

Djelovanje hlapljivih spojeva iz hrena (*Armoracia rusticana* L.) i riginog dvoredca (*Diplotaxis eruroides* L.) feniletil izotiocijanata i alil izotiocijanata na apoptozu stanica humanih karcinoma

Pavičić, Klaudia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:351328>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

I

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Klaudia Pavičić

DJELOVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA IZ HRENA (*ARMORACIA RUSTICANA* L.) I RIGINOG DVOREDCA (*DILOTAXIS ERUCOIDES* L.) FENILETIL IZOTIOCIJANATA I ALIL IZOTIOCIJANATA NA APOPTOZU STANICA HUMANIH KARCINOMA

Diplomski rad

Akadska godina:

2019./2020.

Mentor:

Izv. prof. dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2020.

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

DJELOVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA IZ HRENA (*ARMORACIA RUSTICANA* L.) I RIGINOG DVOREDCA (*DILOTAXIS ERUCOIDES* L.) FENILETIL IZOTIOCIJANATA I ALIL IZOTIOCIJANATA NA APOPTOZU STANICA HUMANIH KARCINOMA

Klaudia Pavičić, broj indeksa 182

Sažetak:

Cilj istraživanja bio je ispitati učinak apoptoze na dvije stanične linije humanih karcinoma: MDA-MB-231 i TCCSUP. Korišteni su feniletil izotocijanat, alil izotocijanat (izotocijanati kojima su bogati *Armoracia rusticana* L. i *Diplotaxis erucoides* L.) i *Diplotaxis erucoides* izoliran destilacijom po Clevengeru. Stanične linije humanih karcinoma: MDA-MB-231 i TCCSUP tretirane su uzorcima različitih koncentracija 1 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4h, 24h, 48h i 72h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama izotocijanata te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih uzoraka. Nakon toga je ispitan učinak na apoptozu metodom protočne citometrije pomoću Annexin-V/PI bojanja, gdje je postotak apoptotskih stanica izražen kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, čija je vrijednost postavljena kao 100%. Najbolji citotoksični utjecaj na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 pokazali su feniletil izotocijanat i *Diplotaxis erucoides* Clevenger. Za razliku od feniletil izotocijanata i *Diplotaxis erucoides* Clevenger, alil izotocijanat pokazao je malo slabiji citotoksični učinak na ukupnu apoptozu stanične linije MDA-MB231. Na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura TCCSUP, jedino je feniletil izotocijanat pokazao citotoksični učinak, dok za alil izotocijanat i *Diplotaxis erucoides* Clevenger citotoksični učinak nije bilo moguće definirati. Djelovanje izotocijanata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te ponekad dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak feniletil izotocijanata, alil izotocijanata i *Diplotaxis erucoides* izoliranog destilacijom po Clevengeru odabranih biljaka je potvrđen kod MDA-MB-231 stanične linije (trostruko-negativan rak dojke), a samo feniletil izotocijanata kod TCCSUP stanične linije (rak mokraćnog mjehura). Također je potvrđeno da je mehanizam citotoksičnog djelovanja ovih uzoraka induciranje apoptoze. Idući korak bi bio potvrđivanje tih učinaka u *in vivo* istraživanju na modelima raka dojke i karcinomu mokraćnog mjehura 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, apoptoza, protočna citometrija

Rad sadrži: 77 stranica, 33 slika, 8 tablica, 42 referenca

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Mila Radan, predsjednik
2. Doc.dr.sc. Jasminka Omerović, član
3. Izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 10. 2020.

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 ČikešČulić, PhD
Technical assistance: Assoc. prof. Vedrana ČikešČulić

THE EFFECT OF VOLATILE COMPOUNDS FROM HORSERADISH (*ARMORACIA RUSTICANA* L.) AND WHITE WALLROCKET (*DIPLLOTAXIS ERUCOIDES* L.) PHENYLETHYL ISOTIOCYANATE AND ALYL ISOTIOCYANATE ON APOPTOSIS OF HUMAN CANCER CELLS

Klaudia Pavičić, index number 182

Summary:

The aim of the study was to examine the effect of apoptosis on two human cancer cell lines: MDA-MB-231 and TCCSUP. Phenylethyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate (isothiocyanates present in *Armoracia rusticana* L. and *Diplotaxis eruroides* L.) and *Diplotaxis eruroides* isolated by Clevenger distillation, were used. Human cancer cell lines: MDA-MB-231 and TCCSUP were treated with samples of different concentrations of 1 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL and 100 µg/mL. Cytotoxicity was determined after 4h, 24h, 48h and 72h using the MTT method. The ratio of the absorbance of cells treated with aqueous solutions of samples and the absorbance of those not treated is an indicator of the cytotoxic activity of the samples used. The effect on apoptosis was then examined by flow cytometry using Annexin-V/PI staining, where the percentage of apoptotic cells was expressed as the number of positive cells in the total number of cells, whose value was set as 100%. Phenylethyl isothiocyanate and *Diplotaxis eruroides* Clevenger showed the best cytotoxic effect on the MDA-MB-231 breast cancer cell line. Unlike phenylethyl isothiocyanate and *Diplotaxis eruroides* Clevenger, allyl isothiocyanate showed a slightly weaker cytotoxic effect on overall apoptosis of the MDA-MB231 cell line. On the TCCSUP bladder cancer cell line, only phenylethyl isothiocyanate showed a cytotoxic effect, whereas for allyl isothiocyanate and *Diplotaxis eruroides* Clevenger the cytotoxic effect could not be defined. The effect of isothiocyanates is not always proportional to the increase of concentration and incubation time, and sometimes cell recovery occurs. The cytotoxic effect of phenylethyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate and *Diplotaxis eruroides* isolated by Clevenger distillation of selected plants was confirmed in MDA-MB-231 cell line (triple-negative breast cancer) and only phenylethyl isothiocyanate in TCCSUP cell line (bladder cancer). It was also confirmed that the mechanism of cytotoxic action of these samples is the induction of apoptosis. The next step would be to confirm these effects in an *in vivo* study in models of breast cancer and bladder cancer in animals.

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, apoptosis, flow cytometry

Thesis contains: 77 pages, 33 figures, 8 tables, 42 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Mila Radan, PhD, assoc. prof., chairperson
2. Jasminka Omerović, PhD, assis. prof., member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member - supervisor

Defence date: October, 2020

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

1. UVOD	3
1.1. RAK	4
1.2. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI	5
1.3. APOPTOZA	6
1.4. EPIDEMIOLOGIJA RAKA	9
1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA RAKA U SVIJETU	9
1.4.2. EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ	11
1.5. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA	14
1.5.1. ETIOLOGIJA RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA	14
1.5.2. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA	14
1.5.3. KLASIFIKACIJA RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA	16
1.5.4. LIJEČENJE RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA	18
1.6. RAK DOJKE	19
1.6.1. ETIOLOGIJA RAKA DOJKE	19
1.6.2. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA RAKA DOJKE	19
1.6.3. KLASIFIKACIJA RAKA DOJKE	20
1.6.4. LIJEČENJE RAKA DOJKE	22
1.7. HREN (<i>Armoracia rusticana</i> L.) I RIGIN DVOREDAC (<i>Diplotaxis erucoides</i> L.) KAO IZVORI ISTIH IZOTIOCIJANATA	23
1.8. IZOTIOCIJANATI	28
1.8.1. ALIL IZOTIOCIJANAT (AITC) I FENILETIL IZOTIOCIJANAT (PEITC)	28
1.8.2. METABOLIZAM IZOTIOCIJANATA	28
1.8.3. FARMAKOLOŠKI UČINCI FENILETIL IZOTIOCIJANATA I ALIL IZOTIOCIJANATA	30
1.8.3.1. OČUVANJE NORMALNE REGULACIJE STANIČNOG CIKLUSA	30
1.8.3.2. PROTUPALNO DJELOVANJE IZOTIOCIJANATA	30
1.8.3.3. POKRETANJE APOPTOZE	31
1.8.3.4. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE IZOTIOCIJANATA	31
1.8.3.5. PROTEKTIVNO DJELOVANJE IZOTIOCIJANATA U RAZVOJU KARCINOMA	31
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	33
3. MATERIJALI I METODE	35
3.1. STANIČNE LINIJE	36
3.1.1. KARCINOM DOJKE-STANIČNA LINIJA MDA-MB-231	36

3.1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA-STANIČNA LINIJA TCCSUP	37
3.2. POSTUPAK.....	38
3.3. METODA IZOLACIJE	39
3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA).....	40
3.5. APOPTOZA.....	41
3.6. PROTOČNA CITOMETRIJA.....	42
3.7. STATISTIČKA ANALIZA	42
4. REZULTATI.....	43
4.1. KARCINOM DOJKE-STANIČNA LINIJA MDA-MB-231	44
4.1.1. MTT METODA ZA STANIČNU LINIJU MDA-MB-231	44
4.1.1.1. FENILETIL IZOTIOCIJANAT (MTT METODA).....	44
4.1.1.2. ALIL IZOTIOCIJANAT (MTT METODA)	45
4.1.1.3. <i>DIPLOTAXIS ERUCOIDES</i> CLEVANGER (MTT METODA).....	46
4.1.2. PROTOČNA CITOMETRIJA ZA STANIČNU LINIJU MDA-MB-231	47
4.1.2.1. RANA APOPTOZA	47
4.1.2.2. KASNA APOPTOZA	48
4.1.2.3. RANA+KASNA APOPTOZA	49
4.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA - STANIČNA LINIJA TCCSUP	50
4.2.1. MTT METODA ZA STANIČNU LINIJU TCCSUP	50
4.2.1.1. FENILETIL IZOTIOCIJANAT (MTT METODA).....	50
4.2.1.2. ALIL IZOTIOCIJANAT (MTT METODA)	51
4.2.1.3. <i>DIPLOTAXIS ERUCOIDES</i> CLEVANGER (MTT METODA).....	52
4.2.2. PROTOČNA CITOMETRIJA ZA STANIČNU LINIJU TCCSUP	53
4.2.2.1. RANA APOPTOZA ZA FENILETIL IZOTIOCIJANAT	53
4.2.2.2. KASNA APOPTOZA ZA FENILETIL IZOTIOCIJANAT	54
4.2.2.3. RANA + KASNA APOPTOZA ZA FENILETIL IZOTIOCIJANAT	55
5. RASPRAVA	56
6. ZAKLJUČAK.....	61
7. LITERATURA	63
8. SAŽETAK	69
9. SUMMARY	71
10. ŽIVOTOPIS	73

1. UVOD

1.1. RAK

Rak je skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju po svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici, te posljedično i po načinu liječenja. Svim vrstama raka zajedničko je da nastaju od zdravih stanica organizma procesom koji se zove zloćudna pretvorba (1). Zloćudna preobrazba očituje se pretjeranim umnožavanjem stanica koje stvaraju tumore i metastaziraju. Zloćudno preobražene stanice su, zbog različitih utjecaja, postale neosjetljive na signale kojima se njihovo ponašanje usklađuje s potrebama organizma (2).

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. Nakupina takvih stanica naziva se rak. Promjena koja je odgovorna za zloćudnu pretvorbu stanica je genska mutacija. Tako se može reći da je rak u osnovi genska bolest. Rak se klinički najčešće očituje kao nakupina velikog broja zloćudno preobraženih stanica čiji se broj zbog nekontrolirane stanične diobe progresivno povećava. Međutim, različiti dokazi upućuju na to da je rak monoklonskog podrijetla, što znači da nastaje zloćudnom transformacijom samo jedne zdrave stanice. 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).

U Hrvatskoj, rak je danas javnozdravstveni problem. Drugi je najvažniji uzrok smrtnosti, odmah nakon bolesti srca i krvnih žila. Incidenciju raka u Hrvatskoj prati Registar za rak Republike Hrvatske, populacijski registar pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, te se podaci objavljuju i dostupni su za javnost u redovnim biltenima (3).

Sažimanje slike o raku je dosta kompleksno te postoje brojni modeli po kojima se zdrava stanica razlikuje od stanice raka. Prema posljednjem modelu Hanahan-Weinerga, deset je ključnih razlika:

1. samodostatnost s obzirom na signale rasta
2. neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast
3. tkivna invazija i presađivanje
4. neograničeni potencijal umnažanja
5. tumorska angiogeneza
6. izmicanje apoptozi
7. poremećen metabolizam

8. sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora
9. genomska nestabilnost
10. upala

Osim mutacije, za nastanak i progresiju raka važnu ulogu ima metilacija DNA (epigenetska promjena), miRNA i aktivnost telomeraza (1,5).

1.2. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI

Prvi geni za koje se ustanovilo da imaju centralnu ulogu u nastanku raka zovu se onkogeni. Oni su promijenjena inačica zdravih, dakle normalnih staničnih gena koje nazivamo proto-onkogenima i koji sudjeluju u regulaciji zdrave stanične proliferacije i diferencijacije. Proto-onkogeni su uključeni u prijenos signala u stanici, svi su evolucijski jako dobro očuvani, što upućuje na njihovu ulogu u važnim staničnim procesima. Putevi prijenosa signala u stanici, način su na koji se stanični rast, dioba, diferencijacija i preživljenje usklađuju s uvjetima u okolišu stanice (1,4).

Signali koje stanica prima iz okoliša često su oblika malih molekula, čimbenika rasta, koji se najčešće vezuju za receptore, koji se nalaze 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 onkogeni. Posljedica aktivacije onkogeni jest nekontrolirani rast i dioba stanice, što uzrokuje nastanak raka. Do aktivacije onkogeni može doći na nekoliko načina. Proteinski produkti onkogeni nazivaju se onkoproteinima. Onkogen se može aktivirati zbog mutacija u samom genu, kao posljedica genske amplifikacije (broj kopije gena se poveća), kao posljedica kromosomske translokacije (dio kromosoma se „odlomi“ i taj odlomljeni dio se premjesti na drugi kromosom) (1,4).

Za razliku od onkogeni čija pojačana aktivnost dovodi do nastanka raka, tumorsupresorski geni su geni čiji gubitak ili inaktivacija njih samih, odnosno njihovih proteinskih produkata dovodi do formiranja raka. Tumorsupresorski geni su različiti i imaju različite funkcije u stanici. Jedan od važnih tumorsupresorskih gena je P53. Gen koji je često mutira u različitim humanim linijama raka. Proteinski produkt gena P53 je transkripcijski čimbenik p53, koji se aktivira se zbog

oštećenja stanične DNA ili drugih poremećaja povezanih sa staničnim stresom. Kada se taj tumorsupresorski gen P53 aktivira, tada taj aktivirani p53 gen ima dva osnovna načina djelovanja:

- a) zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA
- b) potiče apoptozu.

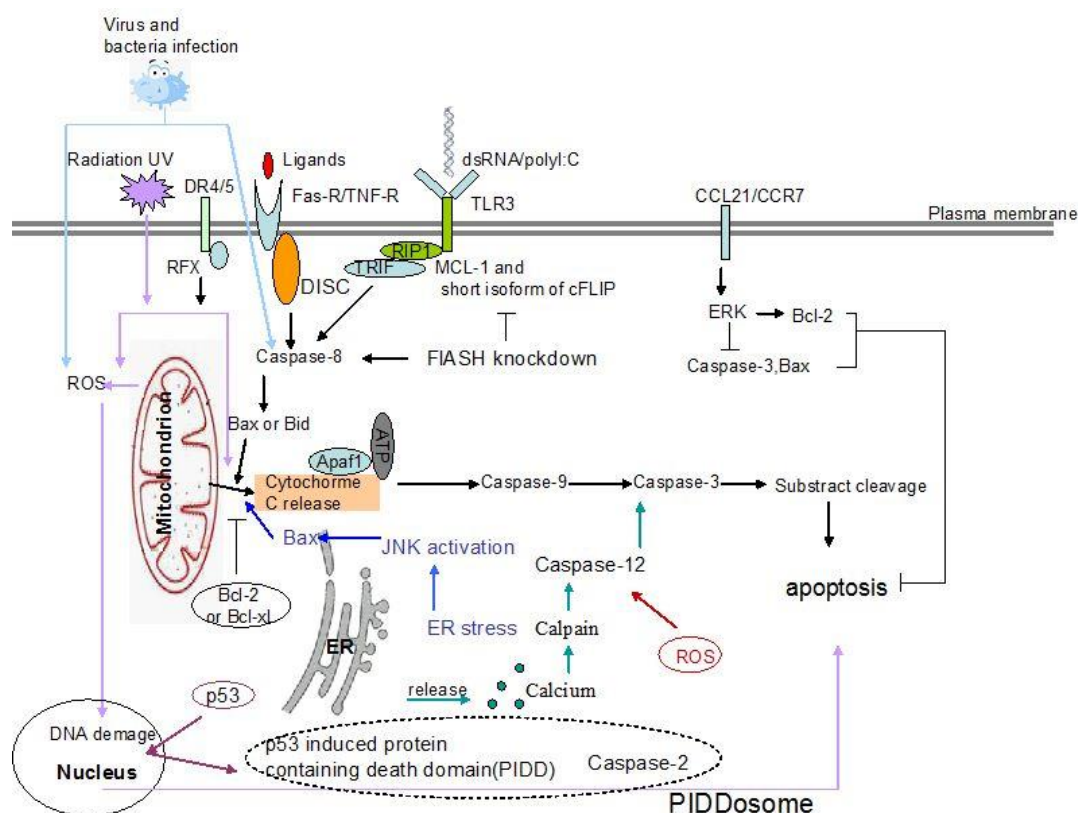
Oštećenje DNA stanice znatno povećava mogućnost da se stanica pretvori u stanicu raka. Zaustavljajući prolazak stanice kroz stanični ciklus, p53 omogućuje da se oštećenja stanične DNA poprave prije nego se oštećena DNA replicira. Ako se ta oštećenja na DNA ne uspiju popraviti, djelovanjem proteina p53, 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. Stoga je za nastanak raka potrebno narušiti mehanizam apoptoze, do čega dolazi zbog mutacija u genu P53 ili zbog mutacija u drugim onkogenima, odnosno tumorsupresorskim genima u stanicama raka (1,4).

1.3. APOPTOZA

Riječ "apoptoza" dolazi iz grčke riječi "*ἀπόπτωσις*", koje ima značenje „stabla na kojima ispada lišće u jesen“. Apoptoza ili programirana stanična smrt (eng. *programmed cell death*; PCD) je normalan fiziološki oblik stanične smrti (5,7). Mnogi aktivatori apoptoze ili programirane stanice, preko različitih posrednika, dovode do pokretanja kaskade proteolitičkih enzima kaspaza (citoplazmatske cisteinil-aspartatno-specifične endoproteaze) koje uništavaju esencijalne strukturne komponente uključujući genski materijal stanice, i dovode do pojave specifičnih promjena kao što su savijanje stanice, kondenzacija kromatina, cijepanje DNA, „pupanje“ dijelova stanične membrane i formiranje apoptotskih tjelešaca, koja fagocitiraju susjedne stanice i makrofazi(11). Kaspaze su proteaze bogate cisteinom (Cys) koje kidaju na aspartatskim ostacima (Asp) svoj proteinski supstrat. One kidaju jezgrinu laminu, što uzrokuje fragmentaciju jezgrine DNA, membrana bubri, a stanica se raspada na komadiće. Neki od ključnih proteina u procesu apoptoze su: Bcl-2, Smac/Diablo, IAP, kaspaza-3 (ced-3), kaspaza-4 (ced-4), kaspaza-8 (ced-8), kaspaza-9 (ced-9), TNF, Fas i brojni drugi koji nizom signalnih puteva aktiviraju nizvodne puteve

koji će dovesti do stanične smrti. Dvije su vrste apoptoze: ovisna o kaspazama i apoptoza neovisna o kaspazama (5,7).

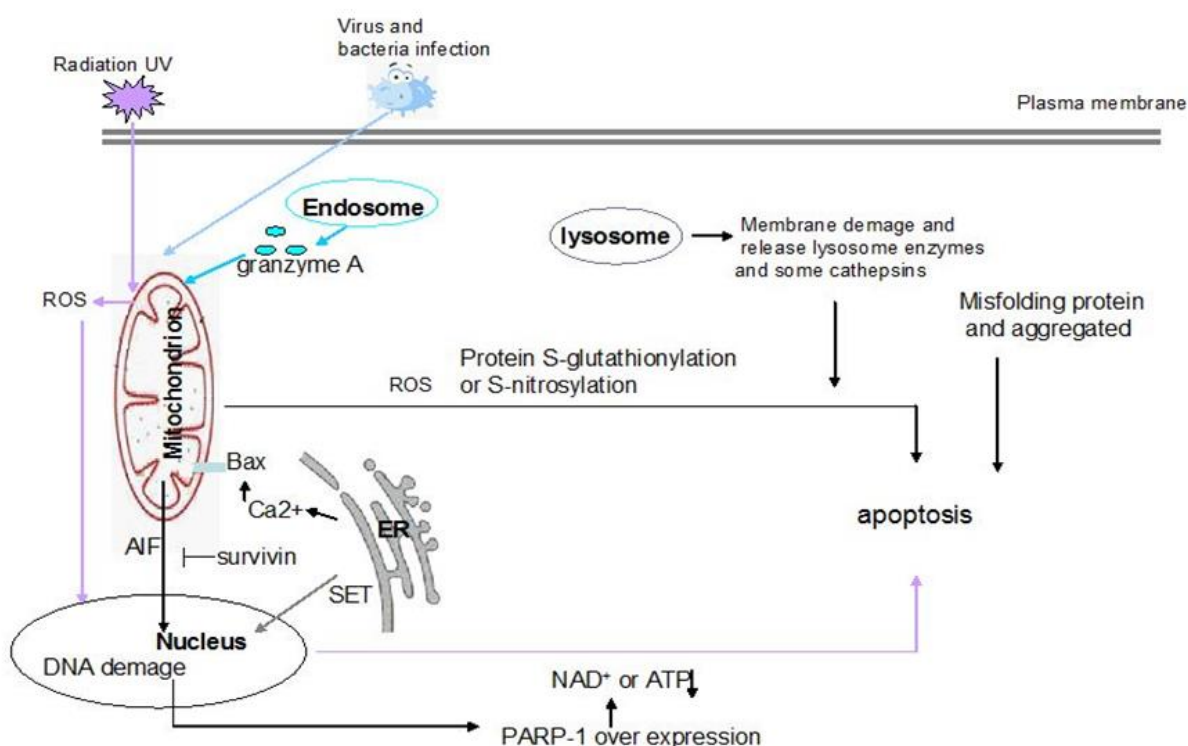
Apoptoza ovisna o kaspazama (Slika 2.) uvjetovana je aktivnošću kaspaza kao što su ced-3, ced-4, ced-7, ced-8, ced-9 i ced-12 (5,7). Kalcijevi kanali mogu sudjelovati u apoptozi kao posljedica depolarizacije unutrašnje membrane, što dovodi do izlaska citokroma c iz mitohondrija koji se veže s Apaf1 dovodeći do aktivacije ced-9. Potom aktivna kaspaza ced-9 aktivira nizvodne kaspaze koje dovode do stanične smrti. Neki polipeptidi kao TNF ili Smac/Diablo prenose poruke za programiranu staničnu smrt (5,8). Kaskadni putevi aktivacije kaspaza mogu se aktivirati i X zračenjem, virusima (npr. *Herpes virus* koji aktivira ced-8), bakterijama (*Mycobacterium tuberculosis* koji aktivira ced-12), slobodnim radikalima (aktiviraju ced-12) i brojnim drugim čimbenicima (5,9). Apoptoza je kontrolirana inhibitorima apoptoze (iAP) i proteinskim kompleksom Bcl-2. Kompleks Bcl-2 ima dualnu ulogu: može kočiti ili poticati apoptozu (5,7).



Slika 1. Apoptoza ovisna o kaspazama.

(Preuzeto s: <http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review>)

Apoptoza neovisna o kaspazama (Slika 3.) posljedica je razlike potencijala na membrani mitohondrija, a zatim povećanja proizvodnje slobodnih radikala (eng. *reactive oxygen species*; ROS) (5,7). Čimbenik indukcije apoptoze (eng. *apoptosis inducing factor*; AIF) je flavoprotein koji ima ulogu u fragmentaciji stanice neovisne o kaspazama. Osim API, ROS također sudjeluju u ovom načinu smrti stanice. ROS može aktivirati PARP-1 koji dovodi do izlaska API iz stanice (5,10). Reducirani glutation (GSH) i dušikov monoksid (NO) mogu blokirati neke tiolne skupine. Međutim to su mehanizmi koji do kraja nisu istraženi te su ostala brojna neriješena pitanja(5).



Slika 2. Apoptoza neovisna o kaspazama.

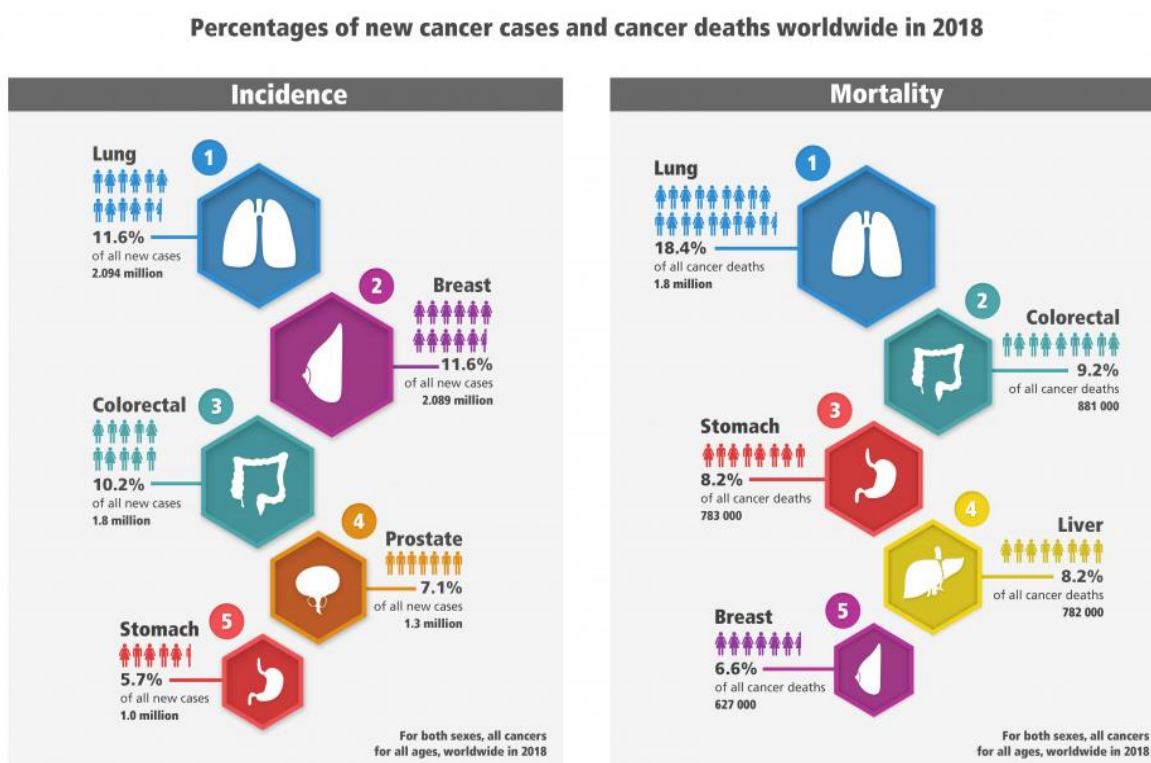
(Preuzeto s: <http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review>)

1.4. EPIDEMIOLOGIJA RAKA

1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA RAKA U SVIJETU

Rak je danas jedan od vodećih uzrka smrtnosti u svijetu. Broj osoba oboljelih od malignih bolesti u stalnom je porastu, što je u najvećoj mjeri rezultat povećanog očekivanog trajanja života i većeg broja osoba koje dosižu godine života u kojima se maligne bolesti češće pojavljuju. Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će se globalno broj oboljelih povećati s 18 milijuna u 2018. godini na 29,5 milijuna u 2040. godini, dok će broj umrlih porasti sa 9,5 milijuna na 16,4 milijuna godišnje.

Najčešći uzroci smrti od raka u svijetu zabilježeni u 2018. godini su: rak pluća, rak debelog crijeva, rak želuca, rak jetre i rak dojke. Potrebno je naglasiti da sami broj umrlih od raka ne pada praktički niti u jednoj europskoj državi (najvećim dijelom zbog sve starije populacije), tako da je pri procjeni mortaliteta (kao i incidencije) potrebno standardizirati za dob, odnosno maknuti utjecaj dobi (12).

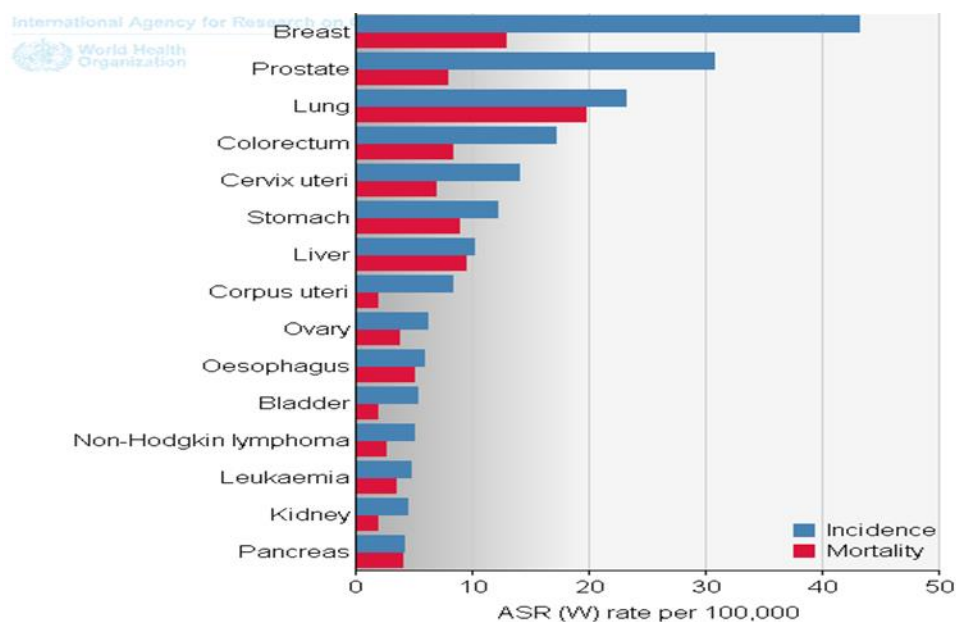


Slika 3. Prikaz 5 najčešćih tipova raka u svijetu za 2018. godinu. Incidencija i mortalitet.

(Preuzeto s : <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>)

Ukupna stopa smrtnosti u 20. stoljeću porasla je, zbog pušenja, na 215 umrlih od raka na 100 000 osoba. Od 1991. do 2012. godine, stopa je pala za 23% zbog smanjenja pušenja, kao i poboljšanja u ranom otkrivanju i liječenju. Ovaj pad doveo je do smanjenja za više od 1,7 milijuna smrtnih ishoda raka. Smanjuje se stopa smrtnosti za četiri najčešće vrste raka - pluća, debelog crijeva, dojke i prostate (5,13).

Agencija za istraživanje zdravlja i kvalitete (eng. Agency for Healthcare Research and Quality; AHRQ) procjenjuje da su izravni troškovi zdravstvene zaštite za rak u SAD-u 2013. bili 74,8 milijarde dolara. Procjenjuje se da je 44% tih troškova bilo namijenjeno za bolničko liječenje, a 40% za boravak u bolnici. Procjene se temelje na nizu istraživanja koje je provela agencija Medical Expenditure Panel Survey (MEP). Podaci su također vidljivi i na Internetskoj stranici: [meps.ahrq.gov / mepsweb /](http://meps.ahrq.gov/mepsweb/) (5,13).



Slika 4. Epidemiologija raka u svijetu. Incidencija i mortalitet.

(Preuzeto s: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)

1.4.2. EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ

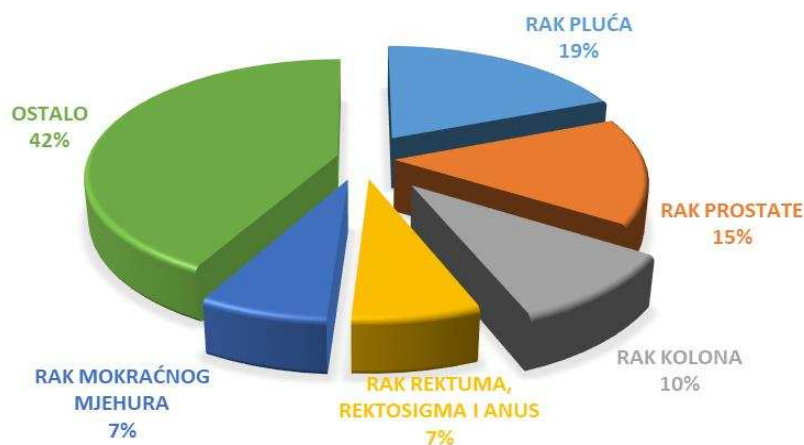
Rak je također i značajan zdravstveni problem stanovništva Hrvatske. Kao i u svijetu, za očekivati je da će broj slučajeva raka u Hrvatskoj rasti, prvenstveno zbog starenja stanovništva. U razdoblju od 2001. do 2017. godine broj oboljelih je svake godine bio veći u prosjeku za 1%. Pomoću trendova dobno-standardizirane stope incidencije raka možemo vidjeti porast incidencije neovisan o starenju populacije. Najčešći oblik raka kod muškaraca je od 2016. godine rak prostate, dok je kod žena najčešći rak dojke (12).



Slika 5. Broj umrlih od invazivnog raka, bez ne-melanomskog raka kože (C00-C97, bez C44) i dobno standardizirane stope po spolu, Hrvatska, 2001.-2018.

(Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-raka-2020/>)

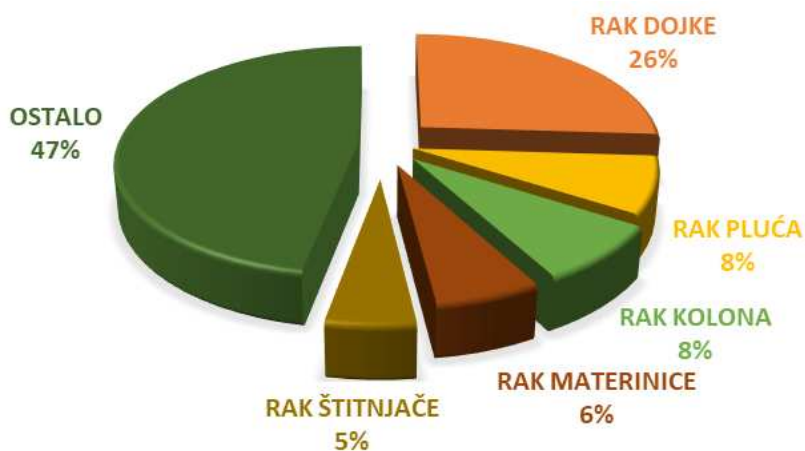
Pet najčešćih tipova raka u Hrvatskoj kod muškaraca su (Slika 6.): pluća (19%), prostata (15%), kolon (10%), rektum, rektosigma i anus (7%) i mokraćni mjehur (7%). Pet najčešćih tipova raka u Hrvatskoj kod žena su (Slika 7.): dojka (26%), pluća (8%), kolon (8%), tijelo maternice (6%) i štitnjača (5%) (5,14).



Slika 6. Najčešća sijela raka kod muškaraca u Hrvatskoj.

(Podaci preuzeti s: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske.

Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.)

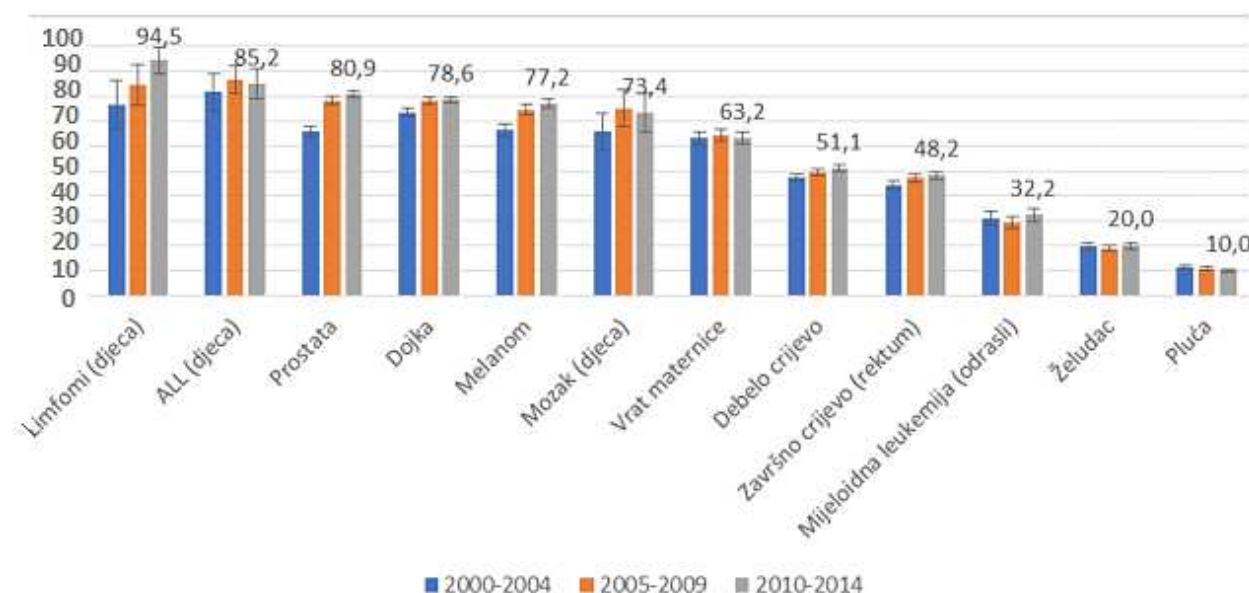


Slika 7. Najčešći tipovi raka kod žena u Hrvatskoj.

(Podaci preuzeti s: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske.

Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.)

Preživljenje od većine oblika raka je u porastu, no postoje značajne razlike među sijelima raka. Podaci o petogodišnjem preživljenju (čisto preživljenje, engl. net survival) od nekih vrsta raka u Hrvatskoj, za osobe kojima je dijagnoza postavljena između 2000. i 2014. godine temeljem podataka Registra za rak, objavljeni su u međunarodnom istraživanju o preživljenju CONCORD3 (12).



Slika 8. Petogodišnje preživljenje od najčešćih sijela raka u Hrvatskoj, bolesnici dijagnosticirani 2000.-2014.; oznaka prikazuje preživljenje za bolesnike dijagnosticirane 2010-2014.

(Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-raka-2020/>)

Podaci o preživljenju po sijelima raka pokazuju da je Hrvatska, za većinu zloćudnih bolesti pri dnu europskih zemalja uključenih u istraživanje, uz bolje rezultate za preživljenje kod zloćudnih bolesti u djece. Vidljivo je jasno poboljšanje u preživljenju od raka, no međutim, slično kao za mortalitet, preživljenje u većini drugih usporedivih europskih zemalja se poboljšava brže.

1.5. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA

1.5.1. ETIOLOGIJA RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

Najčešća neoplazma mokraćnog sustava je karcinom mokraćnog mjehura. Incidencija raka mokraćnog mjehura je četiri puta veća kod muškarca nego kod žena te dva puta veća u pripadnika crne rase u odnosu na bijelu rasu (5). Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura iznosi 15/100.000. U Republici Hrvatskoj je 2008. godine zabilježeno 835 slučajeva. Prosječna dob bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura iznosi 65 godina (4,15).

Čimbenici rizika za nastanak raka mokraćnog mjehura su pušenje, izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, određenim lijekovima (ciklofosamid, fenacetin), postojanje kamenaca, kronična upala te shistosomijaza (povezana je s rakom pločastih stanica) (6,15).

Karcinom mokraćnog mjehura najčešće potječe iz prijelaznog (urotelnog) epitela (90%). Ostali patohistološki oblici su rak pločastih stanica (3%), adenokarcinom (2%) i rak malih stanica (1%). Tumori urotela su 50-100 puta češći u mokraćnom mjehuru nego na ostalim dijelovima urotrakta (6,15).

1.5.2. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

Glavni simptom, koji se očituje u 90% bolesnika, je bezbolna hematurija, mikroskopska ili makroskopska. Također, pojavljuje se učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mokraćnog mjehura ili, rjeđe, simptoma urinarne infekcije. Znakovi lokalnog širenja 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 (6,15).

Prilikom fizikalnog pregleda bolest najčešće ostane nezamijećena, osim ako se ne radi o uznapredovanoj ili metastatskoj bolesti, pri čemu se može osjetiti opipljiva masa na mjehuru ili bubregu. Početna evaluacija bolesnika sa sumnjom na rak mjehura podrazumijeva cistoskopiju, procjenu funkcije bubrega i snimanje gornjeg urinarnog trakta, po mogućnosti (CT) urografijom. Za procjenu oštećenja bubrega, potrebno je mjeriti serumsku razinu dušika i kreatinin za sve bolesnike kod kojih postoji sumnja na rak mjehura. Ako se sumnja na metastatsku bolest, prikladna

je potpuna krvna slika i potpuni metabolički profil, uključujući razinu alkalne fosfataze i procjenu funkcije jetre. Cistoskopiju treba provesti kod svih bolesnika s makroskopskom hematurijom, te u starijih od 35 godina s mikroskopskom hematurijom, a može se razmotriti i kod mlađih bolesnika s mikroskopskom hematurijom. Bolesnike s hematurijom i rizičnim čimbenicima za rak mokraćnog mjehura (npr. uporaba duhana, iritativni simptomi, izlaganje kemikalijama) treba ispitati cistoskopijom bez obzira na dob. Bolesnici s abnormalnim nalazima citološkog pregleda mokraće ili patologije tkiva trebali bi proći transuretralnu resekciju tumora mjehura (TURBT). Ovaj postupak osigurava bitne histopatološke informacije potrebne za definitivnu dijagnozu i ocjenu, te omogućuje uklanjanje vidljivog tumora i uzorkovanje okolnog mišića za procjenu dubine (5,16).

Za potvrdu dijagnoze tumora gornjeg dijela urotrakta izvode se retrogradna pijelografija te ureteroskopija. Za procjenu proširenosti bolesti koristi se MSCT ili MR abdomena i male zdjelice te RTG prikazom pluća. U slučaju povišene vrijednosti alkalne fosfataze ili prisutnih simptoma vezanih uz koštani sustav, potrebno je učiniti scintigrafiju kostiju (6,15).

1.5.3. KLASIFIKACIJA RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

U svrhu izbora odgovarajuće terapije i uspostavljanja adekvatne prognoze bolesti, potrebna je što točnija procjena proširenosti bolesti. Procjena se najčešće izražava TNM klasifikacijom Američkog združenog komiteta za rak (American Joint Committee on Cancer, AJCC) (6,15).

Tablica 1. TNM-klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura

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

Stadij	Grupa	Opis stadija
0a	Ta	Neinvazivni papilarni karcinom (Ta). Narastao je prema šupljem središtu mokraćnog mjehura, ali nije narastao u vezivno tkivo ili mišić zida mokraćnog mjehura.
	N0	
	M0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili udaljena mjesta (M0).
0is	Tis	Neinvazivni karcinom (Tis), također poznat kao karcinom in situ (CIS). Karcinom raste samo u unutarnjem sloju mokraćnog mjehura. Nije narastao prema unutra, prema šupljem dijelu mjehura, niti je napao vezivno tkivo ili mišić zidova mjehura.
	N0	
	M0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili udaljena mjesta (M0).
I	T1	Karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura, ali nije dosega sloj mišića u zidu mjehura (T1).
	N0	
	M0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
II	T2a ili T2b	Karcinom je narastao u unutarnji (T2a) ili vanjski (T2b) mišićni sloj zida mjehura, ali nije prošao kroz mišić do sloja masnog tkiva koji okružuje mjehur.
	N0	
	M0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).

IIIA	T3a, T3b ili T4a	Karcinom je narastao kroz mišićni sloj mokraćnog mjehura i u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur (T3a ili T3b).
	N0	Možda se proširio u prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a).
	M0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
	ILI	
	T1-T4a	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 zdjelici ili trbušnom zidu (T4a) i karcinom se proširio na obližnji limfni čvor u zdjelici (N1).
	N1	Karcinom se nije proširio na udaljena mjesta (M0).
	M0	
IIIB	T1-T4a	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 zdjelici ili trbušnom zidu (T4a) i karcinom se proširio na 2 ili više limfnih čvorova u zdjelici (N2) ili u limfne čvorove duž zajedničke ilijačne arterije (N3).
	N2 ili N3	Karcinom se nije proširio na udaljena mjesta (M0).
	M0	
IVA	T4b	Karcinom je izrastao kroz zid mokraćnog mjehura u zdjelicu zdjelice ili trbušne zidove (T4b).
	N0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
	M0	
	ILI	
	Bilo koji T	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T). Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N). Proširio se na udaljeni skup limfnih čvorova (M1a).
	Bilo koji N	
	M1a	
IVB	Bilo koji T	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T).
	Bilo koji N	Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N).
	M1b	Proširio se na 1 ili više udaljenih organa (kosti, jetra ili pluća) (M1b).

1.5.4. LIJEČENJE RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

Liječenje se temelji na stupnju proširenosti bolesti. Razlikuje se pristup kod neinvazivnog i invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura ili metastatske bolesti. Kod neinvazivnog oblika primjenjuje se Bacillus Calmette-Guerin (BCG) cjepivo ili mitomicin C (5).

U invazivnom obliku karcinoma osnovni oblik liječenja je radikalna cistektomija s neoadjuvatnom kemoterapijom temeljenom na cisplatinu uz adjuvatnu kemoterapiju, ovisno o patohistološkoj slici, statusu limfnih čvorova i stadiju bolesti. Metastatska bolest liječi se kemoterapijom i to prvom linijom gemcitabinom i cisplatinom, a od ostalih paklitakselom, doksorubicinom, metotreksatom i vinblastinom. U slučaju prisutnih koštanih presadnica primjenjuju se i bifosfonati (5,17). Usprkos velikom znanstvenom napretku koji je napravljen u liječenju raka, pojedini lijekovi pokazuju smanjenje učinkovitosti. Pridodaje se važnost mTOR inhibitorima (everelimus, sirolimus) u kombinaciji s gemcitabinom (5,18).

1.6. RAK DOJKE

1.6.1. ETIOLOGIJA RAKA DOJKE

Rak dojke u razvijenim zemljama, među kojima je i Hrvatska, najčešće je sijelo karcinoma u žena (25%) i uzrokuje 20% smrti od raka dojke u ženskoj populaciji, te je zbog toga značajan javnozdravstveni problem. Prema podacima registra za rak standardizirana stopa incidencije raka dojke na Standardizirano europsko stanovništvo za 2016.godinu iznosila je 90,6 na 100 000 stanovnika. Stopa smrtnosti iznosila je 25,3% za oba spola, što znači da je u pogledu smrtnosti rak dojke u Hrvatskoj na trećem mjestu, odmah nakon raka bronha i raka pluća (18-23).

Rak dojke može nastati iz duktalnog epitela ili iz lobularnog epitela. I duktalni i lobularni karcinomi se dijele na one koji nisu probili bazalnu membranu (neinvazivni, „in situ“) te na one koji to jesu (invazivni). Tako su glavni oblici karcinoma dojke duktalni karcinom in situ (DCIS, prema engl. Ductal Carcinoma In Situ), lobularni karcinom in situ (LCIS, prema engl. Lobular Carcinoma In Situ), duktalni invazivni karcinom bez karakteristika određenog tipa (IDC NOS, prema engl. Invasive Ductal Carcinoma Not Otherwise Specified), lobularni invazivni karcinom, medularni karcinom, koloidni karcinom, Pagetova bolest i tubularni karcinom (24).

Različiti čimbenici rizika utječu na nastanak raka dojke: dob, pozitivna obiteljska anamneza, starija životna dob prvorotkinje, žene koje nisu rodile, rana menarha, kasna menopauza, zračenje, debljina, oralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija, dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke i brojni drugi čimbenici rizika (5).

1.6.2. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA RAKA DOJKE

Prognostički pokazatelji se univerzalno koriste u izboru terapije za bolesnice s rakom dojke zbog tri razloga: identifikacije bolesnica s dobrom prognozom kod kojih rizik adjuvantne terapije nadmašuje potencijalnu korist, identifikacije bolesnica s lošom prognozom što opravdava agresivniji terapijski pristup te odabira bolesnica s rakom koje će imati veću ili manju korist od određenih oblika terapije. Prognostički pokazatelji su mjere dostupne u vrijeme operativnog zahvata povezane s preživljenjem u odsutnosti adjuvantne terapije, odnosno mjere povezane s prirodnim tijekom bolesti. Neki prognostički čimbenici imaju i prediktivnu ulogu što znači da su povezani s odgovorom na primjenjenu terapiju te omogućuju odabir odgovarajuće terapije za

pojedinu bolesnicu. U prognostičke čimbenike se ubrajaju veličina raka, status aksilarnih limfnih čvorova, histološki tip raka, histološki gradus, prisutnost limfovaskularne invazije, status hormonskih receptora, proliferacijski indeks, ekspresija gena za receptor humanog epidermalnog faktora rasta (HER2, prema engl. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) te dob bolesnice (24).

Klinički pregled najstarija je i osnovna metoda kojom se koristimo u otkrivanju bolesti dojke. No, ovim načinom moguće je dijagnosticirati samo 60% tvorbi koje su vidljive na mamografiji. Zbog toga postoje različite slikovne metode kojima se služimo u otkrivanju karcinoma dojke, a one u prvom redu uključuju mamografiju, ultrazvuk dojki te magnetsku rezonanciju dojki (19).

1.6.3. KLASIFIKACIJA RAKA DOJKE

TNM sustav stupnjevanja raka dojke je međunarodno prihvaćeni sustav za utvrđivanje stadija bolesti. Stadij bolesti je mjera proširenosti bolesti koja se koristi za procjenu prognoze i donošenje odluke o terapijskom pristupu. Ovaj sustav koristi tri parametra za opis stadija bolesti. Pri tome T označava lokalni rast primarnog tumora, N ozačava zahvaćenost limfnih čvorova, a M udaljene metastaze. Iako se na temelju TNM sustava ne može sa sigurnošću odrediti tijek i ishod bolesti kod pojedine bolesnice, ovaj sustav omogućava procjenu prognoze i ishoda bolesti, evaluaciju rezultata liječenja te usporedbu rezultata (24). Dakle pratimo nekoliko parametra: veličinu i proširenost tumora, zahvaćenost lokalnih limfnih čvorova te udaljene metastaze(19).

Tablica 2. Patološka klasifikacija karcinoma dojke (pTNM) (19).

PRIMARNI TUMOR	Tx – primarni tumor se ne može odrediti T0 – nema dokaza o postojanju primarnog tumora Tis – karcinom in situ Tis (DCIS) – duktalni karcinom in situ Tis (LCIS) – lobularni karcinom in situ Tis (Paget) – Pagetova bolest bradavice bez tumora T1 – tumor promjera < 2 cm T1 mic – mikroinvazija <0,1 cm promjera T1a – tumor promjera od 0,1 do 0,5 cm T1b - tumor promjera 0,5 do 1 cm T1c – tumor promjera od 1 do 1,5cm T2 – tumor promjera od 2 do 5 cm T3 – tumor promjera > 5cm T4 – tumor bilo koje veličine koji zahvaća kožu i/ili stjenku prsnog koša T4a – infiltracija stijenke prsnog koša (osim m.pectoralis) T4b – edem kože i/ili egzulcerirani tumor i/ili satelitski tumorski čvorići na istoj dojci T4b – T4a i T4b T4d – upalni (inflamatorni) karcinom dojke
REGIONALNI LIMFNI ČVOROVI	Nx – regionalni limfni čvorovi ne mogu se pregledati N0 – bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima N1 – metastaze u pomičnim čvorovima ipsilateralne pazušne jame N2 – metastaze u limfnim čvorovima ipsilateralnog pazuha koji su međusobno fiksirani i/ili infiltriraju okolno tkivo N2a – metastaze u limfnim čvorovima ipsilateralnog pazuha koji su fiksirani i/ili infiltriraju okolno tkivo N2b – klinički manifestne metastaze uz a. mammariu internu, bez metastaza u pazušnim limfnim čvorovima N3 – metastaze u: N3a – ipsilateralnim infraklavikularnim limfnim čvorovima i pazušnim limfnim čvorovima N3b – ipsilateralnim limfnim čvorovima uz a. mammariu internu i u pazušnim limfnim čvorovima N3c - ipsilateralnim supraklavikularnim limfnim čvorovima
UDALJENE METASTAZE	Mx – metastaze se ne mogu ustanoviti M0 – bez udaljenih metastaza M1 – postoje udaljene metastaze

Tablica 3. Stadiji karcinoma dojke (19).

STADIJ 0	Tis N0 M0
STADIJ I	T1 N0 M0
STADIJ IIa	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0
STADIJ IIb	T2 N1 M0 T3 N0 M0
STADIJ IIIa	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
STADIJ IIIb	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
STADIJ IIIc	Bilo koji T N3 M0
STADIJ IV	Bilo koji T, bilo koji N M1

1.6.4. LIJEČENJE RAKA DOJKE

Jedan od novijih pristupa liječenju raka dojke je primjena inhibitora DNA metil transferaze (npr. DNMTi) ili histon deacetilaze (npr. HDACi), odobreni od strane Američke agencije za lijekove i hranu (eng. US Food and Drug Agency; FDA), a koji su pokazali veliki potencijal u borbi protiv raka dojke (5,25). Osim toga, uočeno je da promjena membranskog potencijala tumorske stanice ima ulogu u progresiji i proliferaciji tumorske stanice. Velika važnost usmjerila se na promjenu koncentracije kalcija, što je dovelo do zaključka da neki inhibitori kalcija (npr. verapamil) mogu promijeniti membranski potencijal tumorske stanice i aktivirati ced-3 koja dovodi do stanične smrti (5).

Razlozi nastanka rezistencije na primijenjenu terapiju su različiti. Ona može biti stečena ili naslijeđena. Dosadašnja istraživanja mehanizma nastanka rezistencije su pokazala da signalni putevi MAPK i PI3K/Akt te promjena u lancu lncRNA igraju bitnu ulogu u pojavi rezistencije (5).

1.7. HREN (*Armoracia rusticana* L.) I RIGIN DVOREDAC (*Diplotaxis eruroides* L.) KAO IZVORI ISTIH IZOTIOCIJANATA

Hren se već dugi niz godina koristi kao narodna biljka ljekovitih svojstava bogata nutritivnim vrijednostima. U novije vrijeme prvenstveno se uzgaja zbog mesnatog, zadebljanog podanka koji ima intenzivan miris i okus te zbog veoma nježnoglišća. Sadrži veliki broj bioaktivnih spojeva, te se otkrivaju nove primjene hrena u agro-industrijskim i farmaceutskim industrijama te se potiče intenzivnije korištenje korijena i listova u hrani i lijekovima.



Slika 9. List i korijen hrena, *Armoracia rusticana* L.

(Preuzeto s: <https://www.agroklub.com/sortna-lista/povrce/hren-192/>)

Hren (*Armoracia rusticana*) je trajna biljka iz porodice kupusnjača (lat. *Brassicaceae*). Kupusnjače se uzgajaju diljem svijeta, najviše u Europi i Sjevernoj Americi. Hren je kupusnjača koja potječe iz jugoistočne Europe, južne Rusije i Ukrajine, odakle širi se diljem Europe. Raste na svježim do umjereno vlažnim tlima obogaćenim dušikom, za uzgoj se preferiraju sunčana područja. U Europi se najviše uzgaja u Austriji, Češkoj, Mađarskoj, Poljskoj i Rusiji, te u dolini rijeke Mississippi, u Americi.(26).

Tablica 4. Znanstvena klasifikacija *Armoracia rusticana* L.(27).

Kategorija	Vrsta	Rod	Porodica	Red	Razred	Koljeno	Carstvo
Naziv	<i>Armoracia rusticana</i>	<i>Armoracia</i>	<i>Brassicaceae</i>	<i>Brassicales</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Tracheophyta</i>	<i>Plantae</i>



Slika 10. List hrena, *Armoracia rusticana* L.

(Preuzeto s: <https://www.agroklub.com/sortna-lista/povrce/hren-192/>)

Armoracia rusticana, *Cochlearia armoracia* i *Armoracia lapthifolia* znanstvena su imena koja se odnose na višegodišnju biljku hrena. Hren pripada porodici kupusnjača koja se sastoji od 350 rodova s oko 300 vrsta. Biljka može rasti u visinu i do 120 cm. Ima gotovo голу stabljiku iz koje proizlaze valoviti rubni listovi formirajući okrugli oblik centralne rozete. List hrena dugačak je od 30 do 100 cm te se sastoji od srolike baze i duge peteljke. Donji i vršni se listovi oblikom razlikuju. Kraća peteljka, oblik režnja i glatki ili nazubljeni rub karakteristike su donjih listova, dok gornji (vršni) listovi imaju uzak centralni dio, tupi vrh te su duguljastog oblika. Hren ima bijeli, četvrtasti cvijet u obliku grozda i glatki, smeđi plod – plod koji sadrži vrlo malo ili niti jedno sjeme. Za razmnožavanje se koristi isključivo korijenje. Korijen je hrena bijele boje, cilindričnog ili šiljastog oblika. Može doseći dubinu od 60 cm na rastresitim tlima te se sastojati od više bočnog korijenja. Poznate su tri vrste hrena koje se uzgajaju – „uobičajeni“ (poznat i kao „maliner hren“), „boemski“ i „veliki zapadni vrh“ – koji se uglavnom svrstavaju ovisno o kutu i obliku baze lista i kvaliteti korijena. Široko, zgužvano lišće srolike (kut između peteljke i baze lista je manji od 60°) baze i razvijeno korijenje karakteristike su „uobičajenog“ hrena. Za „boemski“ je hren karakteristično lišće srednje veličine okruglog oblika (69-90°) baze lista te glatko, razvijeno korijenje. „Veliki zapadni vrh“ predstavlja hren s glatkim, velikim, uspravnim listovima s konusnom bazom i čvrstim, razvijenim korijenjem (26).

Hranjivi sastojci hrena su: voda 71,8-76,6 %, sirove bjelančevine 1,6-3,73 %, sirove masti 0,3-0,35 %, ugljikohidrati 15,3-15,9 % i vlakna 2,78-2,80 %, minerali 2,2%. Od minerala i vitamina kojima je hren obogaćen su: natrij, kalij, magnezij, kalcij, fosfor, željezo, karoten, vitamin B1, B2, B3, B6, i vitamin C (28).

Tablica 5. Hlapljivi organski spojevi pronađeni u svježem korijenu hrena i rezu korijena čuvanih na 5°C tijekom 12h (26,29).

Spoj	Sobna temp. (min)	Svježi (ppm)	5°C nakon 12h (ppm)
Tiobis metan	1.76	0.8±0.2	1.4±0.1
Ugljikov disulfid	1.81	0.8±0.2	-
3-butenenitril	2.38	7.8±0.1	-
3-metilbutanal	2.73	0.4±0.2	0.6±0.1
2-etilfuran	2.78	1.2±0.1	5.8±0.3
3-metil-1-butanol	3.16	-	1.4±0.1
Toluen	3.69	-	0.8±0.1
Heksanal	4.32	4.5±0.1	3±0.3
E-2-heksanal	5.42	1.6±0.1	3±0.2
Heptanal	6.45	-	0.3±0.1
Alil izotiocijanat	6.64	3,300±2.0	175±2.0
Benzaldehid	7.78	-	0.5±0.1
Izobutil izocijanat	7.85	15±0.3	-
4-izotiocijanat-1-buten	8.45	63±1.0	-
2-pentilfuran	8.45	-	3±0.3
Butil izotiocijanat	8.74	13±0.3	-
2-etil-1-heksanol	9.24	-	1.8±0.2
Bromfenilacetaldehid	9.60	-	0.3±0.1
3-metilbutil izotiocijanat	9.98	8.6±0.2	-
Pentil izotiocijanat	10.78	3.7±0.2	-
Nonanal	10.85	1.6±0.2	1.4±0.2
4-etilbenzaldehid	12.01	-	0.4±0.1
4-metilpentil izotiocijanat	12.02	0.4±0.1	-
L-(-)-mentol	12.20	-	0.2±0.1
Naftalin	12.43	-	0.2±0.1
Dekanal	12.76	-	0.5±0.1
Trans,trans-nona-2,4-dienal	12.95	-	0.2±0.1
Benzenepropanenitril	13.49	0.8±0.1	0.2±0.1
Benzil izotiocijanat	15.67	14±0.2	8.8±2.0
Junipen	16.43	-	0.2±0.1
Italicene	17.24	-	0.8±0.1
2-feniletil izotiocijanat	17.44	400±1.0	432±3.0

Međutim, treba napomenuti da se tijekom hidrolize i daljnjeg raspadanja podanka hrena tijekom dužeg vremena mogu povećati koncentracije ostalih spojeva kao i štetnih organskih spojeva pa je skladištenje hrena i njegova daljnja prerada vrlo važna za optimalno očuvanje svih pozitivnih svojstava. Npr. prilikom čuvanja hrena na 5°C tijekom 12h, pronađen je veliki broj hlapljivih organskih spojeva u korijenu istoga (26,29).

Važno je napomenuti da još jedna biljka jednako bogata hlapljivim spojevima izotiocijanatima kao što je bogat hren jest biljka iz porodice *Brassicaceae* (krstašice), a to je Rigin dvoredac (*Diplotaxis eruroides* L.).

Tablica 6. Znanstvena klasifikacija *Diplotaxis eruroides* L.

Kategorija	Vrsta	Rod	Porodica	Red	Razred	Koljeno	Carstvo
Naziv	<i>Diplotaxis eruroides</i>	<i>Eruroides</i>	<i>Brassicaceae</i>	<i>Brassicales</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Tracheophyta</i>	<i>Plantae</i>

Diplotaxis eruroides L. (Rigin dvoredac) jednogodišnja je (ili prezimljuća) biljka iz porodice *Brassicaceae* (krstašice). Terofit je visine je do 60 cm. Stabljika je uspravna, a ponekad se razgranjuje od same baze. Stabljika je izbrazdana i prekrivena rijetkim krutim dlakama(41).

Listovi su prekriveni jednostavnim, tankim dlakama i pojavljuju se duž cijele stabljike (Slika 23. B). Nepravilni su, duguljasto-lirasti ili perasto razdjeljeni sa 6-10 režnjeva. Donji listovi nalaze se u prizemnoj rozeti (41).

Cvjetovi se sastoje od 4 lapa duga 3-4 mm. Bijele latice s ljubičastim žilicama duge su 7-13 mm. Cvijet ima 6 prašnika, od kojih su dva vanjska kraća od 4 unutarnja. Cvjetovi su grupirani u grozdove koji rastu terminalno na svim ograncima. Cvijeta tijekom cijele godine. Plod je stršća komuška široka do 3 mm i duga do 50 mm.

Rigin dvoredac raste na obrađenim, ali i zapuštenim površinama, uz putove i ceste, na suhozidima i pukotinama starih zidova. U Hrvatskoj je rasprostranjena samo u srednjoj Dalmaciji (41)



Slika 11. Listovi i cvijet biljke: Rigin dvoredac (*Diplotaxis eruroides* L.)

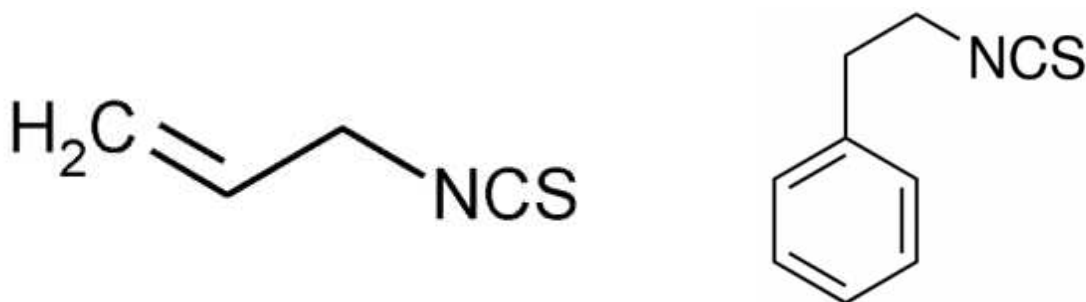
(Preuzeto s: <https://www.agroklub.com/sortna-lista/povrce/hren-192/>)

Obzirom na spojeve izotiocijanata od kojih su posebno značajni feniletil izotiocijanat i alil izotiocijanat kojima je hren (*Armoracia rusticana* L.) obogaćen, tu se po jednakom bogatstvu izotiocijanata istih vrsta može svrstati i *Diplotaxis eruroides* L. (Rigin dvoredac).

1.8. IZOTIOCIJANATI

1.8.1. ALIL IZOTIOCIJANAT (AITC) I FENILETIL IZOTIOCIJANAT (PEITC)

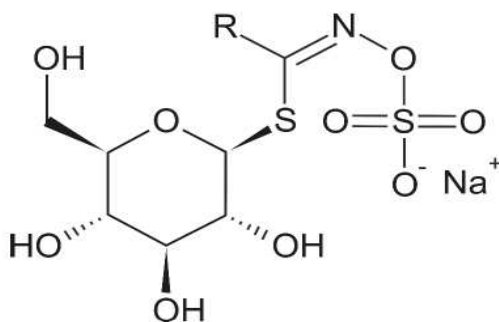
Hren (*Armoracia rusticana* L.) i Rigin dvoredac (*Diplotaxis eruroides* L.) su bogati spojevima koji sadrže sumpor, glukozinolata. Izotiocijanati su biološki aktivni produkti hidrolize glukozinolata. Biljke hren i rigin dvoredac sadrže razne glukozinolate, od kojih hidrolizom nastaju izotiocijanati, na taj način alil izotiocijanat (AITC) nastaje iz glukozinolatnog prekurosa tzv. sinigrina, a feniletil izotiocijanat (PEITC) nastaje iz glukozinolatnog prekurosa tzv. glukorafanina. (33).



Slika 12. Kemijska struktura alil izotiocijanata(AIT) i feniletil izotiocijanata (PEITC) (33).

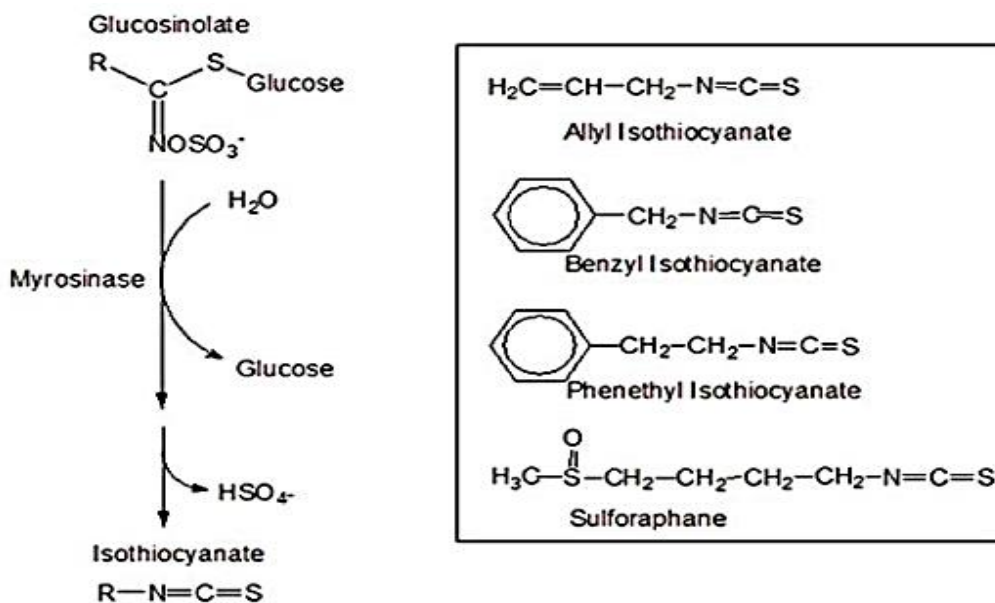
1.8.2. METABOLIZAM IZOTIOCIJANATA

Hren, kao i rigin dvoredac, su jako bogati glukozinolatima, sekundarnim produktima. Na temelju strukture, naročito izmjenom ili vrstom bočnog lanca, glukozinolati mogu biti raspoređeni u razne grupe, a najčešći su alifatski, ωmetiltioalkil, aromatski i heterociklički glukozinolati.



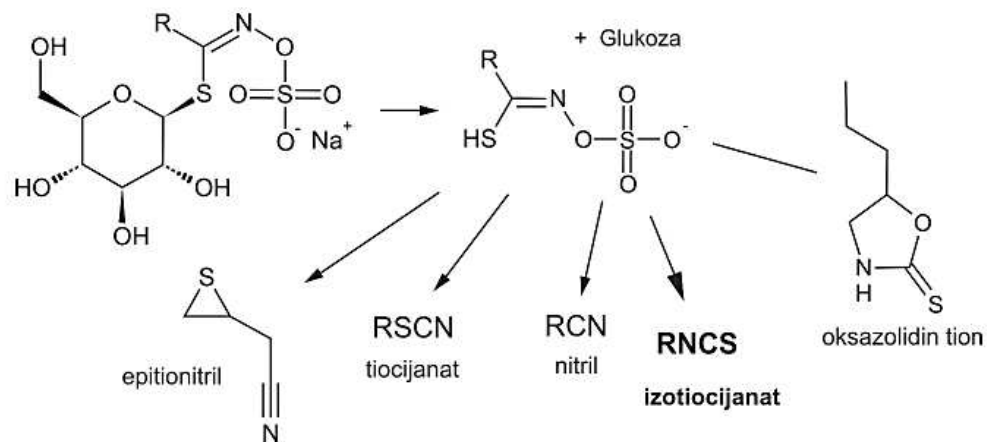
Slika 13. Struktura glukozinolata (30).

Glukozinolati se pretvaraju u razne produkte razgradnje, gdje je jedan od spojeva izotiocijanati. Kad se biljka poput hrena koja sadrži glukozinolate usitnjava ili mehanički obrađuje, glukozinolati dolaze u kontakt s enzimom mirozinazom koja ih hidrolizira. Najčešći produkt dobiven hidrolizom glukozinolata je izotiocijanati kojega čini –NCS grupa i –R bočni lanac. Zbog –NCS grupe, naročito ugljikova atoma, izotiocijanati imaju elektrofilna svojstva. Oni preferiraju reagirati s nukleofilnim molekulama, koje su prisutne u obliku peptida i aminokiselina što dovodi do mogućih farmakoloških učinaka. Elektrofilnost je prisutna zbog –R bočnog lanca u molekuli što može izazvati steričku prepreku na elektrofilnom C atomu. Nadalje, bočni lanac utječe i na lipofilnost molekule (31). Biljke koje sadrže glukozinolate, sadrže enzim tioglukozid glukohidrolazu (mirozinazu). Kad glukozinolati i mirozinaza dolaze u kontakt jedan s drugim u prisutnosti vode, enzim odmah uzrokuje hidrolizu glukozinolata. Produkt hidrolize sastoji se od aglikonske skupine, glukoze i sulfata. U biljnim stanicama glukozinolati su odvojeni od endogenih mirozinaza. Kao rezultat mehaničke rane ili napada patogena, glukozinolat i enzim dolaze u kontakt i dolazi do stvaranja brojnih proizvoda hidrolize. Ovaj glukozinolat-mirozinaza sustav je prisutan u svim ključnim organima, samo u drugačijim koncentracijama te ima važnu obrambenu funkciju (26,32).



Slika 14. Hidroliza glukozinolata katalizirana mirozinazom i kemijske strukture odabranih izotiocijanata

(Preuzeto s: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietaryfactors/phytochemicals/isothiocyanates#reference4>)



Slika 15. Glavni putevi razgradnje glukozinolata pod utjecajem enzima mirozinaze (30).

1.8.3. FARMAKOLOŠKI UČINCI FENILETIL IZOTIOCIJANATA I ALIL IZOTIOCIJANATA

1.8.3.1. OČUVANJE NORMALNE REGULACIJE STANIČNOG CIKLUSA

Nakon diobe stanice, ona prolazi kroz slijed faza poznatih kao stanični ciklus, prije nego što se ponovno podijeli. Nakon oštećenja DNA, stanični ciklus može biti prolazno zaustavljen, kako bi se omogućio popravak DNA, ali ako se šteta ne može popraviti, aktiviraju se putevi koji vode do stanične smrti (apoptoze). Neispravna regulacija staničnog ciklusa može dovesti do širenja mutacije koje pridonose razvoju karcinoma. Na taj način alil izotiocijanat i feniletilizotiocijanat, induciraju zaustavljanje staničnog ciklusa u staničnim kulturama (33,34).

1.8.3.2. PROTUPALNO DJELOVANJE IZOTIOCIJANATA

Upala potiče proliferaciju stanica i inhibira apoptozu, povećavajući rizik od razvoja karcinoma. SFN i PEITC smanjuju sekreciju upalnih signalnih molekula iz bijelih krvnih stanica; ovi spojevi smanjuju i vezanje DNA i NF- κ B, proupalnog transkripcijskog faktora (33,34).

1.8.3.3. POKRETANJE APOPTOZE

Apoptoza koja se očituje kod HeLa stanica raka grlića maternice tretirane s 10 μ M 2-fenil-etil-izotiocijanatom ili alil izotiocijanatom (u istoj ili većoj koncentraciji), otvorila je pitanje o sposobnosti izazivanja apoptoze i vezu s antikancerogenim djelovanjem izotiocijanata. Apoptoza ili „programirana smrt stanice“ uzrokovana je raspadanjem specifičnih staničnih supstrata, što je uzrokovano aktivnošću aspartat-specifičnom cisteinskom proteazom poznatom kao kaspaza. Glavni signali koji dovode do aktiviranja kaspaze dolaze putem „receptora smrti“, kao što su faktori tumorske nekroze te putem mitohondrija. Utvrđeno je da 10 μ M izotiocijanat aktivira kaspazu 9 (put mitohondrija), kaspazu 8 (put „receptora smrti“) i kaspazu 12 (put estrogenih receptora) u spajanju s kaspazom 3 kod čovjeka u stanicama leukemije HL60. Zabilježena je i apoptoza HeLa stanica raka vrata maternice tretiranih s 10 μ M alil izotiocijanatom. Ovo nam ukazuje na sposobnost navedenih komponenti da izazivaju apoptozu i imaju moguće antikancerogeno djelovanje (26,35,36).

1.8.3.4. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE IZOTIOCIJANATA

Izotiocijanati imaju antibakterijski učinak na nekoliko bakterija koji može biti povezan s antikancerogenim učinkom kao što je *Helicobacter pylori*, jednim od danas glavnih uzroka karcinoma želuca. Alil izotiocijanat može uzrokovati oksidativni stres, oštećenje DNA i poticanje smrti stanica kod bakterija, a potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdio mehanizam kojim izotiocijanati djeluju kao antibakterijsko sredstvo. Osim antibakterijskog, izotiocijanati posjeduju i antiprotozoalne i antifungalne aktivnosti čiji se mehanizmi djelovanja također istražuju (26).

1.8.3.5. PROTEKTIVNO DJELOVANJE IZOTIOCIJANATA U RAZVOJU KARCINOMA

Utvrđeno je da prirodni izotiocijanati i njihovi metaboliti inhibiraju razvoj kemijski induciranih karcinoma pluća, jetre, jednjaka, želuca, tankog crijeva, debelog crijeva i dojke u raznim životinjskim modelima. Istraživači su pokušali izračunati izloženost ljudi izotiocijanatima bazirajući se na procjenama unosa izotiocijanata i mjerenju maksimalne količine izotiocijanata koja može biti oslobođena u laboratoriju. Studije koje koriste ovu tehniku otkrile su da je prehrambeni unos izotiocijanata bio znatno niži u Kineskinja i Amerikanaca s dijagnosticiranim

karcinomom pluća, nego u kontrolnoj skupini bez oboljelih od karcinoma. Ocjenjujući prehrambeni unos izotiocijanata, ne može se precizno mjeriti izloženost pojedinca izotiocijanatima, jer drugi faktori mogu izmijeniti iznos 19 formiranih i apsorbiranih izotiocijanata. Mjerenje izlučivanja izotiocijanata i njihovih metabolita može pružiti bolju procjenu izlaganju izotiocijanatima, ali tek je nekoliko je istraživanja ispitivalo povezanost između mokraćnog izlučivanja i rizika od karcinoma. U prospektivnoj studiji, Kinezi s mjerljivom razinom izotiocijanata u mokraći na početku su imali znatno manji rizik od razvoja raka pluća tijekom sljedećih 10 godina, nego muškarci s nemjerljivom razinom. Studija je otkrila da je urinarna ekskrecija izotiocijanata bila znatno niža u Kineskinja s dijagnosticiranim karcinomom dojke u odnosu na kontrolnu skupinu bez karcinoma (33,34).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi djelovanje riginog dvoredca (*Diplotaxis eruroides* L.) dobivenog hidrodestilacijom po Clevengeru te feniletil izotiocijanata i alil izotiocijanata koji se nalaze u jednakim omjerima u riginom dvoredcu i hrenu (*Armoracia rusticana* L.) na apoptozu stanica humanih karcinoma. Djelovanje feniletil izotiocijanata, alil izotiocijanata i *Diplotaxis eruroides* Clevenger ispitivat će se na staničnim linijama trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 i karcinoma mokraćnog mjehura TCCSUP.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE LINIJE

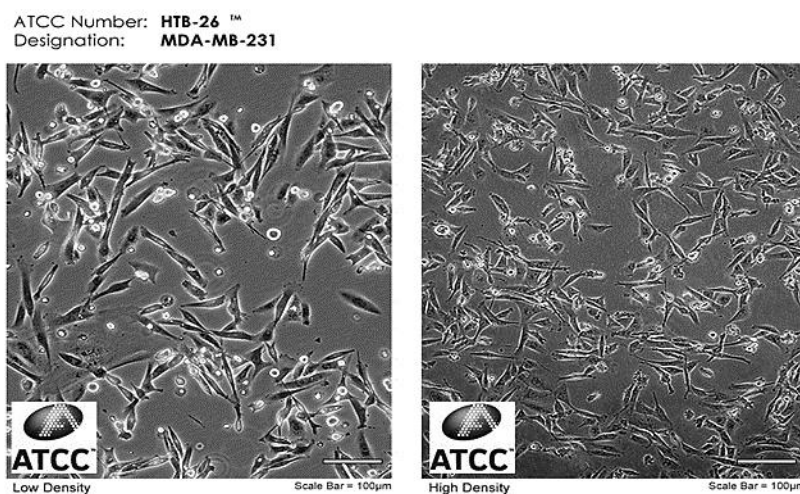
3.1.1. KARCINOM DOJKE-STANIČNA LINIJA MDA-MB-231

In vitro istraživanje ispitivanja djelovanja izotiocijanata se provodilo na karcinomskim stanicama MDA-MB-231.

Tablica 7. Karakteristike MDA-MB-231 stanične linije.

(Podaci preuzeti s: www.lgcstandards-atcc.org)

Organizam	Tkivo	Forma proizvoda	Morfologija	Obilježje kulture	Bolest	Etnitet	Dob i spol
Homo sapiens, čovjek	Dojka, mliječna žlijezda	Smrznuto	Epitelna	Adherentna	Adenokarcinom	Euroljanka	51., žena



Slika 16. Stanice karcinomske linije MDA-MB-231.

(Slika preuzeta sa: www.lgcstandards-atcc.org)

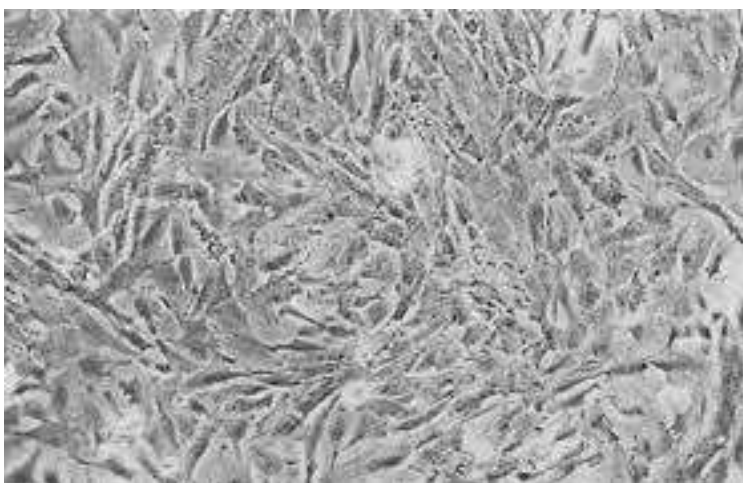
3.1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA-STANIČNA LINIJA TCCSUP

In vitro istraživanje ispitivanja djelovanja izotiocijanata se provodilo na karcinomskim stanicama TCCSUP.

Tablica 8. Karakteristike TCCSUP stanične linije.

(Podaci preuzeti s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-5.aspx>)

Organizam	Tkivo	Forma proizvoda	Morfologija	Obilježje kulture	Bolest	Etnitet	Dob i spol
Homo sapiens, čovjek	Mokraćni mjehur	Smrznuto	Epitelna	Adherentna	4. stupanj karcinoma prijelaznih stanica	Europljanka	67., žena



Slika 17. Stanice karcinomske linije TCCSUP.

(Preuzeto s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-5.aspx>)

3.2. POSTUPAK

Stanične linije su nakon odmrzavanja uzgojene u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO₂. DMEM medij sadrži potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline i minerali te FBS (goveđi serum). Osim toga, u njemu se nalaze i antibiotici, te Red fenol indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti (5).



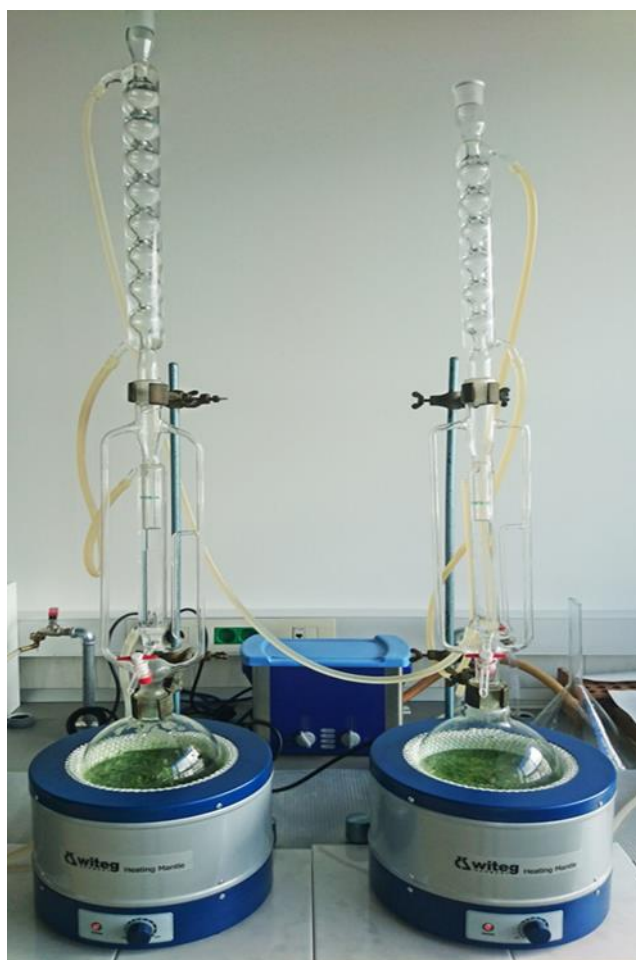
Slika 18. Prikaz vlažnog inkubatora, koji služi za uzgoj stanica
(Preuzeto s: <http://www.nuve.com.tr/Products/Incubation/ec-160-co2>)

Stanice koje su adherirale na podlogu, nakon uklanjanja DMEM-a, tretiraju se tripsinom, enzimom koji cijepanjem peptidnih veza omogućuje odvajanje stanica od podloge te njihovo presađivanje (5).

Brojanje stanica radi se tako da se 10 µl stanica pomiješa s 90 µl Trypan Blue boje koja oboji mrtve stanice te tako omogućava brojenje živih stanica koje nisu obojane. Potom se jednak broj stanica presađuje u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu (5).

3.3. METODA IZOLACIJE

Metodom po Clevengeru izolirana je biljka *Diplotaxis eruroides* L.. Destilacija po Clevengeru spada u kategoriju vodenih destilacija. Hidrodestilacija biljnog materijala se odvija u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata. Kao trap korištena je smjesa organskih otapala pentana i dietiletera u omjeru 3:1 (6 mL+2 mL). Eterično ulje dobiveno nakon destilacije je odvojeno od vodenog sloja pomoću propipete te je posušeno bezvodnim natrijevim sulfatom u svrhu uklanjanja viška vode. Zatim je eterično ulje prebačeno u prethodno odvagano bočicu i spremljeno u zamrzivač do analize na GC-MS-u.



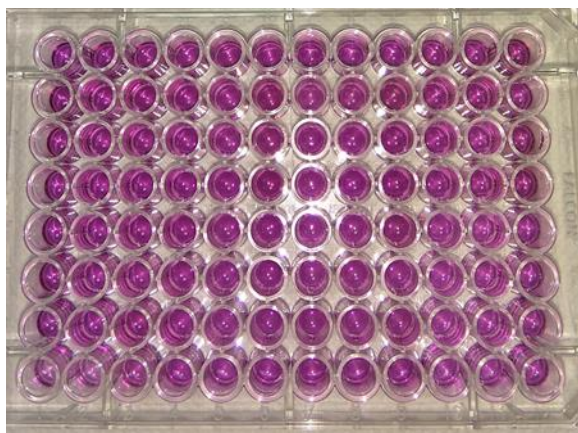
Slika 19. Hidrodestilacija po Clevengeru.

3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA)

U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim vodenim otopinama izotiocijanata i *Diplotaxis eruroides* Clevenger 1 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL i 100 µg/mL, tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice koje predstavljaju kontrolu su ostavljene u samom mediju te u njih nisu dodane otopine izotiocijanata niti otopine *Diplotaxis eruroides* Clevenger.

Stanična živost i proliferacija određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu. Žuti tetrazolin MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) se reducira u metabolički aktivnim stanicama. MTT testom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja jednom od ekstrakata biljaka, jer mrtve, odnosno metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Rezultirajući intracelularni ljubičasti formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski. Da bi se mogla očitati apsorbancija novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid). Nakon jednog sata, medij je uklonjen i dodan je DMSO. Pločice su inkubirane 10 min na 37°C uz treskanje. Apsorbancija je mjerena na 570 nm (4).

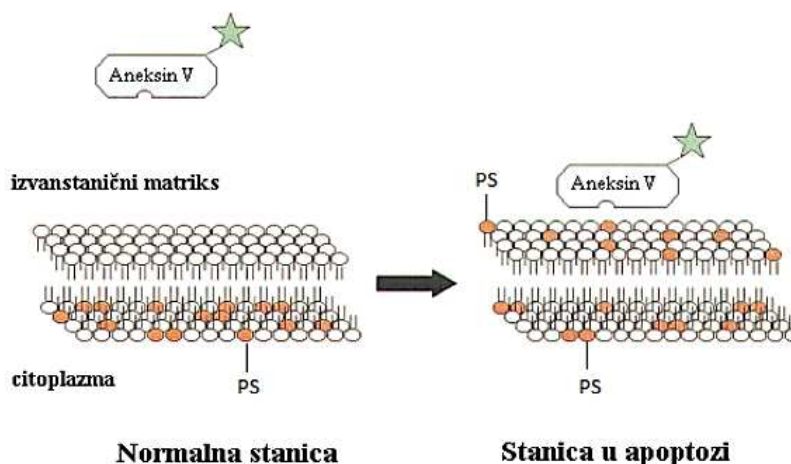
Pokazatelj citotoksične aktivnosti je omjer apsorbancija stanica koje su tretirane otopinama feniletil izotiocijanata, alil izotiocijanata i *Diplotaxis eruroides* Clevenger i onih stanica koje su netretirane.



Slika 20. Nakon dodavanja DMSO (dimetilsulfoksid) došlo je do ljubičastog obojenja (42).

3.5. APOPTOZA

Tijekom apoptoze dolazi do promjena u sastavu stanične membrane, odnosno do prebacivanja fosfolipida s unutarnje na vanjsku stranu membrane. Annexin V se veže na negativno nabijeni fosfatidilserin, koji se kod apoptoze stanica prebacuje na vanjsku stranu membrane. Propidij jodid (PI) se selektivno veže na nukleinske kiseline unutar stanice nakon gubitka integriteta stanične membrane. Kombinacija bojanja aneksinom V konjugiranim s fluorescein izotiocijanatom (FITC) i propidij jodidom omogućuje razlikovanje između živih stanica (Annexin-V-/PI-), rane (Annexin-V+/PI-) i kasne (Annexin-V+/PI+) apoptoze stanica (5,37).



Slika 21. Shematski prikaz gubitka asimetričnosti membrane kod apoptoze (40).

Nakon obrade s izotiocijanatom i *Diplotaxis eruroides* Clevenger, stanice su odvojene od podloge tripsinom, isprane s fosfatnim puferom (PBS) i resuspendirane u 100 ml pufera za vezanje koji sadrži kalcij, te je dodano 5 μ l Annexin V-FITC i 5 μ l propidij jodida (Annexin V FITC-Apoptoza Detection Kit I, BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Stanice su inkubirane tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku i nakon toga analizirane pomoću protočnog citometra (BD Accuri C6, BD Biosciences). Postotak apoptotskih stanica je izražen kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, čija je vrijednost postavljena kao 100% (5,38).

3.6. PROTOČNA CITOMETRIJA

Citometrija je jednostavna, kvantitativna i visokoinformativna metoda za određivanje apoptoze na razini pojedinačnih stanica, pri čemu je dovoljan relativno malen broj stanica u ispitivanom uzorku. Različite morfološke i biokemijske promjene u apoptozi stanice mogu se iskoristiti za citometrijsko određivanje, počevši od plazmolize stanice preko aktivacije kaspaza (cistein aspartil proteaze), gubitka mitohondrijskoga membranskog potencijala, aktivacije endogenih endonukleaza, pa do konačnog gubitka integriteta stanice i formiranja apoptotskih tijela.

Prednost ove metode je mogućnost kombiniranja rezultata dobivenih pomoću prednjeg i bočnoga svjetlosnog snopa (zbog promjene promjera apoptotskih stanica i konformacije unutrašnjih staničnih struktura) s rezultatima analize staničnih markera, tj. specifičnih fluorescentnih protutijela za pojedine apoptotske molekule kao što su Fas, FasL, Bcl-2, p53, fosfatidil serin itd. (5,39).

3.7. STATISTIČKA ANALIZA

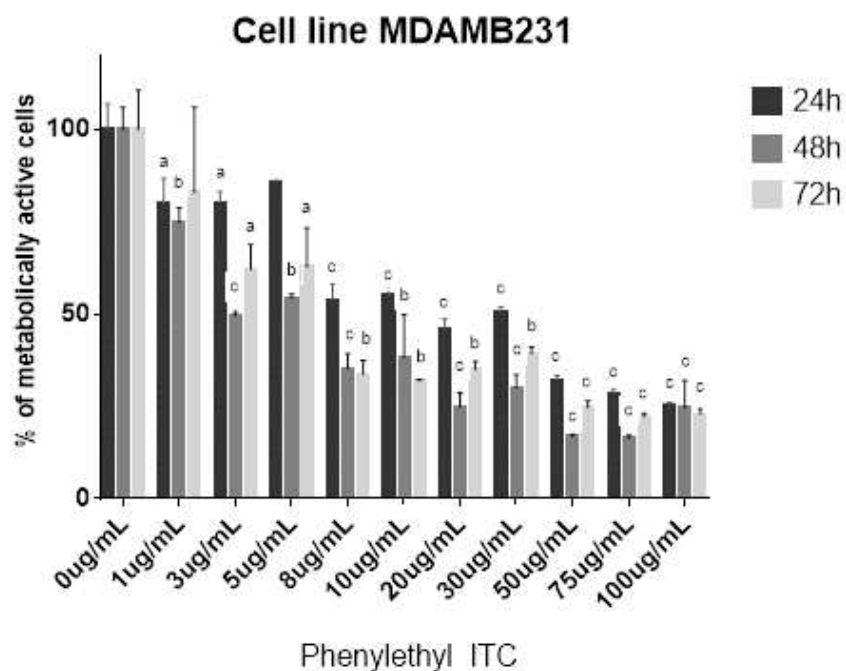
Za statističku analizu korišten je t-test nejednakih varijanci koristeći statistički program GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD) sa statističkom značajnošću $P < 0.05$. Izračunavanje IC50 vrijednosti je također provedeno pomoću GraphPad programa, normalizacijom podataka pomoću tri neovisna mjerenja netretiranih kontrolnih uzoraka (42).

4. REZULTATI

4.1. KARCINOM DOJKE-STANIČNA LINIJA MDA-MB-231

4.1.1. MTT METODA ZA STANIČNU LINIJU MDA-MB-231

4.1.1.1. FENILETIL IZOTIOCIJANAT (MTT METODA)



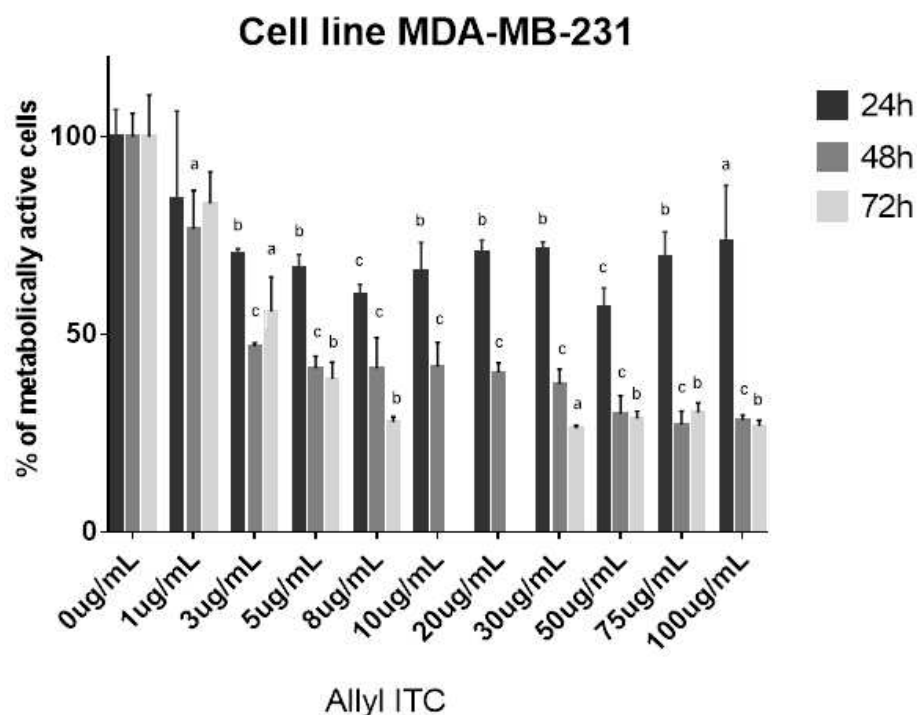
VRIJEME	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	19.18	5.1	7.22

Slika 22. MTT test feniletil izotiocijanata na staničnu liniju MDA-MB-231.

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001).

Feniletil izotiocijanat ostvaruje značajan citotoksični učinak već pri koncentracijama 2.5 µg/mL i 7.5 µg/mL u inkubaciji od 48h (IC50 vrijednost 5.1 µg/mL). Feniletil izotiocijanat ne pokazuje citotoksični učinak u vremenu inkubacije od 4h, dok je pri vremenima inkubacije od 24h i 72h citotoksični učinak nešto slabiji (IC50 za 24h 19.18 µg/mL te za 72h 7.212 µg/mL).

4.1.1.2. ALIL IZOTIOCIJANAT (MTT METODA)



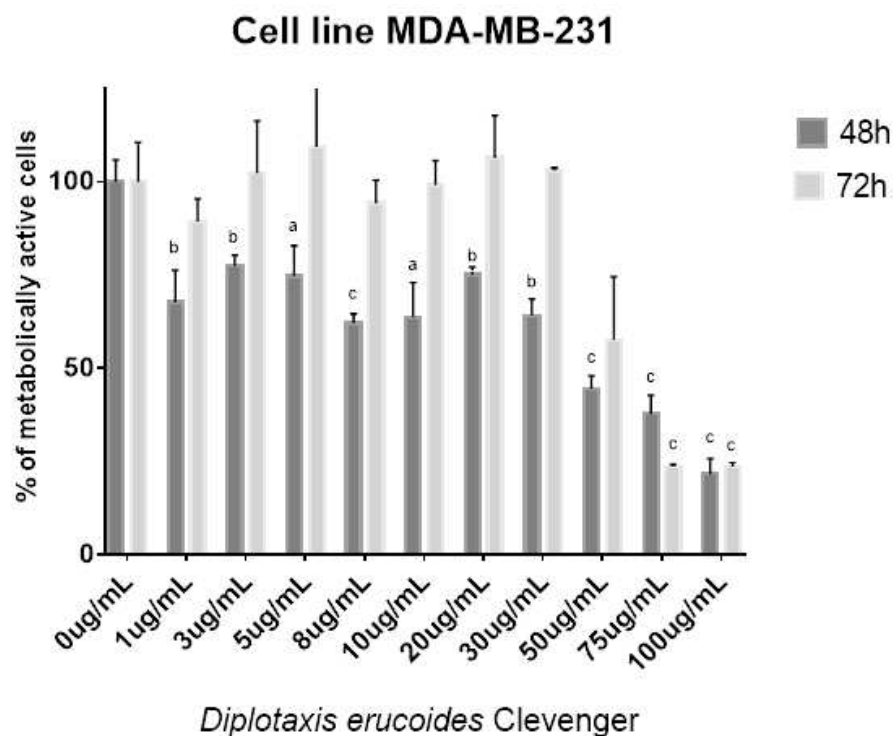
VRIJEME	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	88.11	6.43	4.26

Slika 23. MTT test alil izotiocijanata na staničnu liniju MDA-MB-231.

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001).

Alil izotiocijanat ostvaruje značajan citotoksični učinak već pri koncentracijama 2.5 µg/mL i 7.5 µg/mL u inkubaciji od 48h (IC₅₀ vrijednost 6.43 µg/mL). Alil izotiocijanat ne pokazuje citotoksični učinak u vremenu inkubacije od 4h, dok je pri vremenu inkubacije od 24h citotoksični učinak dosta slabiji (IC₅₀ = 88.11 µg/mL). Najbolji citotoksični učinak alil izotiocijanat pokazuje za vrijeme inkubacije od 72h (IC₅₀ = 4.26 µg/mL).

4.1.1.3. *DIPLOTAXIS ERUCOIDES* CLEVENGER (MTT METODA)



VRIJEME	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	nd	32.17	78.34

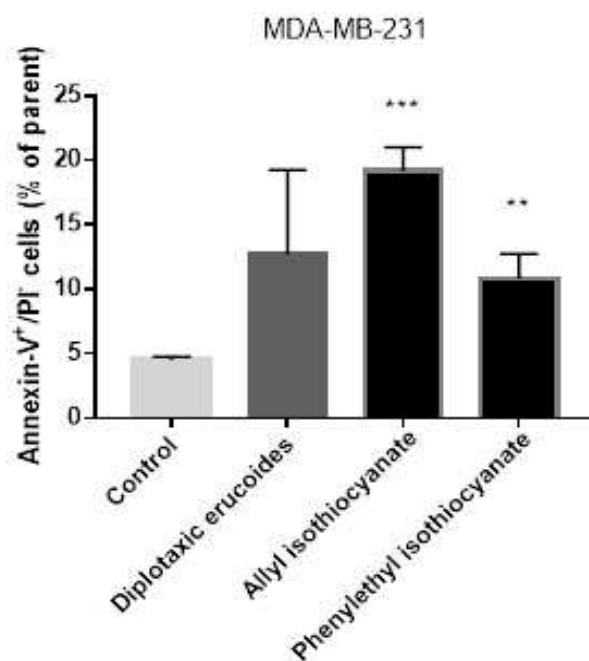
Slika 24 . MTT test *Diplotaxis erucoides* Clevenger na staničnu liniju MDA-MB-231.

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001).

Diplotaxis erucoides Clevenger ostvaruje značajan citotoksični učinak pri višim koncentracijama 50 µg/mL, 75 µg/mL i 100 µg/mL u inkubaciji od 48h (IC50 vrijednost 32.17 µg/mL). Daljnom inkubacijom smanjuje se broj metaboličkih aktivnih stanica samo pri visokim koncentracijama, dok je citotoksični učinak pri nižim koncentracijama značajno slabiji nego kod inkubacije od 48h (IC50 vrijednost za 72h 78.34 µg/mL). *Diplotaxis erucoides* Clevenger ne pokazuje citotoksični učinak u vremenima inkubacije od 4h i 24h.

4.1.2. PROTOČNA CITOMETRIJA ZA STANIČNU LINIJU MDA-MB-231

4.1.2.1. RANA APOPTOZA



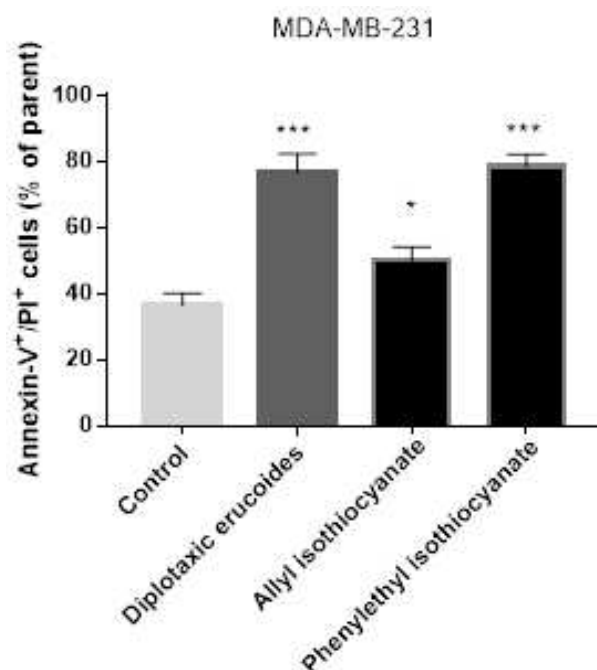
MDAMB231	EARLY APOPTOSIS		
	PARENT		
	Significant?	P value	
Diplotaxis	No	0,097125578	
	Significant?	P value	
Alil ITC	Yes	0,00063797	***
	Significant?	P value	
Feniletil ITC	Yes	0,005189771	**

Slika 25. Utjecaj *Diplotaxis erucoides* Clevenger, alil izotiocijanata i feniletil izotiocijanata na ranu apoptozu stanične linije MDA-MB-231.

(** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Alil izotiocijanat je imao najveći učinak na povećanje postotka stanica u ranoj apoptozi u odnosu na kontrolne stanice stanične linije MDA-MB-231 ($P < 0.001$). Feniletil izotiocijanat ima gotovo dvostruko slabiji učinak od alil izotiocijanata na ovu staničnu liniju, ali i dalje se vidi značajno povećanje postotka stanica u ranoj apoptozi u odnosu na kontrolne stanice ($P < 0.01$). *Diplotaxis erucoides* Clevenger nije značajno utjecao na ranu apoptozu ove stanične linije ($P > 0.05$).

4.1.2.2. KASNA APOPTOZA



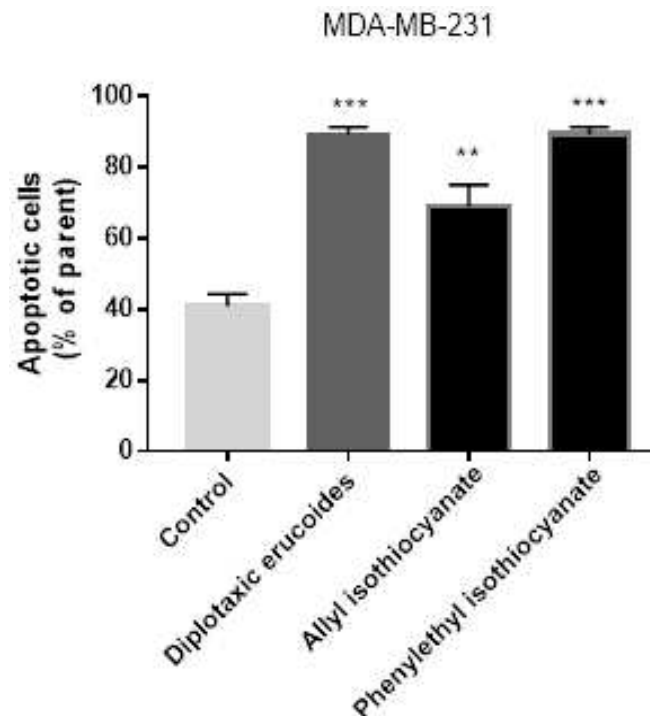
MDAMB231	LATE APOPTOSIS PARENT		
	Significant?	P value	
Diplotaxis	Yes	0,000513071	***
Alil ITC	Significant?	P value	
	Yes	0,029727343	*
Feniletil ITC	Significant?	P value	
	Yes	0,000133441	***

Slika 26. Utjecaj *Diplotaxis erucoides* Clevenger, alil izotiocijanata i feniletil izotiocijanata na kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231.

(* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

Feniletil izotiocijanat i *Diplotaxis erucoides* Clevenger su pokazali značajan učinak na povećanje postotka stanica u kasnoj apoptozi u odnosu na kontrolne stanice stanične linije MDA-MB-231 (više od dvostrukog postotka stanica u kasnoj apoptozi; $P < 0.001$ za oba uzorka). Alil izotiocijanat je imao nešto slabiji, ali i dalje statistički značajan, učinak na kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB231 u odnosu na prva dva uzorka ($P < 0.05$).

4.1.2.3. RANA+KASNA APOPTOZA



MDAMB231	EARLY + LATE APOPTOSIS PARENT		
	Significant?	P value	
Diplotaxis	Yes	3,01208E-05	***
Alil ITC	Yes	0,006144796	**
Feniletil ITC	Yes	2.66589E-05	***

Slika 27. Utjecaj *Diplotaxis erucoides* Clevenger, alil izotiocijanata i feniletil izotiocijanata na ukupnu (ranu + kasnu) apoptozu stanične linije MDA-MB-231.

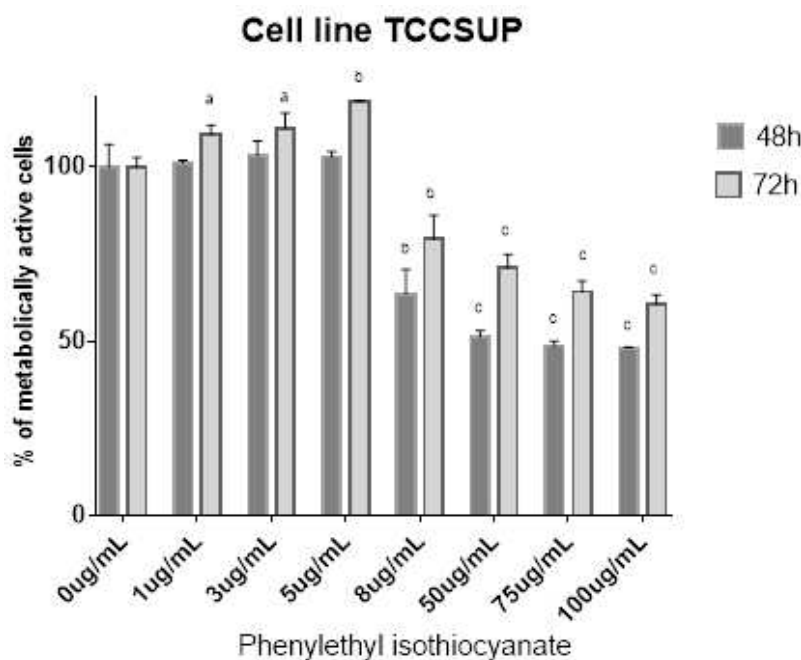
(** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Gledajući ukupno ranu i kasnu apoptozu, feniletil izotiocijanat i *Diplotaxis erucoides* Clevenger su pokazali značajan učinak na povećanje postotka stanica u apoptozi u odnosu na kontrolne stanice stanične linije MDA-MB-231 (više od dvostrukog postotka stanica u apoptozi; $P < 0.001$ za oba uzorka). Alil izotiocijanat je imao nešto slabiji, ali i dalje statistički značajan, učinak na povećanje postotka stanica u apoptozi linije MDA-MB231 u odnosu na prva dva uzorka ($P < 0.01$).

4.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA - STANIČNA LINIJA TCCSUP

4.2.1. MTT METODA ZA STANIČNU LINIJU TCCSUP

4.2.1.1. FENILETIL IZOTIOCIJANAT (MTT METODA)



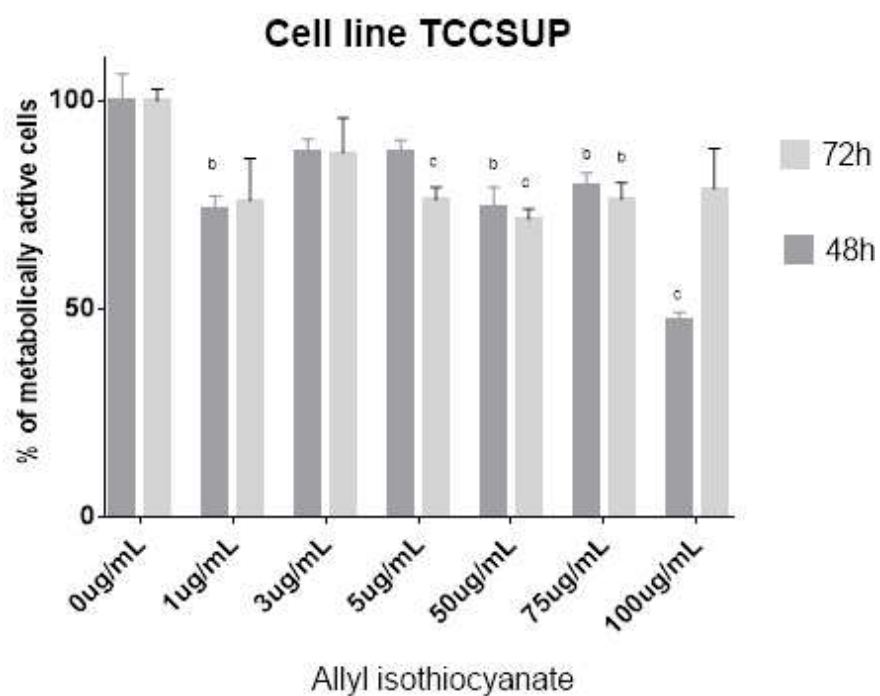
VRIJEME	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	nd	50.56	nd

Slika 28. MTT test feniletil izotiocijanata na staničnu liniju TCCSUP.

(a, P vrijednost < 0.05 ; b, P vrijednost < 0.01 ; c, P vrijednost < 0.001).

Feniletil izotiocijanat ostvaruje najznačajniji citotoksični učinak pri višim koncentracijama 50 µg/mL, 75 µg/mL i 100 µg/mL u vremenu inkubacije od 48h (IC₅₀ vrijednost 50.56 µg/mL). Feniletil izotiocijanat ne pokazuje citotoksični učinak u vremenima inkubacije od 4h i 24h, dok je pri vremenu inkubacije od 72h citotoksični učinak dosta slabiji (IC₅₀ se ne može definirati).

4.2.1.2. ALIL IZOTIOCIJANAT (MTT METODA)



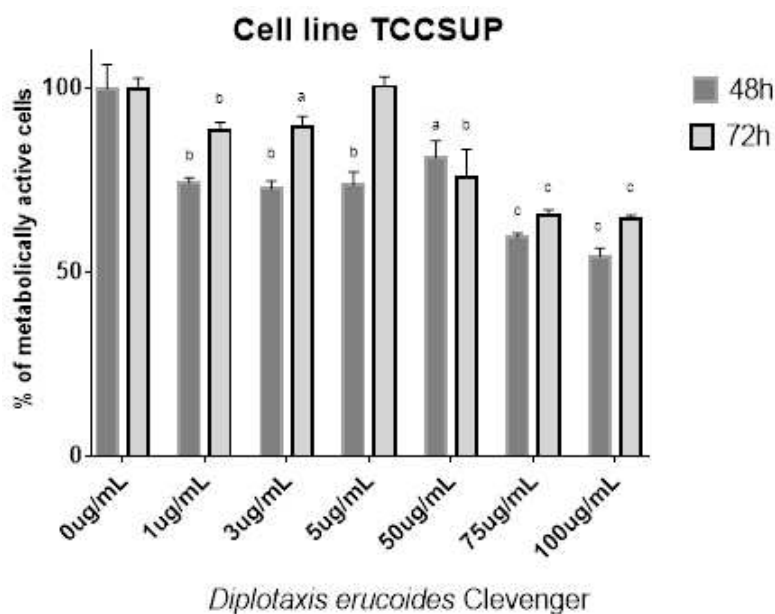
VRIJEME	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	nd	nd	nd

Slika 29. MTT test alil izotiocijanata na staničnu liniju TCCSUP.

(b, P vrijednost < 0.01 ; c, P vrijednost < 0.001)

Alil izotiocijanat ostvaruje citotoksični učinak samo pri koncentraciji 100 µg/mL u inkubaciji od 48 h (IC50 vrijednost nije bilo moguće definirati). Alil izotiocijanat ne pokazuje citotoksični učinak u vremenima inkubacije od 4, 24 i 72 sata.

4.2.1.3. *DILOTAXIS ERUCOIDES* CLEVANGER (MTT METODA)



VRIJEME	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	nd	nd	nd

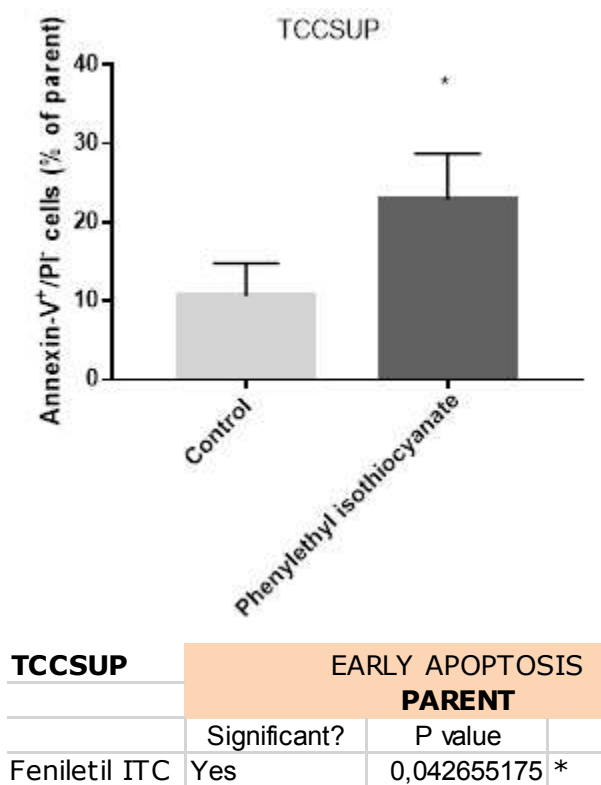
Slika 30. MTT test *Diplotaxis erucoides* Clevenger na staničnu liniju TCCSUP.

(a, P vrijednost < 0.05 ; b, P vrijednost < 0.01 ; c, P vrijednost < 0.001).

Diplotaxis erucoides Clevenger pokazuje slab citotoksičan učinak pri svim koncentracijama u svim vremenima inkubacije pa se IC50 vrijednosti nisu mogle definirati. Vidljivo je da s porastom koncentracije učinak raste, ali i dalje ostaje slab. Najbolji učinak je pri vremenu inkubacije od 48h.

4.2.2. PROTOČNA CITOMETRIJA ZA STANIČNU LINIJU TCCSUP

4.2.2.1. RANA APOPTOZA ZA FENILETIL IZOTIOCIJANAT

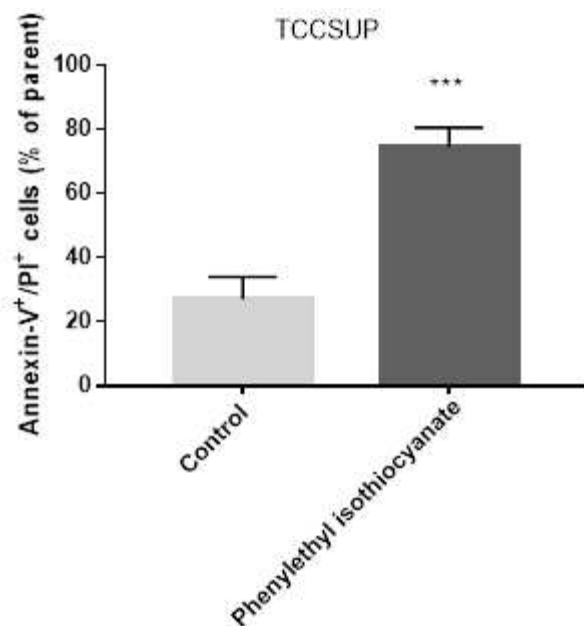


Slika 31. Utjecaj feniletil izotiocijanata na ranu apoptozu stanične linije TCCSUP.

(* $P < 0.05$).

Feniletil izotiocijanat je pokazao značajan učinak na povećanje postotka stanica u ranoj apoptozi u odnosu na kontrolne stanice stanične linije TCCSUP (oko dvostrukog postotka stanica u ranoj apoptozi; $P < 0.05$).

4.2.2.2. KASNA APOPTOZA ZA FENILETIL IZOTIOCIJANAT

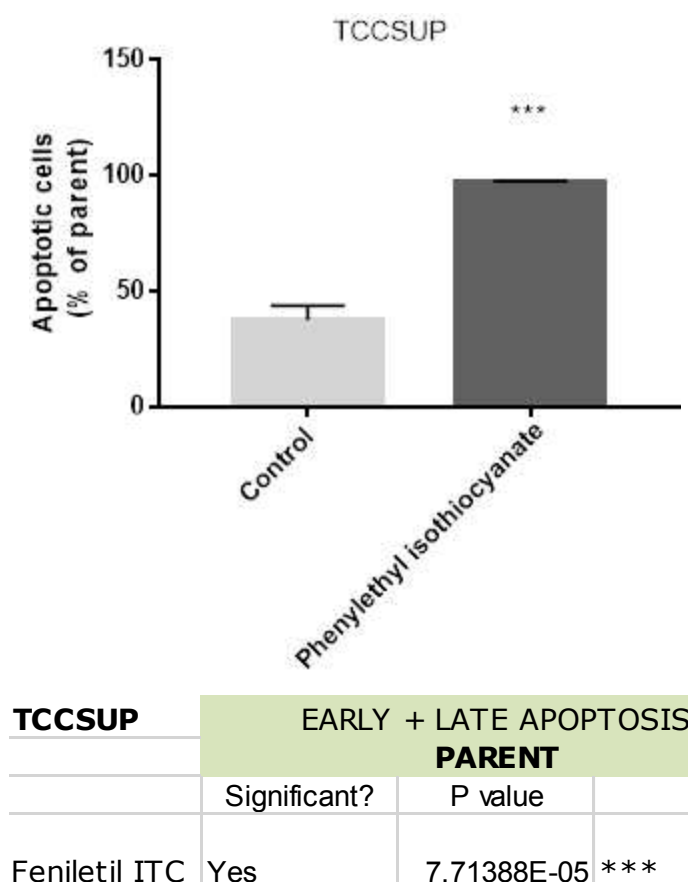


TCCSUP	LATE APOPTOSIS PARENT		
	Significant?	P value	
Feniletil ITC	Yes	0.000851131	***

Slika 32. Utjecaj feniletil izotiocijanata na kasnu apoptozu stanične linije TCCSUP.
(*** $P < 0.001$).

Feniletil izotiocijanat je pokazao značajan učinak na povećanje postotka stanica u kasnoj apoptozi u odnosu na kontrolne stanice stanične linije TCCSUP (oko dvostrukog postotka stanica u kasnoj apoptozi; $P < 0.001$).

4.2.2.3.RANA + KASNA APOPTOZA ZA FENILETIL IZOTIOCIJANAT



Slika 33. Utjecaj feniletil izotiocijanata na ukupnu apoptozu stanične linije TCCSUP.
(*** $P < 0.001$).

Gledajući ukupno ranu i kasnu apoptozu, feniletil izotiocijanat je pokazao značajan učinak na povećanje postotka stanica u apoptozi u odnosu na kontrolne stanice stanične linije TCCSUP (oko 2,5 puta veći postotak stanica u apoptozi; $P < 0.001$).

5. RASPRAVA

Rak je skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju po svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici, te posljedično i po načinu liječenja, a nastaje kao posljedica abnormalne proliferacije stanica. Svim vrstama raka zajedničko je da nastaju od zdravih stanica organizma procesom koji se zove zloćudna pretvorba (1). Rizik od raka višestruko je veći kod osoba čiji je imunološki sustav potisnut zbog bilo kojeg čimbenika, uključujući kronični stres, starost, kroničnu bolest, prethodnu uporabu kemoterapije i prekomjernu uporabu lijekova kao što su analgetici, antibiotici i kortikosteroidi. Poznato je da su neke vrste raka povezane s određenim rizičnim ponašanjima i čimbenicima rizika iz okoline u većoj ili manjoj mjeri te da isto tako postoji genetička predispozicija za razvoj raka unutar nekih obitelji. Na većinu izloženosti čimbenicima rizika može se utjecati ispravnim životnim navikama i različitim društvenim mjerama te tako smanjiti rizik za obolijevanje od raka. Tu su još ostali čimbenici rizika tj. čimbenici povezani sa stilom života (pušenje duhana, pasivno pušenje, konzumacija alkohola, neadekvatne prehrambene navike, seksualne navike itd.), okolišni čimbenici (Sunčevo zračenje, radon, aflatoksini itd.), čimbenici povezani s profesionalnom izloženošću (digoksin, azbest, etilvinil-klorid, nikal, arsen itd.), biološki čimbenici (Epstein-Barr virus, virus hepatitisa B i C, HIV tipa 1, humani papiloma virus tipovi 16 i 18, humani virus T- staničnog limfoma tipa 1, *H. pylori*) (4).

Rak je danas jedan od vodećih uzrka smrtnosti u svijetu. Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će se globalno broj oboljelih povećati s 18 milijuna u 2018. godini na 29.5 milijuna u 2040. godini, dok će broj umrlih porasti sa 9.5 milijuna na 16.4 milijuna godišnje. Najčešći uzroci smrti od raka u svijetu zabilježeni u 2018. godini su: rak pluća, rak debelog crijeva, rak želuca, rak jetre i rak dojke (12).

Rak dojke u razvijenim zemljama, među kojima je i Hrvatska, najčešće je sijelo karcinoma u žena (25%) i uzrokuje 20% smrti od raka u ženskoj populaciji, te je zbog toga značajan javnozdravstveni problem (18-23). Različiti čimbenici rizika utječu na nastanak raka dojke: dob, pozitivna obiteljska anamneza, starija životna dob prvorotkinje, žene koje nisu rodile, rana menarha, kasna menopauza, zračenje, debljina, oralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija, dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke i brojni drugi čimbenici rizika (5).

Najčešća neoplazma mokraćnog sustava je karcinom mokraćnog mjehura. Incidencija raka mokraćnog mjehura je četiri puta veća kod muškarca nego kod žena te dva puta veća u pripadnika crne rase u odnosu na bijelu rasu (5). Čimbenici rizika za nastanak raka mokraćnog mjehura su

pušenje, izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, određenim lijekovima (ciklofosamid, fenacetin), postojanje kamenaca, kronična upala te shistosomijaza (povezana je s rakom pločastih stanica) (6,15).

Kemoterapija se rutinski koristi za liječenje raka. Budući da stanice raka gube mnoge regulatorne funkcije prisutne u normalnim stanicama, i dalje se dijele kada normalne stanice to ne čine. Ova značajka čini stanice raka osjetljive na kemoterapijske lijekove. Otprilike pet desetljeća sustavnog otkrivanja i razvoja lijekova dovelo je do uspostavljanja velike zbirke korisnih kemoterapeutskih sredstava. Međutim, kemoterapijski tretmani nisu lišeni vlastitih negativnih učinaka. Različite vrste toksičnosti mogu se pojaviti kao posljedica kemoterapijskih tretmana. Toksičnost kemoterapijskih lijekova ponekad stvara značajan problem u liječenju raka (4).

Biljke imaju ogroman potencijal za otkrivanje novih lijekova i kao takve su spremnik prirodnih kemikalija koje mogu pružiti kemoprotektivni potencijal protiv raka (4).

Hren (*Armoracia rusticana* L.) i rigin dvoredac (*Diplotaxis eruroides* L.) imaju kemijske sastojke u istom omjeru koji pokazuju protuupalno djelovanje. Ove biljke također potiču detoksikaciju određenih karcinogenih enzima i toksične su za mnoge vrste stanica raka. Konzumacija *Armoracia rusticana* L. i *Diplotaxis eruroides* L. može značajno smanjiti učestalost smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom. Zapravo, dokazi pokazuju da pojedinci čija je prehrana bogata hrenom i riginim dvoredcom imaju niži rizik od razvoja raka. *Armoracia rusticana* L. i *Diplotaxis eruroides* L. sadrže kemijske komponente koje se nazivaju glukozinolati koji se pretvaraju u izotiocijanate putem žvakanja kao rezultat oslobađanja enzima mirozinaze (4, 26).

Feniletil izotiocijanat i alil izotiocijanat, vrste izotiocijanata koje u istom omjeru sadrži i hren i rigin dvoredac, pokazali su obećavajuću kemoprevencijsku aktivnost protiv raka, kao i antibakterijsko djelovanje. Kemopreventivni mehanizmi izotiocijanata uključuju modulaciju proteina povezanih s rakom koji su uključeni u upale, zaustavljanje staničnog ciklusa, staničnu smrt, angiogenezu, invaziju i metastaziranje zajedno s modulacijom enzima koji metaboliziraju karcinogene tvari (4,26).

Predmet našeg istraživanja su feniletil izotiocijanat, alil izotiocijanat (izotiocijanati kojima su bogati hren i rigin dvoredac u istom omjeru) i *Diplotaxis eruroides* dobiven hidrodestilacijom po

Clevengeru te je ispitivan njihov citotoksični učinak na staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231 i karcinoma mjehura TCCSUP.

Sva tri uzorka su imali puno značajniji citotoksični učinak na MDA-MB-231 staničnu liniju nego na TCCSUP liniju.

Feniletil izotiocijanat i alil izotiocijanat ostvaruju značajan citotoksični učinak na MDA-MB-231 stanice već pri jako niskim koncentracijama (2.5 µg/mL i 7.5 µg/mL) nakon inkubacije od 48h (IC₅₀ vrijednost za feniletil izotiocijanat 5.1 µg/mL, a za alil izotiocijanat 6.428 µg/mL). Dulja inkubacija još dodatno pojačava citotoksični učinak alil izotiocijanata na MDA-MB-231 stanice (IC₅₀ za 72h = 4.257 µg/mL). *Diplotaxis eruroides* Clevenger ostvaruje značajan citotoksični učinak na MDA-MB-231 stanice pri višim koncentracijama (50 µg/mL, 75 µg/mL i 100 µg/mL) u inkubaciji od 48h (IC₅₀ vrijednost 32.17 µg/mL). Daljnom inkubacijom smanjuje se broj metaboličkih aktivnih stanica samo pri visokim koncentracijama, dok je citotoksični učinak pri nižim koncentracijama značajno slabiji nego kod inkubacije od 48h (IC₅₀ vrijednost za 72h 78.34 µg/mL).

Tretman MDA-MB-231 stanica koncentracijama jednakim IC₅₀ vrijednostima za 48h inkubacije pokazao je da je mehanizam citotoksične aktivnosti za sve uzorke bio poticanje apoptoze. Alil izotiocijanat je imao najveći učinak na povećanje postotka stanica u ranoj apoptozi u odnosu na kontrolne stanice stanične linije MDA-MB-231 ($P < 0.001$). S druge strane, feniletil izotiocijanat i *Diplotaxis eruroides* Clevenger su pokazali značajan učinak na kasnu apoptozu ovih stanica (više od dvostrukog postotka stanica u kasnoj apoptozi; $P < 0.001$ za oba uzorka). Gledajući ukupno ranu i kasnu apoptozu, feniletil izotiocijanat i *Diplotaxis eruroides* Clevenger su pokazali nešto veći učinak na povećanje postotka stanica u apoptozi u odnosu na kontrolne stanice linije MDA-MB-231 ($P < 0.001$ za oba uzorka) od alil izotiocijanata, koji je imao nešto slabiji, ali i dalje statistički značajan učinak ($P < 0.01$).

Od sva tri uzorka, samo feniletil izotiocijanat ostvaruje značajan citotoksični učinak na stanice TCCSUP linije i to samo pri višim koncentracijama (50 µg/mL, 75 µg/mL i 100 µg/mL) u vremenu inkubacije od 48h (IC₅₀ vrijednost 50.56 µg/mL), dok daljnjom inkubacijom učinak slabi. Alil izotiocijanat ostvaruje slab citotoksični učinak samo pri koncentraciji najvećoj koncentraciji od 100 µg/mL u inkubaciji od 48 h (IC₅₀ vrijednost nije bilo moguće definirati), dok *Diplotaxis eruroides* Clevenger pokazuje slab citotoksičan učinak pri svim koncentracijama u svim

vremenima inkubacije pa se IC50 vrijednosti nisu mogle definirati. Vidljivo je da s porastom koncentracije učinak raste, ali i dalje ostaje slab. Najbolji učinak je pri vremenu inkubacije od 48h.

Tretman feniletil izotiocijanatom TCCSUP stanica koncentracijom jednakoj IC50 vrijednosti za 48h inkubacije pokazao je da je mehanizam citotoksične aktivnosti feniletil izotiocijanata bio poticanje apoptoze. Feniletil izotiocijanat je pokazao značajan učinak na dvostruko povećanje postotka stanica u ranoj, kasnoj i ukupnoj (rana + kasna) apoptozi u odnosu na kontrolne stanice stanične linije TCCSUP ($P < 0.05$ za ranu apoptozu, $P < 0.001$ za kasnu apoptozu i $P < 0.001$ za ranu + kasnu apoptozu).

Na temelju navedenih rezultata, vidljivo je da biljne vrste *Armoracia rusticana* L. i *Diplotaxis erucoides* L. i najvažniji izotiocijanati prisutni u obje biljke 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 trostruko negativnog raka dojke stanične linije MDA-MB-231 i dosta slabije na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura stanične linije TCCSUP. Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica, tj, citotoksični učinak povezan je s koncentracijom i vremenom izlaganja, te je glavna hipoteza potvrđena i cilj istraživanja je ostvaren. Potrebno je provesti dodatna *in vitro* i *in vivo* istraživanja koja bi utvrdila pozitivne učinke, kako bi se ovi spojevi ili lijekovi temeljeni na njihovoj strukturi, mogli uvrstiti u terapiju različitih bolesti, a posebice značajno kod trostruko negativnog raka dojke.

6. ZAKLJUČAK

- 1) *In vitro* izlaganje stanica raka dojke stanične linije MDA-MB-231 i karcinoma mokraćnog mjehura stanične linije TCCSUP uzorcima ruginog dvoredca (*Diplotaxis eruroides* L.) izoliranog hidrodestilacijom po Clevengeru te izotiocijanatima iz te biljke – alil izotiocijanat i feniletil izotiocijanat dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.
- 2) Najbolji citotoksični utjecaj na staničnu liniju raka dojke stanične linije MDA-MB-231 pokazali su feniletil izotiocijanat i alil izotiocijanat, dok je *Diplotaxis eruroides* Clevenger imao nešto slabiji citotoksični učinak na ovu staničnu liniju..
- 3) Na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura TCCSUP jedino je feniletil izotiocijanat pokazao citotoksični učinak, dok za alil izotiocijanat i *Diplotaxis eruroides* Clevenger citotoksični učinak nije uočen.
- 4) Tretman stanica koncentracijama jednakim IC50 vrijednostima za 48h inkubaciju pokazao je da je mehanizam citotoksične aktivnosti za sve uzorke bio poticanje apoptoze. Alil izotiocijanat, feniletil izotiocijanat i *Diplotaxis eruroides* Clevenger utjecali su na povećanje postotka stanica u apoptози stanične linije MDA-MB-231, kao i feniletil izotiocijanat kod stanične linije TCCSUP.
- 5) Ispitivani ekstrakti pokazuju citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- 6) Djelovanje izoliranih ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u nekim slučajevima dolazi do blagog oporavka stanica.

7. LITERATURA

- 1) Vrdoljak E, Šamija M., Kusić Z, Petković, M, Gugić D, Krajina Z. Biologija raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. P. 1-10.
- 2) Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur., Zloćudna preobrazba i rast: Nestabilnost genoma i poremećaj staničnog ciklusa u karcinogenezi. In: Kovač Z, editor. Patofiziologija. 7. Obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. pp. 669-672.
- 3) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Bilten 41, Zagreb, 2019. https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2016_zavrsna.pdf Datum pristupa: 29.9.2020.
- 4) Polunić A. (2018) Citotoksično djelovanje polisulfida iz porodice lukova (*Allium* spp.) na različite linije humanih karcinoma mjereno MTT. Diplomski rad. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet
- 5) Jerinić R. (2017) DJELOVANJE OLEUROPEINA IZ EKSTRAKTA LISTA DIVLJE MASLINE NA APOPTOZU RAZLIČITIH STANIČNIH LINIJA HUMANIH KARCINOMA. Diplomski rad. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet.
- 6) Rajčić L. (2019) Citotoksično djelovanje odabranih biljaka iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom. Diplomski rad. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet.
- 7) Hongmei Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review [Internet]. Apoptosis and Medicine. 2012 [cited 2016 Sep 19]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review>
- 8) Cooper, M.G. HER. Stanični ciklus: Regulacija programirane stanične smrti. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. 3rd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. p. 580–2.

- 9) Lim YJ, Choi JA, Choi HH, Cho SN, Kim HJ, Jo EK, et al. Endoplasmic reticulum stress Pathway-Mediated apoptosis in macrophages contributes to the survival of Mycobacterium tuberculosis. PLoS One. 2011 Dec 14;6(12).
- 10) Kang YH, Yi MJ, Kim MJ, Park MT, Bae S, Kang CM, et al. Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: Reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. Cancer Res. 2004;64(24):8960–7.
- 11) Žlender V. APOPTOSIS – PROGRAMMED CELL DEATH Arh Hig Rada Toksikol 2003;54:267-274
- 12) HZJZ. Odsjek za zloćudne bolesti registrom za rak. Dostupna stranica: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-raka-2020/>
- 13) American Cancer Society. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. 2016.
- 14) Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Šelendić Đ, Lončar J, Čukelj P. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014.
- 15) Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Tumori mokraćnog sustava. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 146-159.
- 16) DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician. 2017 Oct 15;96(8):507-514.
- 17) Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Tumori mokraćnog sustava. Tumori bubrežne nakapnice, mokraćovoda i mokraćnog mjehura. In: Anđa Raič, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 146–8.

- 18) Pinto-Leite R, Arantes-Rodrigues R, Sousa N, Oliveira PA, Santos L. mTOR inhibitors in urinary bladder cancer. *Tumour Biol.* 2016 Sep;37(9):11541–51.
- 19) Bahník V. (2019). Dijagnostički i terapijski postupci kod lezija visokog rizika u dojci (B3). Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.
- 20) Jakić J, Tomić S. Bolesti dojke. U: Ivan Damjanov, SvenSeiwerth, Stanko Jukić, i Marin Nola, ur. *Patologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, Str. 639–659.
- 21) Huete AR. *Japanese Soc Biofeedback Res.* 1992;19:709–15.
- 22) Incidencija raka u hrvatskoj. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske: Zagreb, 2016.
- 23) Boraniæ M. Etiologija i patogeneza tumora dojke. 2006;38:33–42.
- 24) Alduk A.2015. Povezanost morfoloških i kinetičkih osobitosti duktalnoga invazivnoga karcinoma dojke dobivenih magnetnom rezonancijom s patohistološkim prognostičkim pokazateljima. Diplomski rad. Zagreb: SVEUČILIŠTE U ZAGREBU MEDICINSKI FAKULTET
- 25) Cai F-F, Kohler C, Zhang B, Wang M-H, Chen W-J, Zhong X-Y. Epigenetic therapy for breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2011;12:4465–87.
- 26) Gličić A. 2020. SUVREMENA PROIZVODNJA I LJEKOVITA SVOJSTVA HRENA. Diplomski rad. Osijek: SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK.
- 27) Agneta R, Möllers C, Rivelli A.R. (2013.): Horseradish (*Armoracia rusticana*), a neglected medical and condiment species with a relevant glucosinolate profile.

- 28) Lešić R., Boršić J., Buturac I., Ćustić M, Poljak M, Romić D. (2002.): Povrćarstvo.
- 29) Grdo K, Matile (1980): Capillary GC of glucosinolate-derived horseradish constituents, *Phytochemistry*.
- 30) Nguyen N. M, Gonda S, Vasas G. (2013.): A Review on the Phytochemical Composition and Potential Medicinal Uses of Horseradish (*Armoracia rusticana*) Root.
- 31) Zhang Y. (2004.): Cancer-preventive isothiocyanates: Measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat. Res.*, 555: 173-190.
- 32) Vig AP, Rampal G, Thind TS, Arora S. 2008. Bio-protective effects of glucosinolates – A review. *Food Sci Technol* 42:1561–1572.
- 33) <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates>
Datum pristupa: 1010 2020.
- 34) Župčić M. (2017). Citotoksično djelovanje izotiocijanata iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom. Diplomski rad. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet.
- 35) Zhang Y, Tang L, Gonzalez V. (2003.): Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2: 1045-1052.
- 36) Yu R, Mandlekar S, Harvey K.J, Ucker D.S, Kong A.N. (1998.): Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Res.*, 58: 402-408.
- 37) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995 Jul;184(1):39–51.

- 38) BD Pharmingen. Technical Data Sheet. BD Pharmingen; p. 1–3.
- 39) Žlender V. DETECTION OF APOPTOSIS. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2006;57:229–36.
- 40) van Engeland M, Nieland, L. J. W, Ramaekers F. C. ., Schutte B, Reutelingsperger C. P. M. (1998) Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9
- 41) Justić M. Invazivne biljke Hrvatske. Seminarski rad. Zagreb: SVEUČILIŠTE U ZAGREBU PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET BIOLOŠKI ODSJEK INVAZIVNE BILJKE HRVATSKE
- 42) Gabela I. Citotoksično djelovanje kapara (*Capparis spinosa* L.) na različite stanične linije humanih karcinoma. Diplomski rad. Rijeka: SVEUČILIŠTE U RIJECI, ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU, Diplomski sveučilišni studij, (Istraživanje i razvoj lijekova).

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je ispitati učinak apoptoze na dvije stanične linije humanih karcinoma: MDA-MB-231 i TCCSUP. Korišteni su feniletil izotiocijanat, alil izotiocijanat (izotiocijanati kojima su bogati *Armoracia rusticana* L. i *Diplotaxis eruroides* L.) i *Diplotaxis eruroides* izoliran destilacijom po Clevengeru. Stanične linije humanih karcinoma: MDA-MB-231 i TCCSUP tretirane su uzorcima različitih koncentracija 1 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4h, 24h, 48h i 72h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama izotiocijanata te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih uzoraka. Nakon toga je ispitan učinak na apoptozu metodom protočne citometrije pomoću Annexin-V/PI bojanja, gdje je postotak apoptotskih stanica izražen kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, čija je vrijednost postavljena kao 100%. Najbolji citotoksični utjecaj na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 pokazali su feniletil izotiocijanat i *Diplotaxis eruroides* Clevenger. Za razliku od feniletil izotiocijanata i *Diplotaxis eruroides* Clevenger, alil izotiocijanat pokazao je malo slabiji citotoksični učinak na ukupnu apoptozu stanične linije MDA-MB231. Na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura TCCSUP, jedino je feniletil izotiocijanat pokazao citotoksični učinak, dok za alil izotiocijanat i *Diplotaxis eruroides* Clevenger citotoksični učinak nije bilo moguće definirati. Djelovanje izotiocijanata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te ponekad dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak feniletil izotiocijanata, alil izotiocijanata i *Diplotaxis eruroides* izoliranog destilacijom po Clevengeru odabranih biljaka je potvrđen kod MDA-MB-231 stanične linije (trostruko-negativan rak dojke), a samo feniletil izotiocijanata kod TCCSUP stanične linije (rak mokraćnog mjehura). Također je potvrđeno da je mehanizam citotoksičnog djelovanja ovih uzoraka induciranje apoptoze. Idući korak bi bio potvrđivanje tih učinaka u *in vivo* istraživanju na modelima raka dojke i karcinomu mokraćnog mjehura kod životinja.

9. SUMMARY

The aim of the study was to examine the effect of apoptosis on two human cancer cell lines: MDA-MB-231 and TCCSUP. Phenylethyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate (isothiocyanates present in *Armoracia rusticana* L. and *Diplotaxis eruroides* L.) and *Diplotaxis eruroides* isolated by Clevenger distillation, that were used. Human cancer cell lines: MDA-MB-231 and TCCSUP were treated with samples of different concentrations of 1 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL and 100 µg/mL. Cytotoxicity was determined after 4h, 24h, 48h and 72h using the MTT method. The ratio of the absorbance of cells treated with aqueous solutions of isothiocyanates and the absorbance of those not treated is an indicator of the cytotoxic activity of the samples used. The effect on apoptosis was then examined by flow cytometry using Annexin-V/PI staining, where the percentage of apoptotic cells was expressed as the number of positive cells in the total number of cells, whose value was set as 100%. Phenylethyl isothiocyanate and *Diplotaxis eruroides* Clevenger showed the best cytotoxic effect on the MDA-MB-231 breast cancer cell line. Unlike phenylethyl isothiocyanate and *Diplotaxis eruroides* Clevenger, allyl isothiocyanate showed a slightly weaker cytotoxic effect on overall apoptosis of the MDA-MB231 cell line. On the TCCSUP bladder cancer cell line, only phenylethyl isothiocyanate showed a cytotoxic effect, whereas for allyl isothiocyanate and *Diplotaxis eruroides* Clevenger the cytotoxic effect could not be defined. The action of isothiocyanates is not always proportional to the increase of concentration and incubation time, and sometimes cell recovery occurs. The cytotoxic effect of phenylethyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate and *Diplotaxis eruroides* isolated by Clevenger distillation of selected plants was confirmed in MDA-MB-231 cell line (triple-negative breast cancer) and only phenylethyl isothiocyanate in TCCSUP cell line (bladder cancer). It was also confirmed that the mechanism of cytotoxic action of these samples is induction of apoptosis. The next step would be to confirm these effects in an *in vivo* study in models of breast cancer and bladder cancer in animals.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI:

IME I PREZIME: Klaudia Pavičić

DATUM ROĐENJA: 26.06.1995.

MJESTO ROĐENJA: Mostar, BiH

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatica

E-MAIL: klaudiap2606@gmail.com; klaudiap716@gmail.com

ŠKOLOVANJE:

FAKULTET: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko- tehnološki fakultet, smjer: integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije (2015- 2020)

SREDNJA ŠKOLA: Opća Gimnazija Ljubuški

OSNOVNA ŠKOLA: Osnovna škola Ivane Brlić-Mažuranić; Humac, Ljubuški

STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:

Ljekarne Splitsko- dalmatinske županije, Ljekarna Varoš

Galenski laboratorij Split

Analitički laboratorij Split

Bolnička Ljekarna

Trajanje: 8 mjeseci (24.02.2020.-18.09.2020.)

OSTALO:

vozačka dozvola B kategorije