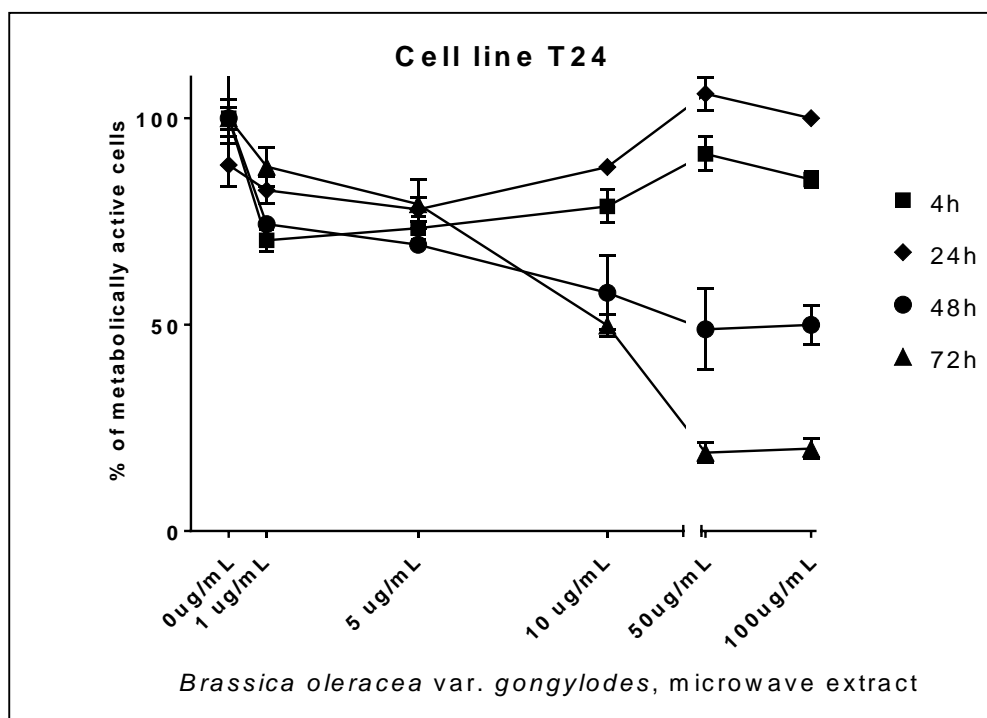
### 4.1.3 *Brassica oleracea* var. *gongylodes* – mikrovalni destilat



	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	96.18	18.69

Slika 26. Mikrovalni destilat *Brassica oleracea* var. *gongylodes* pokazuje značajan učinak već pri koncentraciji od 10  $\mu\text{g/mL}$  nakon 72h. Najbolji učinak pokazuje nakon istog vremena inkubacije pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$ .

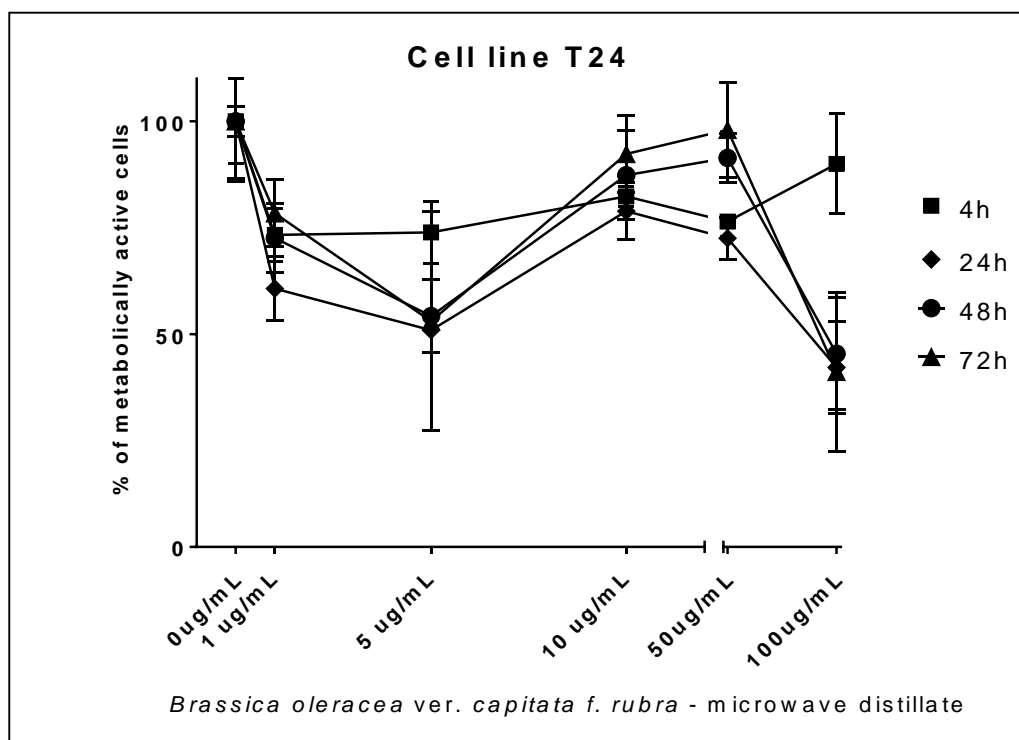
#### 4.1.4 *Brassica oleracea* var. *gongylodes* – mikrovalni ekstrakt



	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	37	13.03

Slika 27. Mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* var. *gongylodes* značajan učinak pokazuje već nakon 4h inkubacije pri koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$ . Najbolji učinak ostvaruje pri koncentraciji od 50  $\mu\text{g/mL}$  nakon 72h inkubacije.

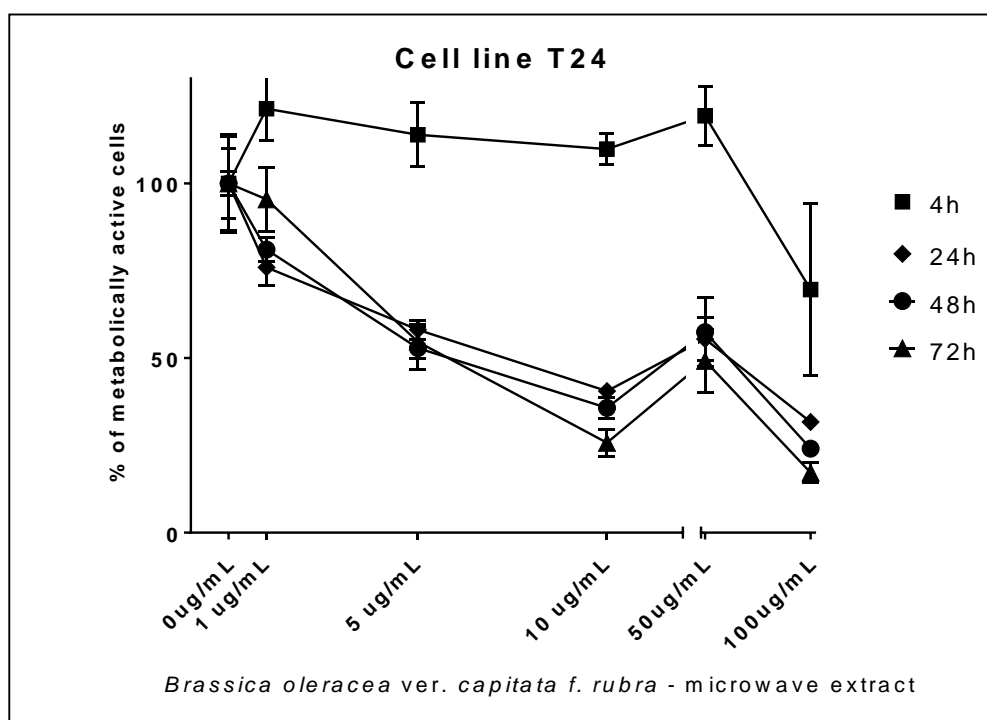
#### 4.1.5 *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* – mikrovalni destilat



	4h	24h	48h	72h
IC50	Not determined	Not determined	determined	Not determined

Slika 28. Mikrovalni destilat *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* značajan učinak pokazuje već pri koncentraciji od 1 µg/mL nakon 24h inkubacije. Najbolji učinak pokazuje nakon 72h inkubacije pri koncentraciji od 100 µg/mL.

#### 4.1.6 *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* – mikrovalni ekstrakt

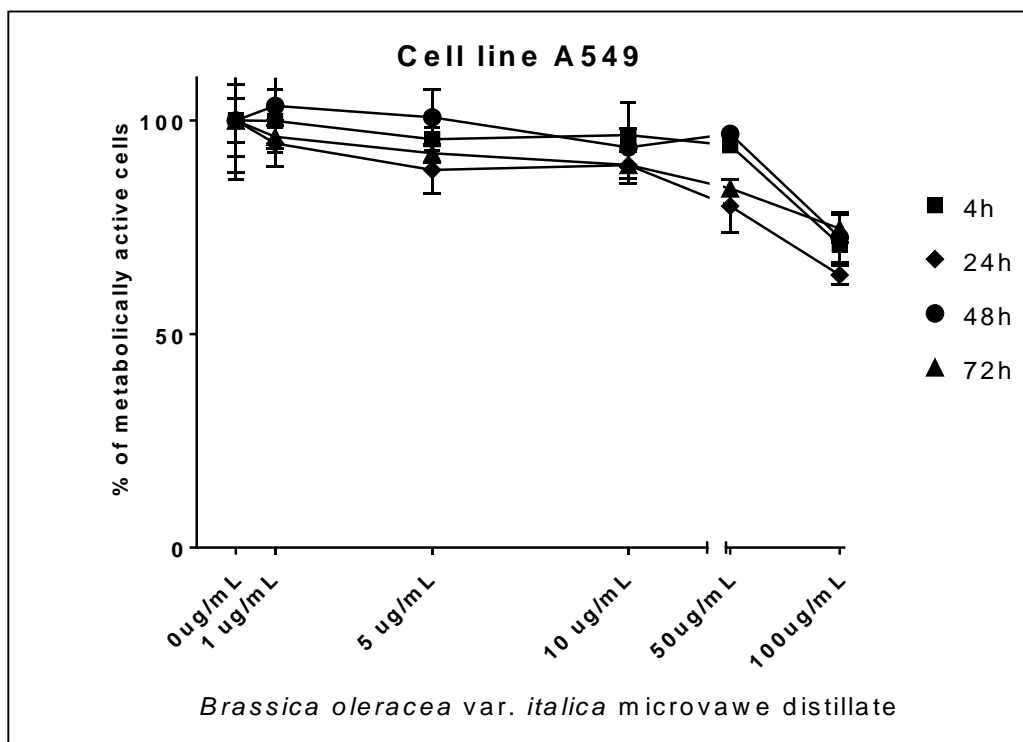


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	12.74	9.329	7.519

Slika 29. Mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* značajan učinak ostvaruje već pri koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$  nakon 24h inkubacije. Najbolji učinak ostvaruje nakon 72h inkubacije pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$ . Pri istoj koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$  povećanjem vremena inkubacije smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

## 4.2 KARCINOM PLUĆA – STANIČNA LINIJA A549

### 4.2.1 *Brassica oleracea* var. *italica* – mikrovalni destilat

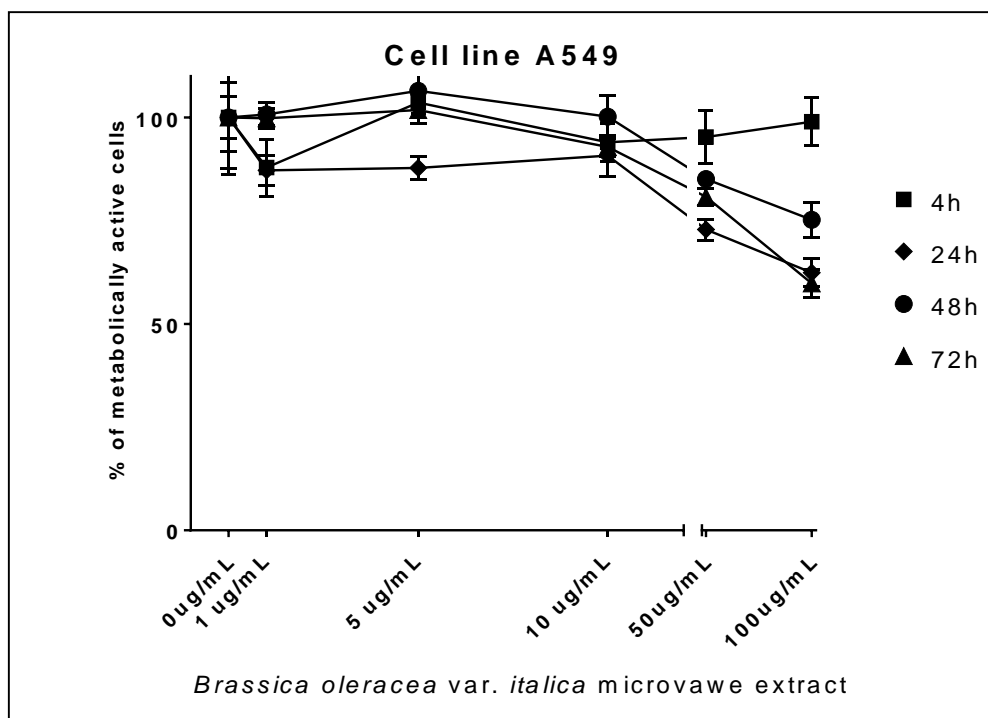


	4h	24h	48h	72h
IC50		Not determined	Not determined	Not determined

Slika 30. Mikrovalni destilat *Brassica oleracea* var. *italica* najbolji učinak ostvaruje pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 24h inkubacije.



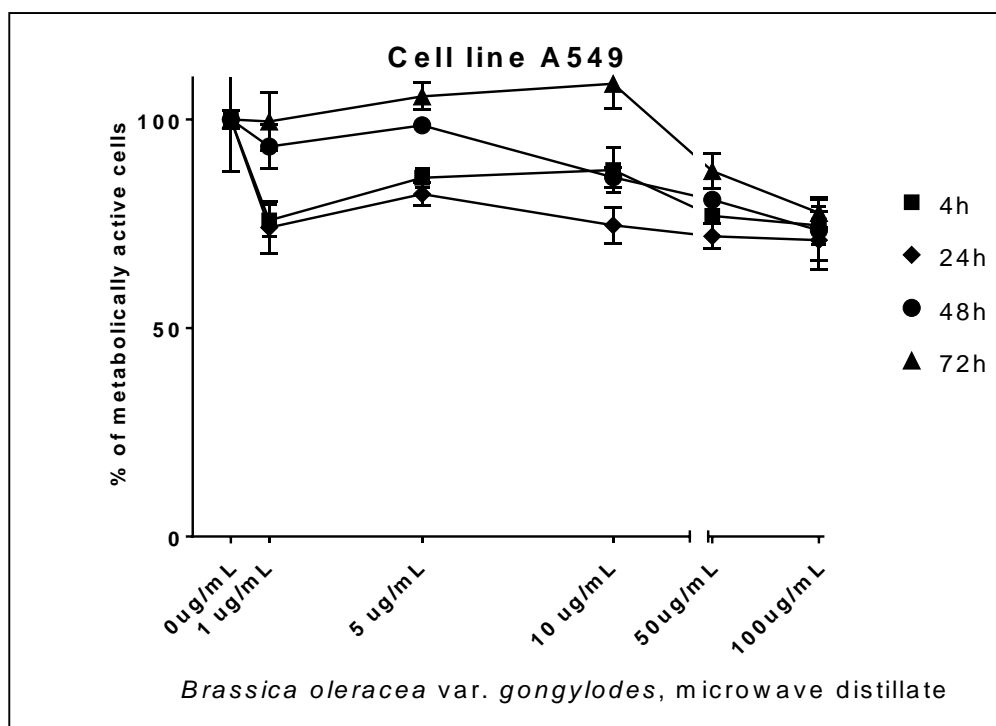
#### 4.2.2 *Brassica oleracea* var. *italica* – mikrovalni ekstrakt



	4h	24h	48h	72h
IC50		Not determined	Not determined	Not determined

Slika 31. Mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* var. *italica* najbolji učinak ostvaruje pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

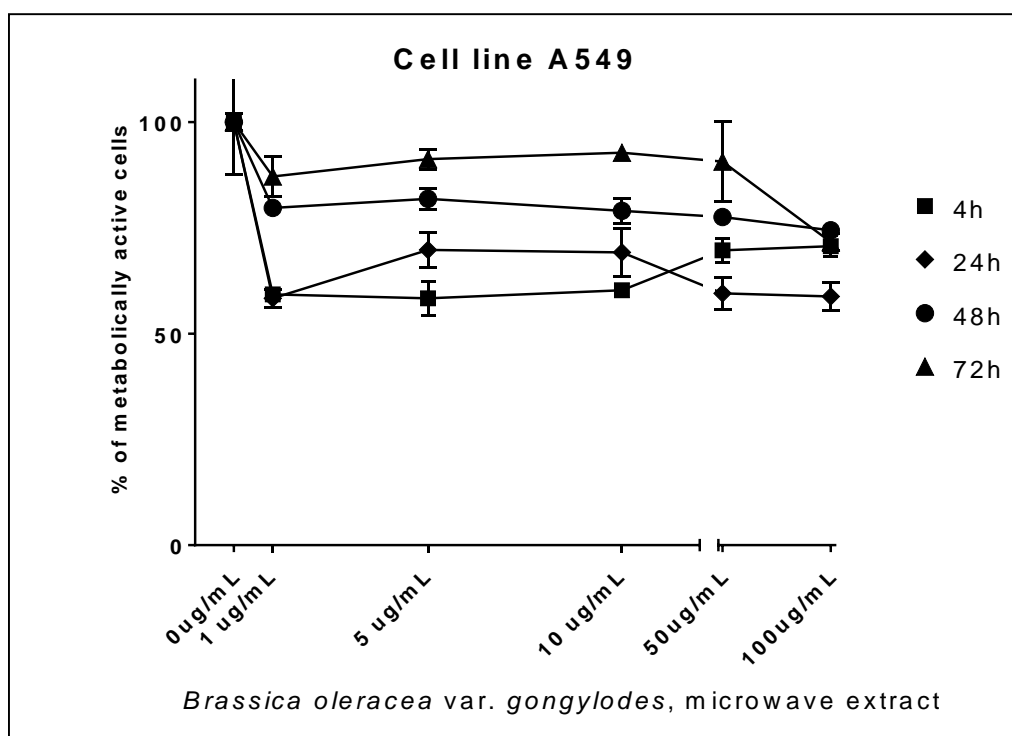
### 4.2.3 *Brassica oleracea* var. *gongylodes* – mikrovalni destilat



	4h	24h	48h	72h
IC50	Not determined	Not determined	determined	determined

Slika 32. Mikrovalni destilat *Brassica oleracea* var. *gongylodes* najbolji učinak ostvaruje pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

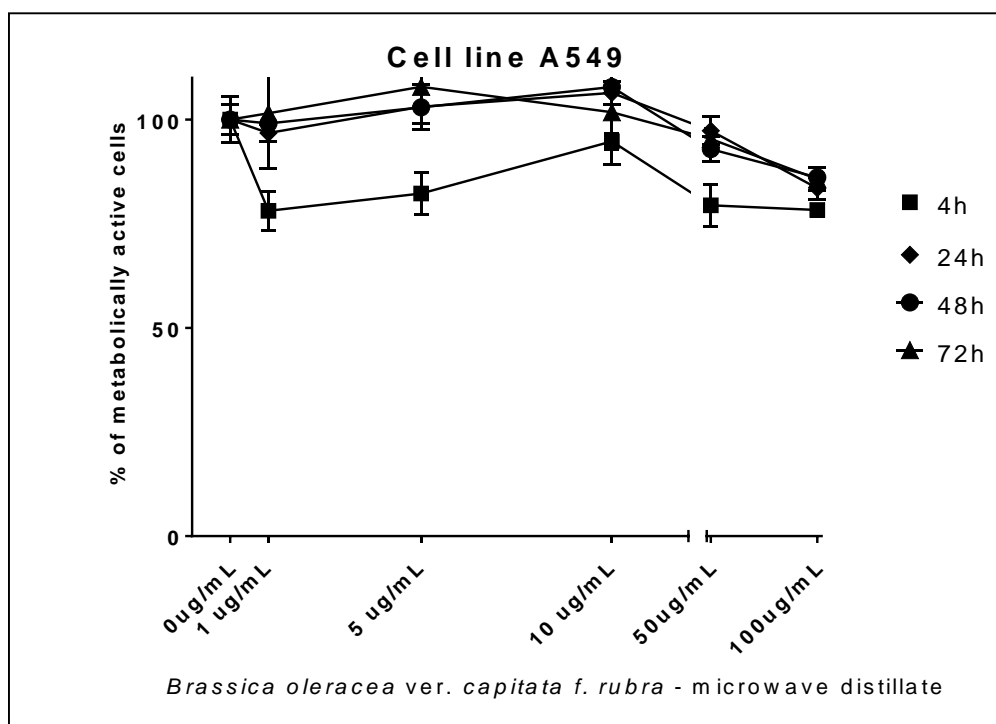
#### 4.2.4 *Brassica oleracea* var. *gongylodes* – mikrovalni ekstrakt



	4h	24h	48h	72h
IC50		Not determined	Not determined	Not determined

Slika 33. Mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* var. *gongylodes* značajan učinak pokazuje pri koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$  nakon 4h inkubacije. Daljnim povećanjem koncentracije dolazi do oporavka stanica. Najbolji učinak ostvaruje pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$  nakon 24h inkubacije.

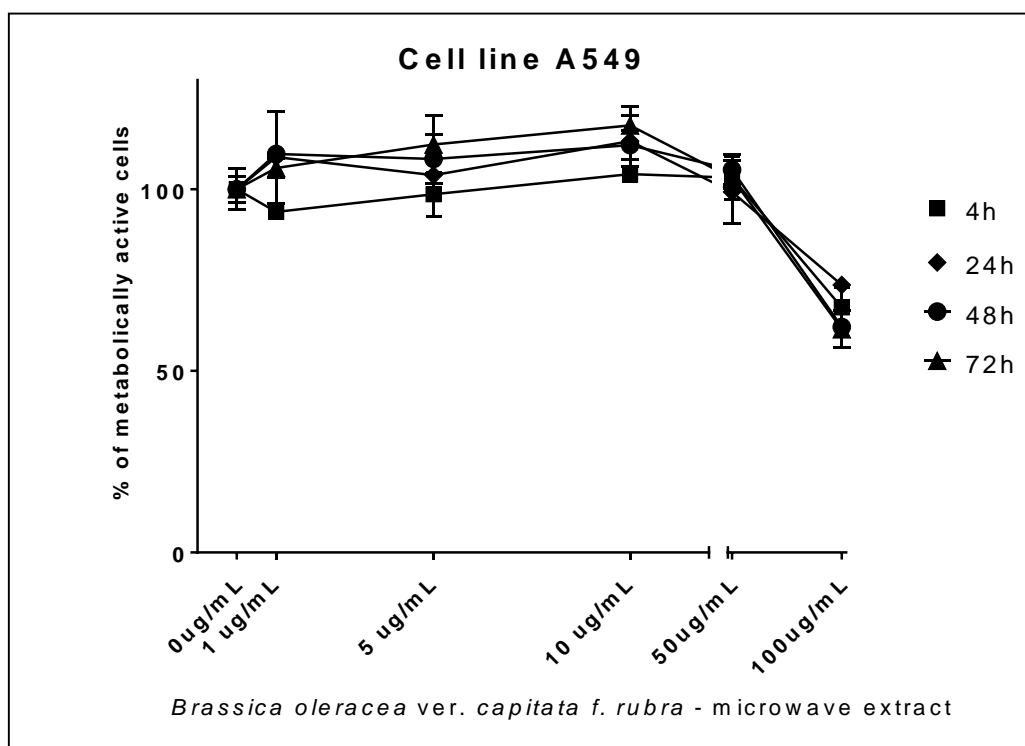
#### 4.2.5 *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* – mikrovalni destilat



	4h	24h	48h	72h
IC50		Not determined	Not determined	Not determined

Slika 34. Mikrovalni destilat *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* najbolji učinak pokazuje pri koncentraciji od 1 µg/mL nakon 4h inkubacije. Daljnim povećanjem koncentracije i vremena inkubacije dolazi do oporavka stanica.

#### 4.2.6 *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* – mikrovalni ekstrakt

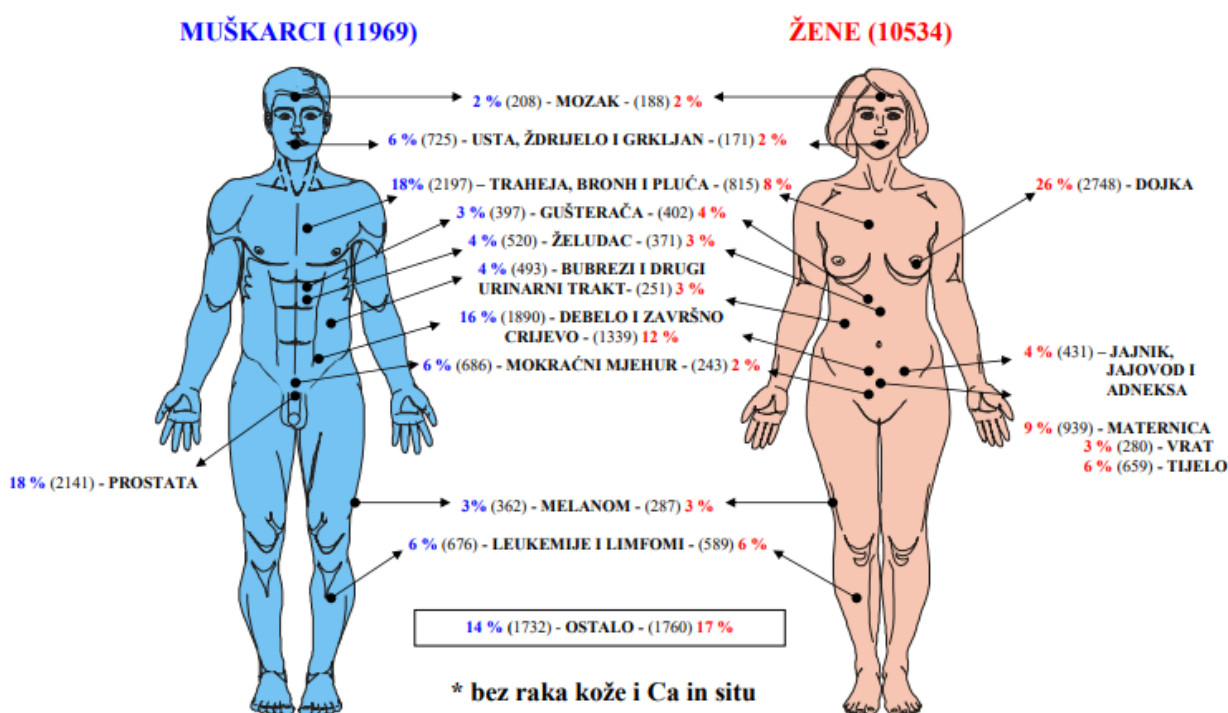


	4h	24h	48h	72h
IC50		Not determined	Not determined	Not determined

Slika 35. Mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* najbolji učinak ostvaruje pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$  nakon 72h inkubacije.

## **5 RASPRAVA**

Karcinom je životno ugrožavajuća bolest karakterizirana abnormalnom proliferacijom stanica koje upadaju u susjedna tkiva i uzrokuju uništavanje tih tkiva. Karcinom se širi na udaljene organe kroz krvotok i limfni sustav. Često je nemoguće odrediti specifičan uzrok za svaku vrstu karcinoma. Međutim, postoje određeni čimbenici koji povećavaju rizik od karcinoma kao što su uporaba duhana i alkohola, zagađivači okoliša, infektivna sredstava i promjene životnih navika. Otprilike 10% do 15% karcinoma je potpuno nasljedno. U svijetu se godišnje javlja više od 6 milijuna smrtnih slučajeva od karcinoma. 2008. godine dijagnosticirano je oko 12,7 milijuna karcinoma i prijavljeno 7,6 milijuna smrtnih slučajeva. Karcinom je ozbiljno zdravstveno pitanje razvijenih zemalja i zemalja u razvoju. U 2012. godini procijenjeno je oko 14,1 milijuna slučajeva u cijelom svijetu, od toga 7,4 milijuna muškaraca i 6,4 milijuna žena. Očekuje se povećanje tog broja na 24 milijuna do 2035. godine (22).



Slika 36. Raspodjela novooboljelih od raka prema sijelima u 2015. godini u Republici Hrvatskoj

(Preuzeto s: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten\\_2015\\_rak\\_final.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf))

Rak mokraćnog mjehura je deveti najčešći rak u svijetu i sedmi je najčešći u svijetu kod muškaraca. Procjenjuje se da se godišnje dijagnosticira oko 430 000 novih slučajeva sa 165 000 smrtnih slučajeva. Tri četvrtine novih slučajeva se javlja kod muškaraca, ali kod žena

je veća smrtnost. Razlozi nejednakosti u spolnoj incidenciji i smrtnosti uključuju razlike u hormonskim profilima (spolnih hormona). Žene imaju viši stupanj dijagnosticiranja raka mokraćnog mjehura zbog češćih urinarnih infekcija koje karakteriziraju iritativni simptomi donjeg mokraćnog sustava. Učestalost karcinoma mokraćnog mjehura se povećava s godinama i češći je u razvijenim zemljama. Najčešći faktor rizika za razvoj raka mokraćnog mjehura je dim cigareta i kancerogeni spojevi kojima su osobe izložene na radnom mjestu ili u okolišu. Smatra se da je pušenje cigareta uzrok 50% karcinoma mokraćnog mjehura. Kancerogeni spojevi kojima su izložene osobe na radnom mjestu uzrokuju oko 6% karcinoma mokraćnog mjehura. Neki od njih su: benzidin, orto-toluidin, 2-nafilamin, 4-aminobifenil i 4,4'-metilen-bis (2-kloroanilin) (MBOCA). Ostali potencijalni uzroci mogu biti terapija ciklofosfamidom, pioglitazonom ili infekcija sa *Schistosoma Haematobiu* (23).

Rak pluća (malih i nemalih stanica) je drugi najčešći rak kod muškaraca i žena (ne računajući rak kože). Kod muškaraca rak prostate je češći, dok je kod žena rak dojke. Oko 13% svih novih karcinoma su rak pluća. Procjene za 2019. godinu za SAD su oko 228 150 dijagnosticiranih raka pluća te oko 142 670 smrtnih slučajeva. Rak pluća je najveći uzrok smrti od raka kod muškaraca i žena. Rak pluća uglavnom se javlja kod starijih osoba. Većina ljudi s dijagnozom raka pluća ima 65 ili više godina, dok je vrlo mali broj ljudi dijagnosticiran mlađi od 45 godina. Prosječna dob u trenutku postavljanja dijagnoze je oko 70 godina (24). Najčešći uzrok raka pluća je pušenje cigareta, cigara i lula. Smatra se da je oko 80% smrti od raka pluća rezultat pušenja. Neki od potencijalnih uzročnika su: azbest, radon, ispušni plinovi iz automobila, osobna ili obiteljska anamneza raka pluća (25).

Konvencionalni načini liječenja raka uključuju antitumorske lijekove, kiruršku resekciju, lokalno ciljane terapije poput zračenja, radiofrekvencijsku ablaciju i fotodinamičku terapiju. Pored toga, uz zapažen napredak u razumijevanju molekularne patogeneze različitih vrsta raka, razvijene su nove generacije ciljanih antitumorskih lijekova, kao što su trastuzumab (HER2 pozitivan rak dojke) te tamoksifen (rak dojke pozitivan na estrogenski receptor). Razvijanje novih strategija usmjerenih na poboljšanje osjetljivosti na kemoterapiju i smanjenje štetnih nuspojava od presudne je važnosti za postizanje zadovoljnih terapijskih rezultata za oboljele od karcinoma i poboljšanje njihove kvalitete života (26). Lijekovi biljnog podrijetla su također poželjan način liječenja karcinoma jer se lakše podnose i nisu otrovni za ljudske stanice. Međutim, postoje iznimke kao što su cijanogenetski glikozidi, lektini, saponini, lignani, lektini i neki taksani. Lijekovi biljnog podrijetla mogu se podijeliti u četiri klase lijekova sa sljedećim aktivnostima; inhibitori metiltransferaze, antioksidansi, inhibitori



histon deacetilaze (HDAC) i mitotski disruptori. Spojevi koji uključuju sulforafan, izotiocijanate, izoflavone i pomiferin smatraju se inhibitorima HDAC. Inhibiraju aktivnost kancerogenih proteina. Na primjer, pokazalo se da sulforafan inhibira važne mete u proliferaciji karcinoma dojke. Smanjena ekspresija ER, EGFR i HER-2 nastala je kao rezultat inhibicije HDAC tretmanom sulforafanom u staničnoj liniji karcinoma dojke. U stanicama raka, geni koji su epigenetski utišani, funkcionalni za acetilaciju kromatina, ponovno se aktiviraju pomoću HDAC inhibitora i stanice raka tada mogu ući u programiranu staničnu smrt (apoptozu). Spojevi dobiveni iz biljaka koji pokazuju inhibiciju HDAC-a mogu povećati kemoterapijsku osjetljivost karcinoma. Derivati vinka alkaloida, vinkristin, vinblastin, vinorelbin, vindesin i vinflunin su lijekovi koji inhibiraju dinamiku mikrotubula vezanjem na  $\beta$ -tubulin. Taksani kao što su paklitaksel i njegov analogni docetaksel su razarači mikrotubula. Ovi spojevi inhibiraju fazni prijelaz staničnog ciklusa iz metafaze u anafazu uzrokujući zaustavljanje i apoptozu staničnog ciklusa (27).

Mnoge *in vitro* i *in vivo* studije ukazuju na mogući preventivni i antitumorski učinak preparata kupusnjača i njihovih spojeva. Pregledom 10 izvornih publikacija uočeno je da je velika potrošnja kupusnjača povezana sa značajno smanjenim rizikom za razvoj karcinoma pluća kod žena (relativni rizik, RR: 0,75; 95% CI 0,63–0,89). Povezanost između konzumacije kupusnjača i rizika za razvoj karcinoma pluća je veća kod žena koje nisu pušači (28). Pregledom 7 studija uočen je smanjeni rizik za razvitak karcinoma mokraćnog mjehura povezan s konzumacijom kupusnjača (relativni rizik 0.85). Studije su prilagođene statusu pušenja (29).

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su ekstrakti i destilati biljnih vrsta *Brassica oleracea* var. *italica*, *Brassica oleracea* var. *gongylodes* i *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*, odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije humanog karcinoma: T24 (karcinom mokraćnog mjehura) te A549 (karcinom pluća nemalih stanica).

Utjecaj na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24 kod većine korištenih ekstrakata je značajan pri nižim koncentracijama od 1  $\mu$ g/mL i 10  $\mu$ g/mL, a najbolji učinak ostvaruje mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* pri koncentraciji od 100  $\mu$ g/mL nakon 72h inkubacije.

*In vitro* istraživanje na stanicama karcinoma pluća A549 pokazalo je da svi ekstrakti imaju određeni učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica pri svim koncentracijama, a najbolji učinak ostvaruje mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* pri koncentraciji od 100  $\mu$ g/mL nakon 72h inkubacije.

Na temelju navedenih rezultata, vidljivo je da biljne vrste iz roda *Brassica* i spojevi izolirani iz njih imaju veliki potencijal za nadopunu liječenja različitih bolesti, a posebno su važna njihova kemoprevencijska i antitumorska svojstva, koja smo u našem *in vitro* ispitivanju pokazali na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura (stanična linija T24) i stanicama karcinoma pluća (stanična linija A549). Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica, tj, citotoksični učinak povezan je s koncentracijom i vremenu izlaganja, te je glavna hipoteza potvrđena i cilj istraživanja je ostvaren. Potrebno je provesti dodatna *in vivo* istraživanja, koja će utvrditi pozitivne učinke, kako bi se ovi spojevi ili lijekovi temeljeni na njihovoj strukturi, mogli uvrstiti u terapiju različitih bolesti.

## **6 ZAKLJUČAK**

- 1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i stanica karcinoma pluća (A549) ekstraktima i destilatima izoliranim iz biljnog roda *Brassica spp.* dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.
- 2) Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica stanične linije T24 karcinoma mokraćnog mjehura i stanične linije A549 karcinoma pluća ima mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.
- 3) Ispitivani ekstrakti pokazuju citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- 4) Djelovanje izoliranih ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica.

## **7 LITERATURA**

1. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Biologija raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija, 3., obnovljeno i izmjenjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2018. P. 3-10.
2. Cooper G. M., Hausman R. E. Nastanak i uzroci raka. Stanica molekularni pristup, peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2010. P. 725-726.
3. [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten\\_2015\\_rak\\_final.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf) Datum pristupa: 14.07.2019.
4. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015 Mar 1. P. E381-E382.
5. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Tumori mokraćnog sustava. In: Raič A, editor. Klinička onkologija, 3., obnovljeno i izmjenjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2018. P. 156-159.
6. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66044/#CDR0000062705\\_98](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66044/#CDR0000062705_98) Datum pristupa: 15.07.2019.
7. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Tumori dišnog sustava i sredoprsja: Rak pluća. In: Raič A, editor. Klinička onkologija, 3., obnovljeno i izmjenjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2018. P.124-130.
8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/> Datum pristupa: 16.07.2019
9. <https://www.britannica.com/plant/brassica> Datum pristupa: 21.07.2019
10. Lampe J.W., Peterson S. Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. J Nutr. 2002 Oct;132(10):2991-4.
11. Linus Pauling Institute. Oregon State University. Cruciferous Vegetables. 2018. [Internet] <https://lpi.oregonstate.edu/mic/food-beverages/cruciferous-vegetables#introduction> Datum pristupa: 21.07.2019.
12. Linus Pauling Institute. Oregon State University. Isotyocyanates. 2018. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates> Datum pristupa: 21.07.2019.
13. Priroda i biljke [Internet] <https://www.plantea.com.hr/brokula/> Datum pristupa: 22.07.2019.
14. Scrob T., Hosu A., Cimpoi C. The Influence of in Vitro Gastrointestinal Digestion of Brassica oleracea Florets on the Antioxidant Activity and Chlorophyll, Carotenoid and Phenolic Content. Antioxidants (Basel). 2019 Jul 10.

15. Priroda i biljke [Internet] <https://www.plantea.com.hr/koraba/> Datum pristupa: 22.07.2019.
16. Jung H.A., Karki S., Ehom N.Y., Yoon M.H., Kim E.J., Choi J.S. Anti-Diabetic and Anti-Inflammatory Effects of Green and Red Kohlrabi Cultivars (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *Prev Nutr Food Sci.* 2014 Dec.
17. Priroda i biljke [Internet] <https://www.plantea.com.hr/kupus/> Datum pristupa: 22.07.2019.
18. Wu J., Liu W., Yuan L., Guan W.Q., Brennan C.S., Zhang Y.Y. The influence of postharvest UV-C treatment on anthocyanin biosynthesis in fresh-cut red cabbage. *Sci Rep.* 2017 Jul 12.
19. U. S. National Plant Germplasm System [Internet] <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=105447> Datum pristupa: 23.07.2019
20. U. S. National Plant Germplasm System [Internet] <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=7676> Datum pristupa: 23.07.2019.
21. U. S. National Plant Germplasm System [Internet] <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=7672> Datum pristupa: 23.07.2019.
22. Sultana, S., Asif, H. M., Nazar, H. M., et al. (2014.) Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, p. 4385- 4394
23. Cumberbatch M.G.K., Noon A.P. Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer. *Transl Androl Urol.* 2019 Feb.
24. American Cancer Society [Internet] <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/key-statistics.html> Datum pristupa: 24.07.2019.
25. American Cancer Society [Internet] <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html> Datum pristupa: 24.07.2019.
26. Hidetomo Kikuchi, Bo Yuan, Xiaomei Hu, and Mari Okazaki. Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *Am J Cancer Res.* 2019.
27. Greenwell M, Rahman PK. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res.* 2015 Oct 1;6(10):4103-4112.
28. Wu QJ, Xie L, Zheng W, Vogtmann E, Li HL, Yang G. Cruciferous vegetables consumption and the risk of female lung cancer: a prospective study and a meta-analysis. *Ann Oncol.* 2013 Jul;24(7):1918-24.

29. Vieira AR, Vingeliene S, Chan DS, Aune D, Abar L, Navarro Rosenblatt D. Fruits, vegetables, and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 2015 Jan;4(1):136-46.



## **8 SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj je istraživanja ispitati potencijalno citotoksično djelovanje ekstrakata izoliranih iz biljaka iz roda *Brassica* na humane karcinomske stanice mokraćnog mjehura (T24) i karcinomske stanice raka pluća (A549). Pretpostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih stanica biljnim ekstraktima njihov broj smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **Materijali i metode:**

Ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura rađeno je MTT testom. Usporedbom apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih biljnim ekstraktima i apsorbancije kod netretiranih stanica (kontrola), dobili smo postotak preživljenja karcinomskih stanica. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata.

### **Rezultati:**

Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica.

Kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24) svi biljni ekstrakti ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL, pri različitim vremenima inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica ima mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

Kod stanica karcinoma pluća (A549) većina biljnih ekstrakata najjači citotoksični učinak ima pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL, pri različitim vremenima inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica ima mikrovalni ekstrakt *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

### **Zaključci:**

*In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i karcinoma pluća (A549) biljnim ekstraktima dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak ovisan je o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak ekstrakata, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma mokraćnog mjehura i pluća kod životinja.

## **9 SUMMARY**

### **The aim of the research**

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of extracts from the *Brassica* genus of plants on human urinary bladder carcinoma cells (T24) and lung carcinoma cells (A549). The assumption is that after the exposure of carcinoma cells to extracts their number will be reduced in comparison to the control group.

### **Materials and methods**

MTT assay was used to establish cytotoxicity levels on urinary bladder cancer cell lines. The comparison between the absorbance of created formazan in cells treated with extracts and those untreated (the control group) established the survival rates of carcinoma cells. Cytotoxicity levels were established after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours.

### **Results**

The results are graphically presented in relation to incubation times and the percentages of metabolically active cells.

In urinary bladder carcinoma cells T24 all extracts show better effects in higher concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL, with different incubation times. The most prominent effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by microwave extract of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* at a concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time.

In lung carcinoma cells A549 most extracts have the strongest effect at higher concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL, with different incubation times. The most significant effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by microwave extract of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* at a concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time.

### **Conclusions**

*In vitro* exposure of urinary bladder carcinoma cells (T24) and lung carcinoma cells (A549) to extracts leads to reduced cell survival rate. Cytotoxic effects depend on incubation time and concentration. Herbal extracts effect is not always proportional to the increase in concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurs. The cytotoxic effect of extracts is confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next step is the validation of these effects by *in vivo* studies on the models of animal urinary bladder and lung cancers.

## **10 ŽIVOTOPIS**

**OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Vedrana Papac

**Datum rođenja:** 28.11.1995.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:** Luke Botića 32, Solin

**e-mail:** vedrana.papac@gmail.com

**OBRAZOVANJE:**

- **2002. – 2006.** Osnovna škola “Vjekoslav Parać”, Solin, Republika Hrvatska
- **2006. – 2010.** Osnovna škola “Kraljica Jelena”, Solin, Republika Hrvatska
- **2010. – 2014.** IV. Gimnazija “Marko Marulić”, Split, Republika Hrvatska
- **2014. – 2019.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet; smjer: farmacija

**RADNO ISKUSTO:**

**III. 2019. – IX. 2019.** – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Solin

**CPSA Split** (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

**POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik

**Vozačka dozvola:** B kategorija