Antiproliferativna aktivnost mikrovalnih ekstrakata sjemenki divlje (Sinapis arvensis L.) i bijele gorušice (Sinapis alba L.)

Mijoč, Domagoj

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:678888

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST MIKROVALNIH EKSTRAKATA SJEMENKI DIVLJE (*Sinapis arvensis* L.) I BIJELE GORUŠICE (*Sinapis alba* L.)

ZAVRŠNI RAD

DOMAGOJ MIJOČ

Matični broj:26

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST MIKROVALNIH EKSTRAKATA SJEMENKI DIVLJE (*Sinapis arvensis* L.) I BIJELE GORUŠICE *(Sinapis alba* L.)

ZAVRŠNI RAD

DOMAGOJ MIJOČ

Matični broj:26

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF WILD (*Sinapis arvensis* L.) AND WHITE (*Sinapis alba* L.) MICROWAVE MUSTARD SEED EXTRACTS

BACHELOR THESIS

DOMAGOJ MIJOČ

Parent number:26

Split, October 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij prehrambene tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: Prof. dr. sc. Tea Bilušić
Pomoć pri izradi: Ivana Vrca, mag. ing. cheming.

ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST MIKROVALNIH EKSTRAKATA SJEMENKI DIVLJE (*Sinapis arvensis* L.) I BIJELE GORUŠICE (*Sinapis alba* L.)

Domagoj Mijoč, 26

Sažetak:

Glukozinolati (β-tioglukozid-*N*-hidroksisulfati) su skupina sekundarnih metabolita koji su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Brassicales. Biološki su neaktivni, a međusobno se razlikuju po strukturi bočnog lanca. Djelovanjem enzima mirozinaze razlažu se na biološki aktivne metabolite poput izotiocijanata i nitrila. Izotiocijanati su hlapljivi sumporovi spojevi koji nastaju hidrolizom glukozinolata pri neutralnoj pH vrijednosti, a po kemijskom sastavu su esteri izotiocijanatne kiseline. Pokazuju antioksidativnu, antiupalnu, antimikrobnu, neurozaštitnu, kardiozaštitnu i antikancerogenu aktivnost. Glukozinolati i njihovi razgradni produkti odgovorni su za karakterističan miris i aromu gorušice i proizvoda od gorušice. Pri izradi rada korišteni su mikrovalni ekstrakti i destilati sjemenki divlje (*Sinapis arvensis* L.) i bijele gorušice (*Sinapis alba* L), a kemijski sastav uzoraka određen je GC-MS analizom. Analizom nisu detektirani razgradni produkti glukozinolata ni u jednom uzorku što ne znači da i nisu prisutni. Citotoksičan učinak uzoraka određen je primjenom MTT metode na staničnim linijama MBA-MB-231 (adenokarcinom dojke) i TCCSUP (karcinom prijelaznih stanica mokraćnog mjehura). Svi uzorci pokazuju citotoksičan učinak na MBA-MB-231 staničnu liniju, ali on nije nužno proporcionalan koncentraciji i trajanju inkubacije. Na staničnu liniju TCCSUP znatniji citotoksičan učinak imao je samo mikrovalni ekstrakt divlje gorušice, a u određenim slučajevima došlo je i do porasta broja stanica karcinoma.

Ključne riječi: Glukozinolati, izotiocijanati, *Sinapis arvensis* L., *Sinapis alba* L., GC-MS, MTT metoda

Rad sadrži: 37 stranica, 23 slike, 6 tablica, 23 literarne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr.sc. Danijela Skroza — predsjednik
2. Izv. prof.dr.sc. Ani Radonić — član
3. Prof. dr. sc. Tea Bilušić — član-mentor

Datum obrane: 2. listopada 2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

Mentor: Tea Bilušić – PhD, full professor
Technical assistance: Ivana Vrca, mag. ing. cheming.

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF WILD (*Sinapis arvensis* L.) AND WHITE (*Sinapis alba* L.) MICROWAVE MUSTARD SEED EXTRACTS

Domagoj Mijoč, 26

Abstract:

Glucosinolates (β-thioglucoside-N-hydroxysulfates) are secondary plant metabolites found in 16 botanical families of the Brassicales order. They are biologically inactive and differ by side chain structure. Myrosinase enzymes hydrolyze glucosinolates to their biologically active metabolites, such as isothiocyanates and nitriles. Isothiocyanates are volatile sulphur containing compounds which are formed by hydrolysis in pH neutral environment and are isothiocyanic acid esters by their chemical composition. They show antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, cardioprotective and anticancer activity. Glucosinolates and their breakdown products are responsible for characteristic odor and aroma of mustard and mustard products. Microwave extracts and distillates of wild (*Sinapis arvensis* L.) and white (*Sinapis alba* L.) mustard seeds were used in the preparation of the paper and their chemical composition was determined by GC-MS analysis. Glucosinolate breakdown products were not detected in any sample, but that doesn't mean that they aren't present. Cytotoxic activity was determined by MTT assay on MBA-MB-231 (breast adenocarcinoma) and TCCSUP (urinary bladder transitional call carcinoma) cancer cell lines. All samples express cytotoxic activity on MBA-MB-231 cell line, but not necessarily proportional with sample concentration and incubation time. Only wild mustard microwave extract has had more significant effect on TCCSUP cell line and in some cases increase in number of cancer cells can be seen.

Keywords: Glucosinolates, isothiocyanates, *Sinapis arvensis* L., *Sinapis alba* L., GC-MS, MTT assay

Thesis contains: 37 pages, 23 figures, 6 tables, 23 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1.	Danijela Skroza - PhD, assistant prof	chair person
2.	Ani Radonić - PhD, associate. prof.	member
3.	Tea Bilušić – PhD, full prof.	member-supervisor

Defence date: October 2, 2019

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tea Bilušić, u razdoblju od svibnja do srpnja 2019. godine.

Rad je financiran od strane HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Mikrovalna ekstrakcija i mikrovalna destilacija sjemenki divlje (*Sinapis arvensis* L.) i bijele gorušice (*Sinapis alba* L.).

- Identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa.

- Određivanje citotoksične aktivnosti 4 različita uzorka primjenom MTT metode.

SAŽETAK

Glukozinolati (β-tioglukozid-*N*-hidroksisulfati) su skupina sekundarnih metabolita koji su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Brassicales. Biološki su neaktivni, a međusobno se razlikuju po strukturi bočnog lanca. Djelovanjem enzima mirozinaze razlažu se na biološki aktivne metabolite poput izotiocijanata i nitrila. Izotiocijanati su hlapljivi sumporovi spojevi koji nastaju hidrolizom glukozinolata pri neutralnoj pH vrijednosti, a po kemijskom sastavu su esteri izotiocijanatne kiseline. Pokazuju antioksidativnu, antiupalnu, antimikrobnu, neurozaštitnu, kardiozaštitnu i antikancerogenu aktivnost. Glukozinolati i njihovi razgradni produkti odgovorni su za karakterističan miris i aromu gorušice i proizvoda od gorušice. Pri izradi rada korišteni su mikrovalni ekstrakti i destilati sjemenki divlje (*Sinapis arvensis* L.) i bijele gorušice (*Sinapis alba* L), a kemijski sastav uzoraka određen je GC-MS analizom. Analizom nisu detektirani razgradni produkti glukozinolata ni u jednom uzorku što ne znači da i nisu prisutni. Citotoksičan učinak uzoraka određen je primjenom MTT metode na staničnim linijama MBA-MB-231 (adenokarcinom dojke) i TCCSUP (karcinom prijelaznih stanica mokraćnog mjehura). Svi uzorci pokazuju citotoksičan učinak na MBA-MB-231 staničnu liniju, ali on nije nužno proporcionalan koncentraciji i trajanju inkubacije. Na staničnu liniju TCCSUP znatniji citotoksičan učinak imao je samo mikrovalni ekstrakt divlje gorušice, a u određenim slučajevima došlo je i do porasta broja stanica karcinoma

Ključne riječi: Glukozinolati, izotiocijanati, *Sinapis arvensis* L:, *Sinapis alba* L., GC-MS, MTT metoda

ABSTRACT

Glucosinolates (β-thioglucoside-N-hydroxysulfates) are secondary plant metabolites found in 16 botanical families of the Brassicales order. They are biologically inactive and differ by side chain structure. Myrosinase enzymes hydrolyze glucosinolates to their biologically active metabolites, such as isothiocyanates and nitriles. Isothiocyanates are volatile sulphur containing compounds which are formed by hydrolysis in pH neutral environment and are isothiocyanic acid esters by their chemical composition. They show antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, cardioprotective and anticancer activity. Glucosinolates and their breakdown products are responsible for characteristic odor and aroma of mustard and mustard products. Microwave extracts and distillates of wild (*Sinapis arvensis* L.) and white (*Sinapis alba* L.) mustard seeds were used in the preparation of the paper and their chemical composition was determined by GC-MS analysis. Glucosinolate breakdown products were not detected in any sample, but that doesn't mean that they aren't present. Cytotoxic activity was determined by MTT assay on MBA-MB-231 (breast adenocarcinoma) and TCCSUP (urinary bladder transitional call carcinoma) cancer cell lines. All samples express cytotoxic activity on MBA-MB-231 cell line, but not necessarily proportional with sample concentration and incubation time. Only wild mustard microwave extract has had more significant effect on TCCSUP cell line and in some cases increase in number of cancer cells can be seen.

Keywords: Glucosinolates, isothiocyanates, *Sinapis arvensis* L:, *Sinapis alba* L., GC-MS, MTT assay

SADRŽAJ

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1. GLUKOZINOLATI KAO BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI 2

1.2. IZVORI GLUKOZINOLATA 4

1.3. IZOTIOCIJANATI-RAZGRADNI PRODUKTI GLUKOZINOLATA 5

1.4. GORUŠICA KAO IZVOR GLUKOZINOLATA 6

1.4.1. Bijela gorušica (*Sinapis alba* L.) 6

1.4.2. Divlja gorušica (*Sinapis arvensis* L.) 7

1.5.ANTIKANCEROGENA AKTIVNOST GLUKOZINOLATA I IZOTIOCIJANATA 8

1.6. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA-MODERNA TEHNIKA EKSTRAKCIJE 10

1.7. PLINSKA KROMATOGRAFIJA SA SPEKTROMETRIJOM MASA 11

1.8. *IN VITRO* ISTRAŽIVANJA ANTIKANCEROGENE AKTIVNOSTI 12

2. EKSPERIMENTALNI DIO 14

2.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA 14

2.2. PRIPREMA UZORAKA 15

2.3. GC-MS ANALIZA 16

2.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI 17

3. REZULTATI I RASPRAVA 20

3.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA 20

3.2. GC-MS ANALIZA 21

3.2.1. Eterično ulje bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) 21

3.2.2. Mikrovalni ekstrakt bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) 22

3.2.3. Eterično ulje divlje gorušice (*Sinapis arvensis* L.)..... 23
3.2.4. Mikrovalni ekstrakt divlje gorušice (*Sinapis arvensis* L.) 24
3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI 25
3.3.1. Karcinom dojke-stanična linija MBA-MB-231 26
3.3.2. Karcinom mokraćnog mjehura-stanična linija TCCSUP 30
4. ZAKLJUČAK..... 34
5. LITERATURA 35

UVOD

Glukozinolati (β-tioglukozid-*N*-hidroksisulfati) su skupina sekundarnih metabolita koji se međusobno razlikuju po strukturi bočnog lanca te mogu biti alifatski, aromatski i indolni . U prirodi je otkriveno više od 200 različitih struktura. Kemijski su stabilni i biološki neaktivni dok ne dođu u dodir s enzimom mirozinazom (β-tioglukozidaza) koja ih razgrađuje do izotiocijanata, nitrila, tiocijanata i drugih metabolita. Najznačajniji izvori glukozinolata u ljudskoj prehrani su biljke iz porodice Brassicaceae, a razgradni produkti glukozinolata su odgovorni za njihov karakterističan okus i miris. Izotiocijanati (R-N=C=S) su hlapljivi sumporovi spojevi koji nastaju hidrolizom glukozinolata pri neutralnom pH. Po kemijskom sastavu su esteri izotiocijanatne kiseline. Biološki su aktivni te pokazuju antioksidativnu, antiupalnu, antimikrobnu, neurozaštitnu, kardiozaštitnu i antikancerogenu aktivnost. Apsorbiraju se pasivnom difuzijom kroz staničnu membranu crijeva, a izlučuju putem merkapturne kiseline u urinu te fecesom, izdisanjem i perspiracijom.

Mikrovalovi su ne-ionizirajući elektromagnetski valovi frekvencije između 300 MHz i 300 GHz. Posljednjih godina u porastu je njihova upotreba u svrhu ekstrakcije biljnih konstituenata. Mikrovalovi izazivaju vibraciju molekula polarnih otapala što dovodi do oslobađanja toplinske energije i narušavanja integriteta biljnih stanica. Zbog direktnog zagrijavanja biljnog materijala postupak je znatno brži, a utrošak električne energije manji. Mikrovalna ekstrakcija je prikladna za ekstrakciju termolabilnih kemijskih spojeva poput glukozinolata i njihovih metabolita. Termička degradacija se dodatno smanjuje maceracijom uzoraka u otapalu.

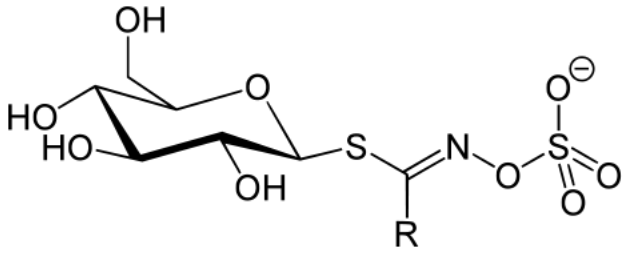
1. OPĆI DIO

1.1. GLUKOZINOLATI KAO BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI

Glukozinolati su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Brassicales.(1,2,3) Prvi otkriveni glukozinolati su sinigrin i sinalbin, a pojam glukozinolata je prvi put upotrijebljen 1986. godine.(2) Glukozinolati su u vodi topivi organski anioni s istim osnovnim strukturalnim obilježjima:

- β-D- glukopiranska jedinica,
- *o*-sulfonirana anomerna Z-tiohidroksimatska funkcijska skupina,
- varijabilni aglukonski bočni lanac. (3)

Međusobno se razlikuju po strukturi bočnog lanca koja je određena aminokiselinom. S obzirom na aminokiseline od kojih potječu dijele se na alifatske (metionin, izoleucin, leucin ili valin), aromatske (fenilalanin ili tirozin) i indolne (triptofan).(1,2,3)



Slika 1. Opća struktura glukozinolata (4)

Kemijski su stabilni i biološki neaktivni sve dok ne dođu u dodir s enzimom mirozinazom (β-tioglukozidaza) koji uzrokuje njihovu hidrolizu. Mirozinaza se nalazi u stanicama biljaka u tvorevinama koje su odvojene od glukozinolata. Oštećivanjem stanica (npr. žvakanjem, usitnjavanjem) enzim se oslobađa te dolazi u kontakt s glukozinolatima i razgrađuje ih do β-D-glukoze i nestabilnog aglukona (tiohidroksimat-*o*-sulfat). Lossenovom pregradnjom nestabilnog aglukona odvaja se sulfatni ion te nastaje neki od biološki aktivnih i/ili toksičnih metabolita. (slika 2) Vrstu metabolita određuje više faktora: R lanac

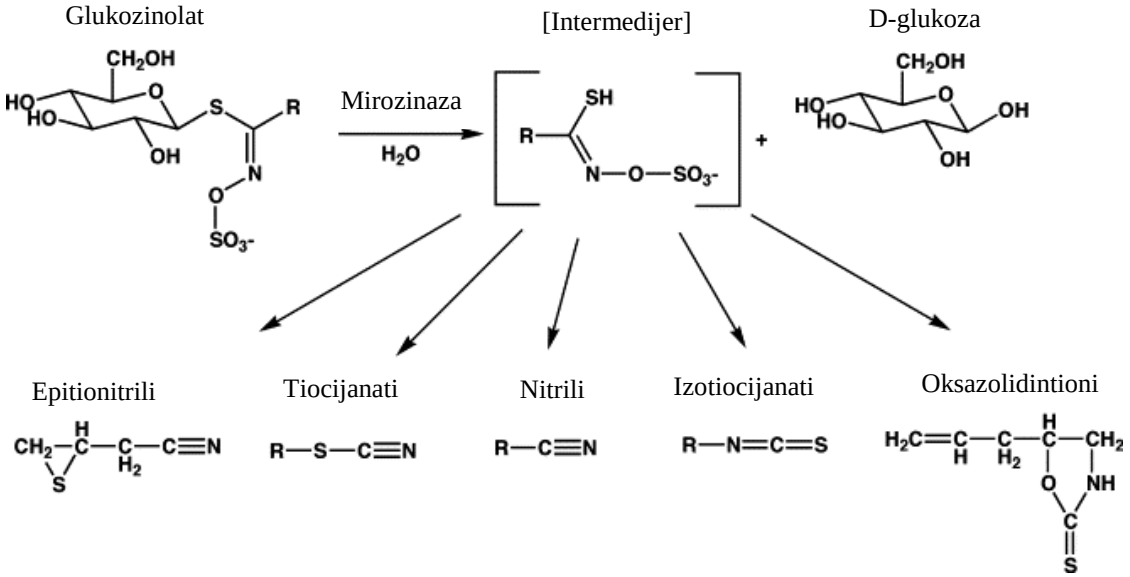
glukozinolata, fizikalno-kemijska svojstva medija poput pH vrijednosti, prisutnost Fe^{2+} iona te prisutnost ili odsustvo epitiospecifičnih proteinskih faktora. (1,2,5)

Pri pH vrijednosti 5-7 nastaju izotiocijanati, u kiselim uvjetima nitrili, a mogu nastati i tiocijanati, epitionitrili, oksazolidintioni i dr. U slučaju da je mirozinaza iz biljnih stanica inaktivirana termičkom obradom, do razgradnje može doći u debelom crijevu kao posljedica djelovanja bakterijske mirozinaze. Razgradni produkti glukozinolata su odgovorni za karakterističnu aromu povrća iz porodice Brassicaceae i njihovu potencijalnu biološku aktivnost.(1)

Biosinteza glukozinolata se većinom odvija u staničnom citosolu, a u nekim reakcijama sudjeluju i kloroplasti. Može se podijeliti na 3 osnovna koraka:

1. elongacija bočnog lanca kojom iz aminokiseline nastaje R grupa glukozinolata,
2. nastanak osnovne strukture glukozinolata adicijom glukoze i sumpora,
3. modifikacija bočnog lanca. (2)

Moguća je apsorpcija nehidroliziranih glukozinolata u želucu i tankom crijevu, a u svom izvornom obliku mogu se pronaći i u urinu.(2)



Slika 2. Opća shema razgradnje glukozinolata (6)

1.2. IZVORI GLUKOZINOLATA

Najznačajniji izvori glukozinolata u ljudskoj prehrani su biljke iz porodice Brassicaceae koju čini 330 rodova i 3700 vrsta, a rastu na umjerenim i planinskim područjima svih kontinenata, osim Antarktike. Više čimbenika utječe na udio glukozinolata u biljci, a najznačajniji su genetske varijacije, klima, opskrba vodom te primjena različitih kemijskih sredstava. Nalaze se u korijenu, sjemenkama, listovima te stabljici biljke, a najzastupljeniji su u najmlađim tkivima.(3)

Glukozinolati nisu zastupljeni isključivo u porodici Brassicaceae, ali mali broj ostalih biljaka je jestiv (npr. kapari, papaja). Te vrste sadrže karakteristične glukozinolate u velikim količinama (npr. glukokaparin u kaparima). Profil glukozinolata svake biljke je različit, a mali broj glukozinolata je prisutan u značajnoj količini. (7)

Na sadržaj glukozinolata u hrani utječe i procesiranje. Svaki proces kojim se narušava struktura stanice uzrokovat će njihovu hidrolizu. Dehidratacija povrća može dovesti do inaktivacije mirozinaze, ovisno o samoj vrsti povrća i primijenjenoj metodi. Kuhanje značajno utječe na smanjenje količine glukozinolata, uzrokuje njihovu degradaciju kao i degradaciju njihovih razgradnih produkata te inaktivaciju mirozinaze, gubitak kofaktora enzima i sl. (1)

Tablica 1. Izvori i sadržaj glukozinolata (1)

Biljka	**Sadržaj glukozinolata (mg/100g)**
Brokula (*Brassica oleracea* var.italica)	19,3-127,5
Kelj pupčar (*Brassica oleracea* var. gemmifera)	80,1-445,5
Kupus (*Brassica oleracea* var.kapitata)	42,7-108,9
Kupus, crveni	26,5-76,5
Kelj (*Brassica oleracea* var.sabauda)	59,5-209,0
Cvjetača (*Brassica oleracea* var.botrytis)	11,7-78,6
Hren (*Armoracia lapathifolia* Gilib)	106,1
Gorušica (*Brassica juncea)*	118,1-544,5

1.3. IZOTIOCIJANATI-RAZGRADNI PRODUKTI GLUKOZINOLATA

Izotiocijanati (R-N=C=S) su hlapljivi sumporovi spojevi koji nastaju hidrolizom glukozinolata pri neutralnom pH, a odgovorni su za specifičnu aromu gorušice. Mogu se pronaći u biljkama krstašicama (brokula, kupus, gorušica i dr.), a isprva je smatrano da imaju negativan učinak na zdravlje. Po kemijskom sastavu su esteri izotiocijanatne kiseline te se mogu smatrati sumpornim analozima izocijanata (R-NCO). Izomerni su s tiocijanatima (R-SCN) te izoelektrični s tioketonima ($R_2C=C=S$). Farmakološka svojstva se pripisuju elektrofilnoj prirodi ugljikovodičnog lanca koji reagira s biološkim nukleofilima i nutrijentima poput amina, aminokiselina, proteina, tiola i alkohola te daje spojeve kao što su uree i ditiokarbamati. Fiziokemijske karakteristike poput topljivosti i kiselo-baznih svojstava također imaju učinak na biološka svojstva izotiocijanata koji pokazuju antioksidativnu, antiupalnu, antimikrobnu, neurozaštitnu, kardiozaštitnu te antikancerogenu aktivnost. Također, imaju zaštitnu ulogu kod biljaka, štite ih od insekata i drugih nametnika. (8)

Bioraspoloživost nutrijenta definira se kao dio probavljenog nutrijenta koji zadovoljava funkcionalne zahtjeve u određenom tkivu. Nutrijenti postaju aktivni kada u svom aktivnom obliku dospiju do ciljanog tkiva u organizmu, u određenoj dozi. Na bioraspoloživost izotiocijanata i ostalih metabolita glukozinolata utječe više faktora:

- priroda biljnog materijala,
- koncentracija glukozinolata i njihovih razgradnih produkata u biljnom materijalu,
- koncentracija i stabilnost mirozinaze u biljnom materijalu,
- hidroliza tijekom skladištenja i procesiranja biljnog materijala,
- topljivost, stabilnost i fizikalno-kemijska svojstva pojedinog glukozinolata ili metabolita,
- probava u želucu i procesi u tankom crijevu,
- bakterijska fermentacija u crijevima.(2)

Izotiocijanati se apsorbiraju pasivnom difuzijom kroz staničnu membranu crijeva. Glavni način izlučivanja je putem merkapturne kiseline u urinu, a manje količine se izluče fecesom, izdisanjem i perspiracijom. (8) Ne talože se u mišićima, masnom tkivu, jetri i

bubrezima sisavaca, a minimalne količine se mogu pronaći u mlijeku te izazvati neugodan miris.(2)

Tablica 2. Izvori određenih izotiocijanata i njihovi prekursori (5)

Izotiocijanat	**Glukozinolat**	**Izvori**
Alil izotiocijanat (AITC)	Sinigrin	Brokula, prokulice, kupus, hren, koraba, gorušica, rotkvica
Benzil izotiocijanat (BITC)	Glukotropeolin	Kupus, kres salata, dragoljub
Feniletil izotiocijanat (PEITC)	Glukonasturtin	Ljekovita potočarka
Sulforafan	glukorafanin	Brokula, prokulice, kupus, cvjetača, kelj

1.4. GORUŠICA KAO IZVOR GLUKOZINOLATA

Gorušica je jedan od najstarijih zapisanih začina i jedna od prvih kultiviranih biljaka. Prvi zapisi datiraju oko 3000. godine pr.Kr. na sanskrtu. Najčešće se koriste 3 vrste gorušice: bijela *(Sinapis alba* L.), smeđa (*Brassica juncea* L.) i crna (*Brassica nigra* L.), dok se divlja gorušica (*Sinapis arvensis* L.) smatra korovom. (9)

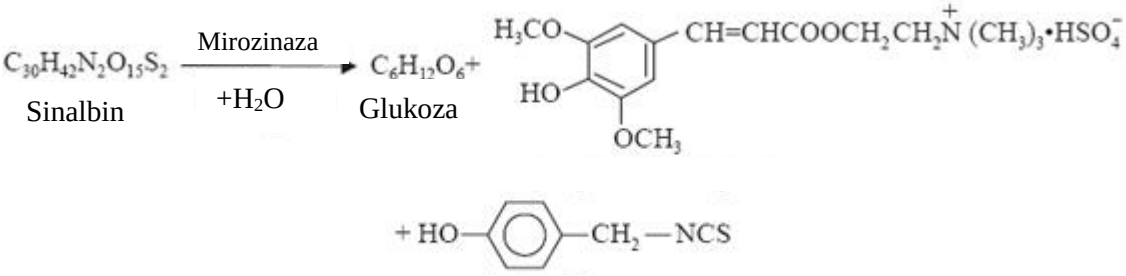
1.4.1. Bijela gorušica (*Sinapis alba* L.)

Bijela gorušica je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodica Brassicacaeae. Porijeklom je iz Sredozemlja, a danas se uzgaja širom svijeta. Vretenastog je korijena, uspravne i razgranate stabljike, visine do 60 cm te perastih i nazubljenih listova. Cvjetovi su žuti i skupljeni u grozdaste cvatove, a plodovi su komuške u kojima se nalazi 4-8 svijetložutih sjemenki. Za prehranu se koriste mladi listovi te sjemenke čije se brašno upotrebljava za izradu senfa. (10)



Slika 3. Sjeme bijele gorušice (11)

Bijela gorušica je izvor glukozinolata te njihovih razgradnih produkata. Kemijski sastav ekstrakta gorušice nije jedinstven, ovisi o više faktora poput podrijetla same biljke i metode ekstrakcije. Neki od izotiocijanata koji se mogu pronaći u bijeloj gorušicu su 4-hidroksibenzil izotiocijanat (prekursor sinalbin), alil izotiocijanat (prekursor sinigrin), 3-butenil izotiocijanat i 2-feniletil izotiocijanat.(9,12,13) Hidrolizom sinalbina nastaje 4-hidroksibenzil izotiocijanat (slika 4) koji je odgovoran za karakterističan miris i aromu proizvoda od bijele gorušice, a pokazuje i biološku aktivnost (9).



Slika 4. Razgradnja sinalbina (14)

1.4.2. Divlja gorušica (*Sinapis arvensis* L.)

Divlja ili poljska gorušica je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice Brassicaceae. Raste na području Europe te sjeverne i jugozapadne Azije. Stabljika je uspravna i razgranata, visine do 80 cm. Korijen je vretenast i tanak, a listovi dugi i hrapavi. Cvjetovi su žuti ili bijeli, dvospolni te skupljeni u grozdaste cvatove. Za prehranu se koriste mladi izdanci,

listovi i sjemenke koje se koriste kao začin ili za izradu senfa. Pčele proizvode med od nektara cvjetova divlje gorušice. Med je ugodnog okusa, žut, brzo kristalizira, a smatra se slabo kvalitetnim. (15)

Izvor je 1-butenil izotiocijanata, 3-butenil izotiocijanata, benzil izotiocijanata i drugih metabolita glukozinolata. (13)



Slika 5. Sjeme divlje gorušice (16)

1.5.ANTIKANCEROGENA AKTIVNOST GLUKOZINOLATA I IZOTIOCIJANATA

Mnoge epidemiološke studije su dokazale smanjenu pojavu karcinoma kod ljudi koji redovito konzumiraju kupusnjače. Glukozinolati i njihovi razgradni produkti se smatraju indirektnim antioksidansima jer ne blokiraju slobodne radikale direktno nego modificiraju aktivnost kancerogenih tvari utječući na aktivnost enzima metabolizma (enzimi Faze 1 i enzimi Faze 2). (1)

Enzimi Faze 1 (citokrom P450/CYP) povećavaju reaktivnost tvari topljivih u mastima čime mogu nastati molekule toksičnije od polaznih. Reakcijama oksidacije i redukcije te hidrolizom od prokancerogenih tvari nastaju vrlo reaktivni intermedijeri sa sposobnošću oštećenja DNK, RNK i proteina.(1) Inhibicija specifičnih CYP enzima će spriječiti te reakcije, odnosno imat će antikancerogeni učinak. (5)

Enzimi Faze 2 konvertiraju kancerogene tvari u lako izlučive nereaktivne oblike topljive u vodi reakcijama konjugacije s ligandima (glutation, glukuronska kiselina i dr.),

pripajanja sulfatnih skupina, acetiliranja i metiliranja. Geni za enzime Faze 1 sadrže elemente antioksidacijskog odgovora, specifične sekvence DNK. Izotiocijanati i ostali produkti razgradnje glukozinolata povećavaju transkripciju tih gena te na taj način povećavaju aktivnost enzima Faze 2. Indukcijom enzima Faze 2 povećava se detoksifikacija elektrofila i zaštita od oksidativnog stresa zbog reaktivnosti središnjeg ugljikova atoma. Izotiocijanati su snažni elektrofili te brzo reagiraju s nukleofilima na bazi sumpora, dušika i kisika. Modulacija aktivnosti enzima Faze 1 i Faze 2 su najviše proučavani mehanizmi antikancerogenog djelovanja glukozinolata i njihovih razgradnih produkata. (1)

Apoptoza ili programirana stanična smrt je mehanizam pomoću kojeg organizam uklanja oštećene i nefunkcionalne stanice bez narušavanja integriteta i strukture okolnog tkiva. (17) Izotiocijanati moduliraju ekspresiju regulatora staničnog ciklusa te izazivaju apoptozu kod određenih staničnih linija raka. U slučaju oštećenja DNK stanični ciklus se zaustavlja kako bi došlo do njenog popravka, odnosno apoptoze u slučaju kad popravak nije moguć. Induciranje programirane stanične smrti može spriječiti nastanak mutacija koje pridonose razvoju karcinoma. (5) Tijekom apoptoze stanica prolazi kroz 3 morfološke promjene: kondenzacija heterokromatina, promjene u staničnoj membrani i promjene u orijentaciji intracelularnih organela, koje su ujedno i markeri za identifikaciju stanica u apoptozi. Metaboliti glukozinolata, posebno izotiocijanati, induciraju apoptozu stanica najčešćih karcinoma, poput karcinoma pluća, dojke i prostate. Apoptoza ima važnu ulogu kod liječenja raka.(17)

Izotiocijanati poput alil izotiocijanata, benzil izotiocijanata i sulforafana imaju i antiproliferativna svojstva. Rast broja stanica raka se inhibira djelovanjem na proteine odgovorne za napredovanje staničnog ciklusa i ekspresiju inhibitora ciklin-ovisnih kinaza (CDK). Izotiocijanati inhibiraju diobu stanica u točkama prijelaza između G1 i S te G2 i M faza staničnog ciklusa, ovisno o vrsti izotiocijanata i stanica karcinoma. (17)

Izotiocijanati imaju utjecaj i na epigenetsku regulaciju ekspresije gena. N-terminalni rep histona u stanici je podložan raznim reakcijama poput metilacije i acetilacije. Acetilacija lizina na histonu aktivira transkripciju tumor supresorskih gena, dok je deacetilacija uzrokovana enzimom histon deacetilazom (HDAC) suprimira. Izotiocijanati inhibiraju aktivnost histon deacetilaze te na taj način omogućuju nastavak transkripcije.(5)

1.6. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA-MODERNA TEHNIKA EKSTRAKCIJE

Posljednjih godina raste interes za istraživanje primjene mikrovalova prilikom ekstrakcije tvari iz biljnih materijala zbog brojnih prednosti u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije. Konvencionalne metode se temelje na pravilnom odabiru otapala i primjeni topline kako bi se povećala topljivost određene tvari te poboljšao transport masa. Trajanje ekstrakcije je dulje čime se vjerojatnost termalne degradacije osjetljivih spojeva povećava.(18)

Mikrovalovi su ne-ionizirajući elektromagnetski valovi frekvencije između 300 MHz i 300 GHz. Polarna otapala apsorbiraju mikrovalove koji uzrokuju vibracije molekula što za posljedicu ima oslobađanje termalne energije. Zagrijava se materijal smješten u komoru, no ne i sama komora, pa je vrijeme ekstrakcije kraće, a utrošak električne energije manji. Mikrovalovi uzrokuju naglo zagrijavanje i isparavanje vode u stanicama biljnog materijala. Tlak u stanicama raste uslijed čega dolazi do prsnuća stanice i oslobađanja kemijskih spojeva u otapalo. Promatranjem uzorka pod skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) prije i nakon ekstrakcije mogu se vidjeti rupture stanice, dok kod nekih drugih metoda gotovo da i ne postoji ta razlika. Efekt mikrovalne energije uvelike ovisi o dielektričnoj osjetljivosti korištenog otapala kao i biljnog matriksa. Visoka energija može imati pozitivan ili negativan učinak na ekstrakciju. Povećava penetraciju otapala u matriks i oslobađanje konstituenata, ali može uzrokovati degradaciju termolabilnih komponenti. Kako bi se vjerojatnost termičkog oštećenja smanjila, uzorak se prije mikrovalne ekstrakcije macerira u otapalu.(18)

Kod mikrovalne ekstrakcije vrlo je važan pravilan odabir otapala koji ovisi o topljivosti ciljanog analita, interakciji s biljnim matriksom te sposobnosti apsorbiranja mikrovalova, a poželjna je i visoka selektivnost otapala.(18)

Prednosti mikrovalne ekstrakcije u odnosu na konvencionalne metode su:

- značajno smanjenje potrebnog vremena,
- smanjena upotreba otapala,
- veći prinos zbog narušavanja integriteta stanice,
- automatizacija poboljšava točnost i preciznost,

- prikladna je za ekstrakciju termolabilnih spojeva,
- moguća je ekstrakcija tvari u tragovima (teški metali, pesticidi),
- omogućuje agitaciju tijekom ekstrakcije što poboljšava transport mase,
- moguće je kombiniranje s drugim tehnikama ekstrakcije u cilju poboljšavanja procesa (Soxwave). (18)

1.7. PLINSKA KROMATOGRAFIJA SA SPEKTROMETRIJOM MASA

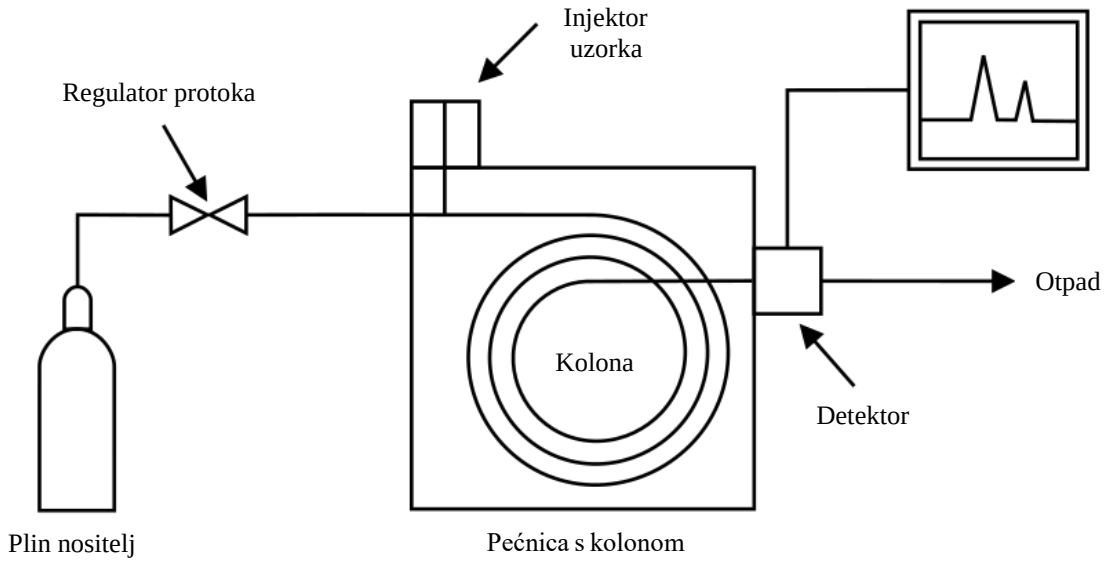
Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS) je analitička metoda koja razdvaja pojedine komponente uzorka, kvantificira te identificira svaku komponentu. (19)

Nakon ubrizgavanja u kromatograf uzorak se prevodi u plinovito stanje te u struji mobilne faze (inertni plin) putuje do stacionarne faze s kojom dolazi u interakciju. Komponente se različitom brzinom vežu sa stacionarnom fazom, tj. one koje se vežu najbrže prve i izlaze iz kolone. Na trajanje procesa utjecaj imaju vrsta stacionarne faze i temperatura. Odijeljene komponente nakon izlaska iz kolone dolaze do detektora koji proizvodi električni signal određene jačine, ovisno o koncentraciji. Signal se obrađuje grafički pomoću računalnog programa čime se dobiju podaci o retencijskom vremenu (vrijeme od ubrizgavanja uzorka do detekcije) i intenzitetu, odnosno koncentraciji pojedine komponente. U slučaju da su uvjeti u kromatografu isti, kemijski spojevi iz uzorka će uvijek iz kolone izlaziti u istom retencijskom vremenu. Ako je retencijsko vrijeme određenog spoja poznato, iz grafa se može pretpostaviti njegov identitet. Za ubrizgavanje uzorka u kromatograf koristi se mikrošprica, a potrebna je iznimno mala količina uzorka.(19)

Nakon izlaska iz kolone plinskog kromatografa dolazi do ionizacije odvojenih spojeva u masenom spektrometru. Molekule se bombardiraju visokoenergetskim zrakama elektrona (70 eV) koje mogu izbiti elektrone iz same molekule. Molekule plinova se mogu raspasti na manje fragmente ili nastaviti postojati u obliku molekulskih iona. Računalo crta graf (maseni spektar) na čijoj x-osi se nalazi m/z omjer, a na y-osi intenzitet signala. M/z predstavlja omjer mase i naboja pojedinog fragmenta ili molekularnog iona, a kako je naboj iona nakon ionizacije +1, m/z predstavlja njihovu molekulsku masu. Svaki spoj ima svoj karakterističan maseni spektar koji se uspoređuje sa spektrima iz znanstvenih baza. Nakon

uspoređivanja računalni program izbacuje listu mogućih spojeva kao i postotak podudaranja.(19)

GC-MS je vrlo pouzdana analitička metoda zbog čega je i često primjenjivana, ali ima i svoje nedostatke. Priprema uzorka za analizu je složenija, u uređaju se razvijaju visoke temperature koje onemogućuju ispitivanje termolabilnih spojeva, a analiza nehlapljivih spojeva nije moguća.(19)



Slika 6. Shema GC-MS uređaja (20)

1.8. *IN VITRO* ISTRAŽIVANJA ANTIKANCEROGENE AKTIVNOSTI

In vitro (lat. u staklu) i *in vivo* (lat. unutar živog) modeli su iznimno važne metode u istraživanju karcinoma. Omogućuju identifikaciju karcinogenih tvari, razvoj terapija, testiranje lijekova te daju uvid u molekularne mehanizme rasta tumora i metastaziranje. (21)

In vitro modeli tumora mogu biti različite kompleksnosti, od staničnih linija karcinoma do 3D modela tumorskog mikrookoliša. Pružaju uvid u rast tumora/proliferaciju, migraciju, invaziju, angiogenezu, utjecaj lijekova i druge čimbenike. Ključna komponenta bilo kojeg *in vitro* modela je izvor stanica, a važni su još i ekstracelularni matriks te biofizička i biokemijska svojstva. Stanične linije se lako uzgajaju i omogućuju izravnu

usporedbu eksperimentalnih rezultata. Postoje razni *in vitro* modeli, svaki sa svojim prednostima i nedostacima, a odabir pravog modela najviše ovisi o cilju samog istraživanja. Napredci u staničnoj biologiji tumora, 3D staničnim kulturama, inženjeringu tkiva, biomaterijalima i drugim tehnologijama su omogućili razvoj novih *in vitro* modela koje karakterizira veća kompleksnost, primjerice inkorporacija više staničnih linija (kokulture). *In vitro* modeli omogućuju kontroliranje većine eksperimentalnih varijabli te kvantitativnu analizu podataka.(21)

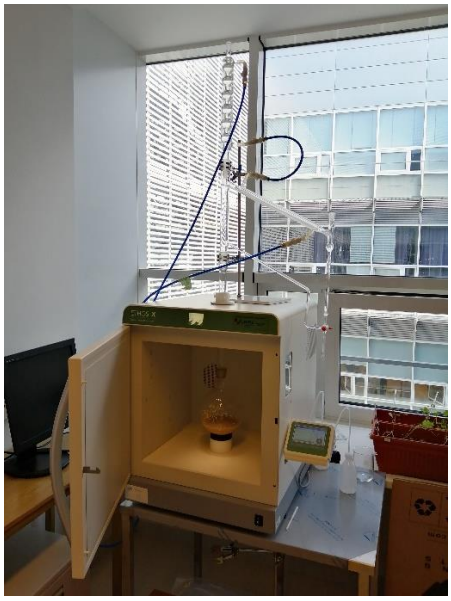
In vivo tumorski modeli najčešće podrazumijevaju korištenje laboratorijskih miševa. Tumori mogu biti okolišno inducirani ili transplantirani s čovjeka na imunokompromitirane ili genetski modificirane miševe. Bilježe kompleksnost procesa metastaze u živom sustavu, ali je vizualizacija pojedinih koraka teška, kao i kvantitativna analiza podataka.(21)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

Sustav za mikrovalnu ekstrakciju korišten je za dobivanje eteričnog ulja (slika 7) i ekstrakta, a uzorke je prije samog postupka potrebno pripremiti. Ugrubo odvagani uzorci sjemenki bijele i divlje gorušice se usitne u tarioniku, izvažu na analitičkoj vagi i prenesu u reaktor zajedno s manjom količinom destilirane vode. Dodavanjem vode započinje hidroliza glukozinolata, a i smanjuje se vjerojatnost gorenja uzorka. Nakon određenog vremena tikvica s uzorkom se smješta u mikrovalnu pećnicu i sastavlja se aparatura. Aparatura se sastoji od reaktora, staklene cijevi, hladila kojeg sustav za hlađenje opskrbljuje vodom temperature 13 ºC i nastavka za ekstrakciju eteričnog ulja. Jačina mikrovalne pećnice se postavlja na 500 W, a trajanje ekstrakcije na 30 minuta, s 5 minuta hlađenja. Eterično ulje se oslobađa iz stanica te u struji vodene pare dolazi do postrane cijevi ispunjene destiliranom vodom. Eterično ulje ostaje u cijevi, a višak vode se pomoću dodatne cijevi vraća u reaktor. Zbog malog prinosa u postranu cijev se dodaje pentan kako bi granica između faza bila vidljivija, a odjeljivanje jednostavnije. Nakon sušenja s bezvodnim natrijevim sulfatom, izolat se dekantira u odvagane viale koje se pohranjuju u zamrzivač na -18 ºC.

Za dobivanje mikrovalnog ekstrakta primjenjuje se gravitacijska sila. Aparatura (slika 8) je različita od one za destilaciju, a sastoji se od reaktora s otvorom na dnu, staklene cijevi i hladila. Nakon pripreme uzorka koja je ista kao i kod destilacije, on se premješta u reaktor koji se potom zatvara, a spoj se maže silikonskom mašću. Mikrovalna pećnica se postavlja na program „flavour“, snaga na 500 W, a vrijeme na 15 minuta, s 5 minuta hlađenja. Izolat se zajedno s vodom skuplja u čašu na dnu aparature, nakon čega je potrebno izvršiti filtraciju. Organski spojevi se iz vodene faze ekstrahiraju diklormetanom, a zaostala voda se uklanja bezvodnim natrijevim sulfatom. Dobiveni uzorak se skladišti u odvaganim vialama, u zamrzivaču na -18 ºC



Slika 7. Mikrovalna destilacija



Slika 8. Mikrovalna ektrakcija

Udio ekstrakta u sjemenkama računa se po formuli:

$$Indeks\ (\%) = \frac{masa\ ekstrakta\ (g)}{masa\ sjemenki\ (g)} \times 100$$

2.2. PRIPREMA UZORAKA

Izolate je nakon odmrzavanja potrebno koncentrirati. Koncentriranje se vrši uparavanjem u struji dušika (slika 9), pri relativno niskoj temperaturi kako bi se spriječila termalna degradacija bioaktivnih spojeva. Nakon uparavanja određuje se masa uzoraka vaganjem na analitičkoj vagi i oduzimanjem mase praznih viala. Potrebno je ostaviti najmanje 1 µl uzorka za GC-MS analizu.

Za test citotoksične aktivnosti koriste se otopine ekstrakata u koncentracijama od 1µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml i 100 µg/ml. Stock otopina se priprema s otopinom dimetil sulfoksida (DMSO), a za razrjeđenje se koristi Dulbecco's Modified Eagle medij (DMEM).



Slika 9. Uparavanje u struji dušika

2.3. GC-MS ANALIZA

Za identifikaciju metabolita glukozinolata korišten je GC-MS uređaj proizvođača Varian Inc. U uređaj je injektiran uzorak volumena 1µl, temperatura u injektoru je 250 ºC, a plin nositelj je helij, protoka 1 ml min^{-1}. Pri analizi je korištena nepolarna kolona VF-5MS, a debljina sloja stacionarne faze je 0,25 µm. Kolona je zagrijavana 3 min na 60 ºC, zatim je brzinom od 3ºC min^{-1} zagrijana do temperature 246 ºC, koja je zadržana sljedećih 25 min.

Za ionizaciju u spektrometru masa korišten je izvor iona jakosti 70 eV i temperature 200 ºC. Područje skeniranja obuhvaća spojeve mase 40-350 masenih jedinica.



Slika 10. GC-MS analiza

2.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Ispitivanje antiproliferativnog učinaka mikrovalnih ekstrakata bijele i divlje gorušice vršeno je na humanim karcinomskim stanicama dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (TCCSUP).

Tablica 3. Svojstva stanične linije MDA-MB-231 (22)

Organizam	Homo sapiens, čovjek
Tkivo	Dojka
Format proizvoda	Smrznuto
Morfologija	Epitelna
Obilježja kulture	Adherentna
Bolest	Adenokarcinom
Spol	Ženski
Dob	51 godina
Uvjeti pohrane	Tekući dušik

Tablica 4. Svojstva stanične linije TCCSUP (23)

Organizam	Homo sapiens, čovjek
Tkivo	Mokraćni mjehur
Format proizvoda	Smrznuto
Morfologija	Epitelna
Obilježja kulture	Adherentna
Bolest	Karcinom prijelaznih stanica IV. razreda
Spol	Ženski
Dob	67 godina
Uvjeti pohrane	Tekući dušik

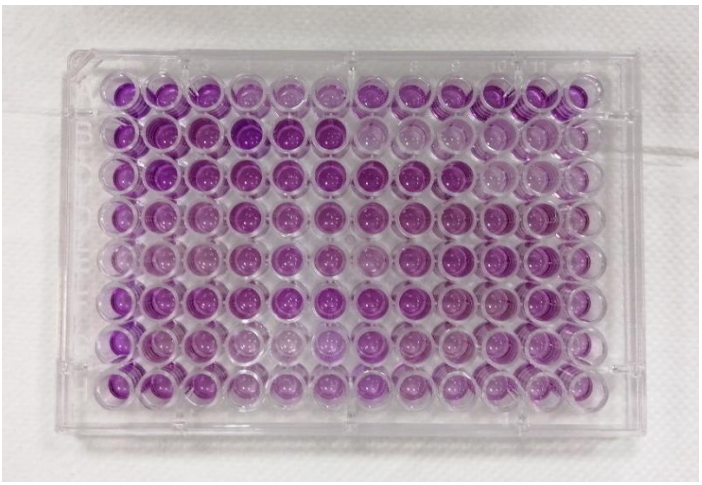
Stanične linije se uzgajaju u DMEM mediju , u vlažnom inkubatoru na temperaturi od 37 ºC u atmosferi s 5% CO_2. DMEM medij sadrži goveđi serum (FBS), hranjive tvari, antibiotike i Red fenol indikator koji mijenja boju iz crvene u žutu kada je medij potrebno promijeniti.

Adherirane stanice se od podloge odvajaju tretiranjem tripsinom, enzimom koji cijepa peptidne veze te tako omogućuje presađivanje stanica. Stanice se presađuju u jažice, a svaka jažica mora sadržavati jednak broj stanica. Prije presađivanja potrebno je prebrojiti stanice. 10 µl stanica se pomiješa s 90 µl Trypan Blue boje koja oboji samo mrtve stanice te tako omogućuje brojanje živih, neobojenih stanica.

Stanice karcinoma se tretiraju prethodno pripremljenim otopinama mikrovalnih ekstrakata i eteričnih ulja sjemenki bijele i divlje gorušice tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Otopine se nanose u trostrukom replikatu, a kontrolne jažice s medijem služe za kasniju usporedbu.

Proliferacija i živost stanica je određena korištenjem MTT metode. MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) je prah žute boje, a korištena je njegova otopina u fosfatnom puferu (PBS). MTT vežu samo metabolički aktivne stanice koje ga reduciraju u ljubičasto obojeni formazan. Nastali formazan se može odrediti spektrofotometrijski, očitavanjem apsorbancije na 570 nm.

MTT se dodaje u prethodno odsisane jažice (nakon 4, 24, 48 ili 72 sata inkubacije) te se nakon 1 sata odsiše. Prije očitavanja apsorbancije formazan je potrebno otopiti u otopini DMSO-a. Apsorbancija se mjeri nakon 10 minuta inkubacije na 37 ºC uz treskanje.



Slika 11. Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO-a

Omjer apsorbancije tretiranih stanica i onih iz kontrolnih jažica je pokazatelj citotoksične aktivnosti izotiocijanata iz mikrovalnih ekstrakata i eteričnih ulja sjemenki bijele i divlje gorušice.

Stupanj proliferacije se računa prema formuli:

$$proliferacija\ (\%) = \frac{apsorbancija\ uzorka}{apsorbancija\ kontrolne\ jažice} \times 100.$$

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

Udio dobivenih ekstrakata i eteričnih ulja iz sjemenki divlje i bijele gorušice prikazan je u tablici 5. Prinosi su iznimno maleni i kreću se rasponu od 9,6 do 104 ppm-a (eng. Parts per million).

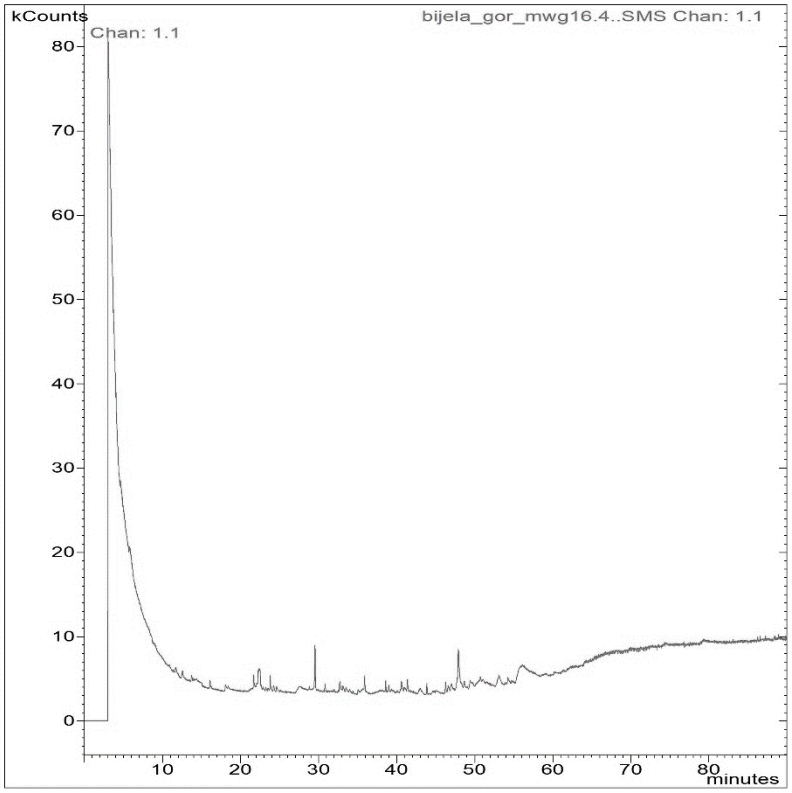
Tablica 5. Udio ekstrakta i eteričnog ulja u sjemenkama gorušice

Uzorak	**Masa sjemenki (g)**	**Masa ekstrakta (mg)**	**Indeks (%)**
Eterično ulje bijele gorušice	40,53	0,78	0,0019245
ME bijele gorušice	53,94	5,61	0,0104004
Eterično ulje divlje gorušice	51,87	0,50	0,0009639
ME divlje gorušice	51,35	0,97	0,0018890

3.2. GC-MS ANALIZA

Kemijski sastav ekstrakata određen je korištenjem GC-MS-a. Na slikama su prikazani kromatogrami pojedinih uzoraka. Samo je GC-MS analiza eteričnog ulja divlje gorušice bila uspješna, a identificirani spojevi su prikazani u tablici.

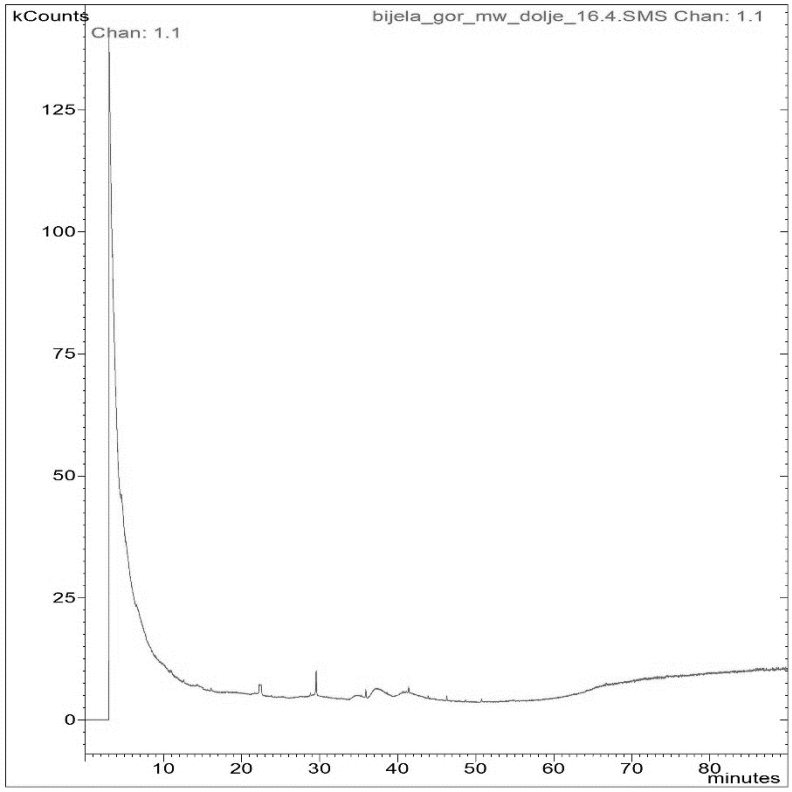
3.2.1. Eterično ulje bijele gorušice (*Sinapis alba* L.)



Slika 12. Kromatogram eteričnog ulja bijele gorušice

U uzorku eteričnog ulja bijele gorušice nisu detektirani razgradni produkti glukozinolata, što ne znači da nisu i prisutni. Iz literature (9) je poznato da bijela gorušica sadrži glukozinolat sinalbin, ali je njegov metabolit 4-hidroksibenzil izotiocijanat nestabilan pa je detekcija otežana.

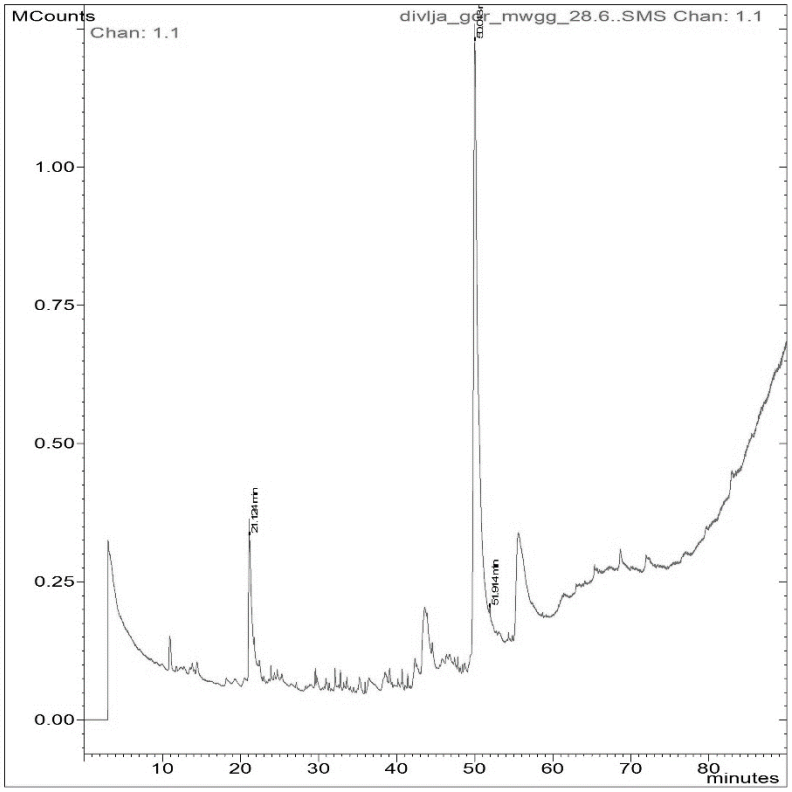
3.2.2. Mikrovalni ekstrakt bijele gorušice (*Sinapis alba* L.)



Slika 13. Kromatogram mikrovalnog ekstrakta bijele gorušice

Kao i kod eteričnog ulja, ni u mikrovalnom ekstraktu bijele gorušice nisu detektirani razgradni produkti glukozinolata.

3.2.3. Eterično ulje divlje gorušice (*Sinapis arvensis* L.)



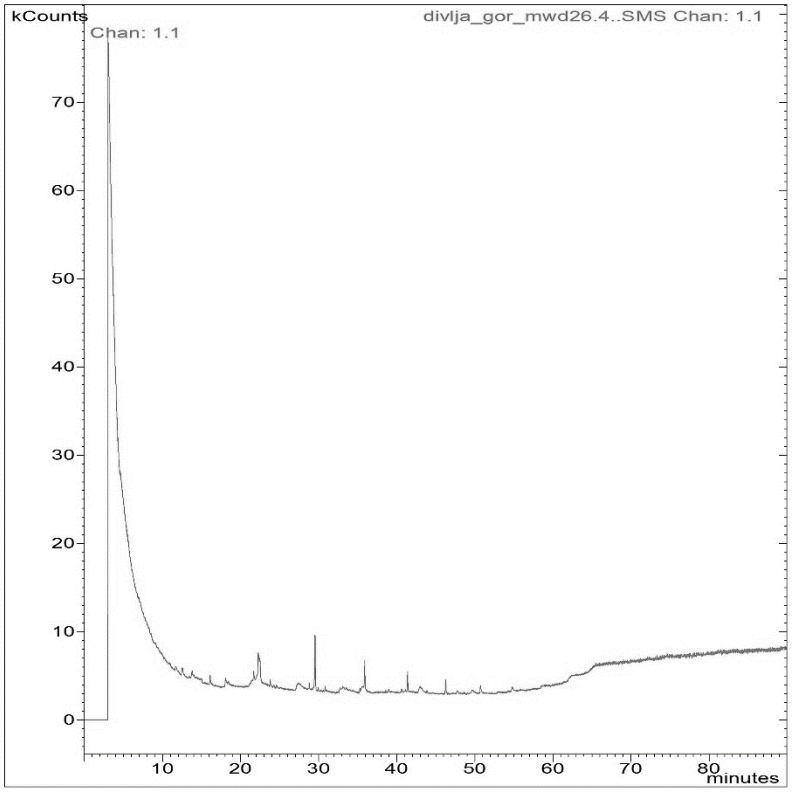
Slika 14. Kromatogram eteričnog ulja divlje gorušice

U uzorku eteričnog ulja divlje gorušice nisu pronađeni razgradni produkti glukozinolata, ali je iz literature poznato da ih divlja gorušica sadrži (13). Pronađeni spojevi su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. GC-MS analiza eteričnog ulja divlje gorušice

Spoj	**Retencijsko vrijeme (min)**	**Koncentracija (%)**
Limonen	10,923	1,58
Karvon	21,124	7,50
Tetradekanska kiselina	43,593	6,79
Heksadekanska kiselina	50,030	52,64

3.2.4. Mikrovalni ekstrakt divlje gorušice (*Sinapis arvensis* L.)



Slika 15 Kromatogram mikrovalnog ekstrakta divlje gorušice

U uzorku mikrovalnog ekstrakta divlje gorušice nisu detektirani razgradni produkti glukozinolata.

3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Eterično ulja bijele gorušice nije imalo značajni citotoksičan učinak ni na jednu staničnu liniju, a u određenim slučajevima je došlo i do porasta broja stanica karcinoma. (slike 16 i 20)

Mikrovalni ekstrakt bijele gorušice pokazuje određeni citotoksičan učinak na obje stanične linije, pri svim uvjetima. (slike 17 i 21) Najveći učinak ima na MBA-MB-231 staničnu liniju pri koncentraciji od 100 μg/ml nakon 48 sati inkubacije (45 %-tna inhibicija).(slika 17) Obzirom da GC-MS analizom nisu detektirani metaboliti glukozinolata, a uzorak pokazuje nezanemarivu antiproliferativnu aktivnost može se pretpostaviti da su u uzorku prisutni još neki bioaktivni spojevi koji ne spadaju u skupinu glukozinolata tj. njihovih razgradnih produkata

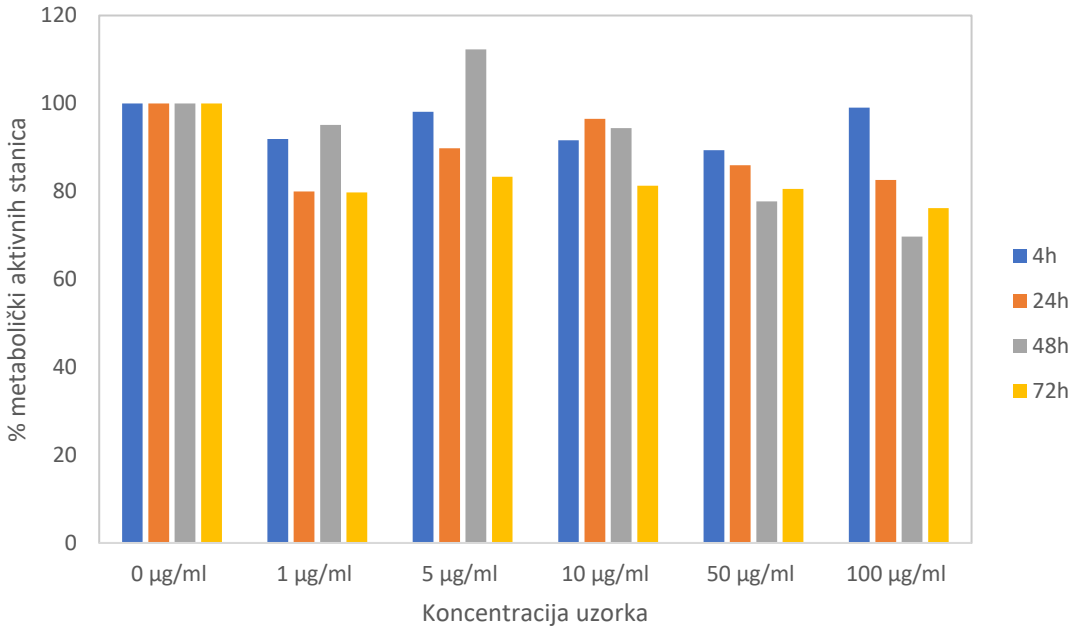
Eterično ulje divlje gorušice ima blago citotoksično djelovanje na obje stanične linije. (slike 18 i 22) U uzorku su detektirani terpeni limonen i karvon te tetradekanska i heksadekanska kiselina.

Mikrovalni ekstrakt divlje gorušice se pokazao kao iznimno jako citotoksično sredstvo, a njegov učinak je proporcionalan koncentraciji uzorka. (slike 19 i 23) Najbolji rezultati su ostvareni na MBA-MB-231 staničnu liniju pri koncentraciji od 100 μg/ml nakon 72 sata inkubacije (čak 90 %-tna inhibicija). (slika 19) GC-MS analizom nisu detektirani razgradni produkti glukozinolata, ali u uzorku očigledno postoje drugi kemijski spojevi s jakim citotoksičnim djelovanjem.

Iz rezultata je vidljivo da citotoksičan učinak ovisi i o samoj staničnoj liniji karcinoma, što je razumljivo jer se stanice morfološki razlikuju, stupanj proliferacije im je drugačiji, način adheracije na podlogu i sl. Mikrovalni ekstrakti i eterična ulja bijele i divlje gorušice imali su veći učinak na staničnu liniju karcinoma dojke nego na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura. Potencijal mikrovalnog ekstrakta divlje gorušice trebalo bi dodatno istražiti *in vivo* studijama budući da pokazuje jak potencijal kao terapeutik.

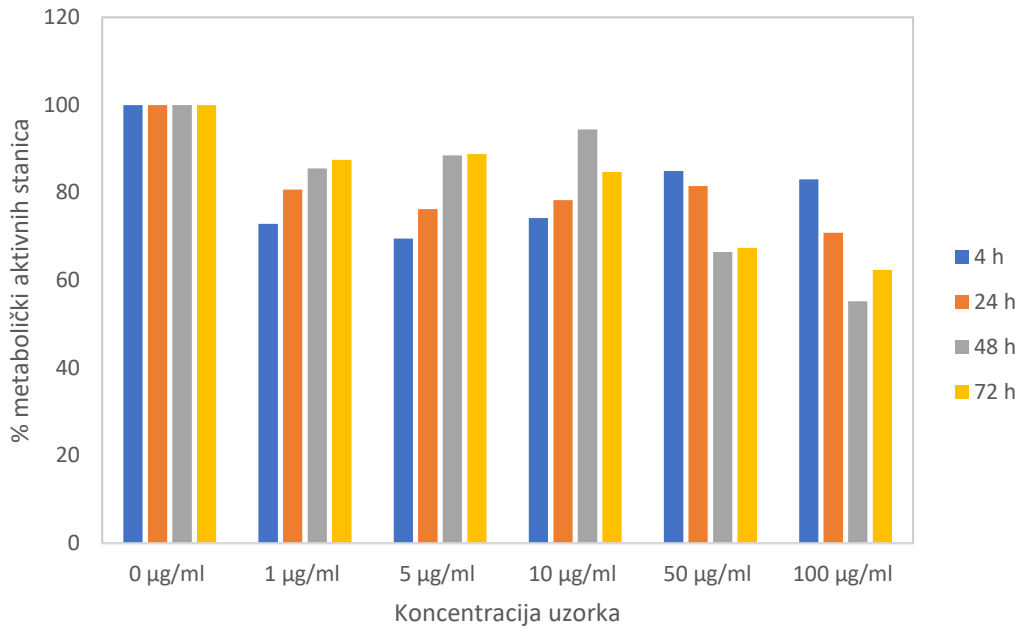
Rezultati testa citotoksične aktivnosti prikazani su grafički, u obliku stupčastih grafova.

3.3.1. Karcinom dojke-stanična linija MBA-MB-231



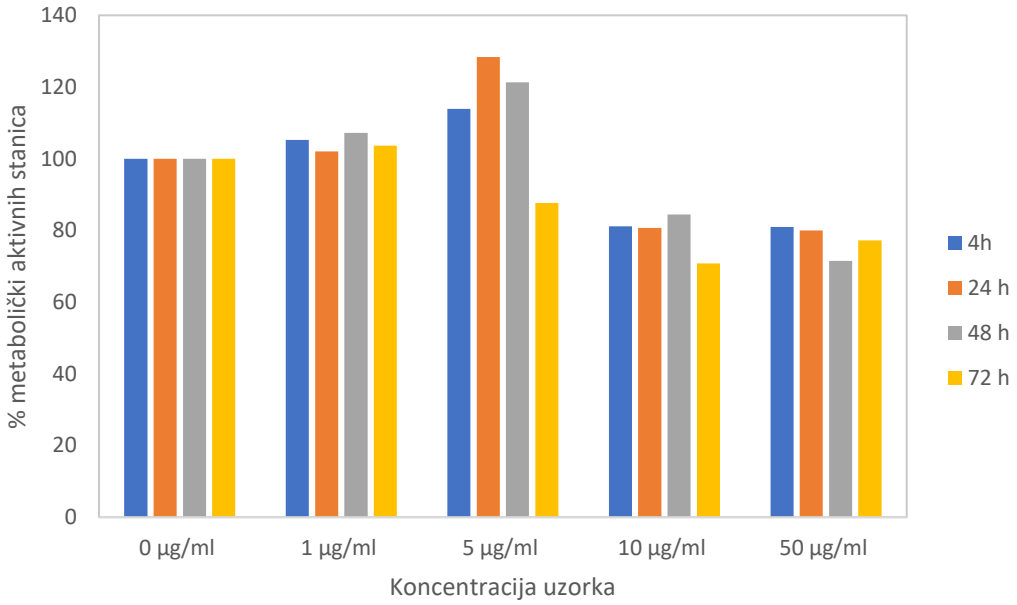
Slika 16. Citotoksični učinak eteričnog ulja bijele gorušice na staničnu liniju MBA-MB-231

Citotoksičan učinak je vidljiv pri svim koncentracijama, ali je pri koncentraciji od 5 µg/ml nakon 48 sati inkubacije vidljiv i rast stanica karcinoma. Najbolji učinak pokazuje najveća koncentracija nakon 48 sati (30 %-tna inhibicija).



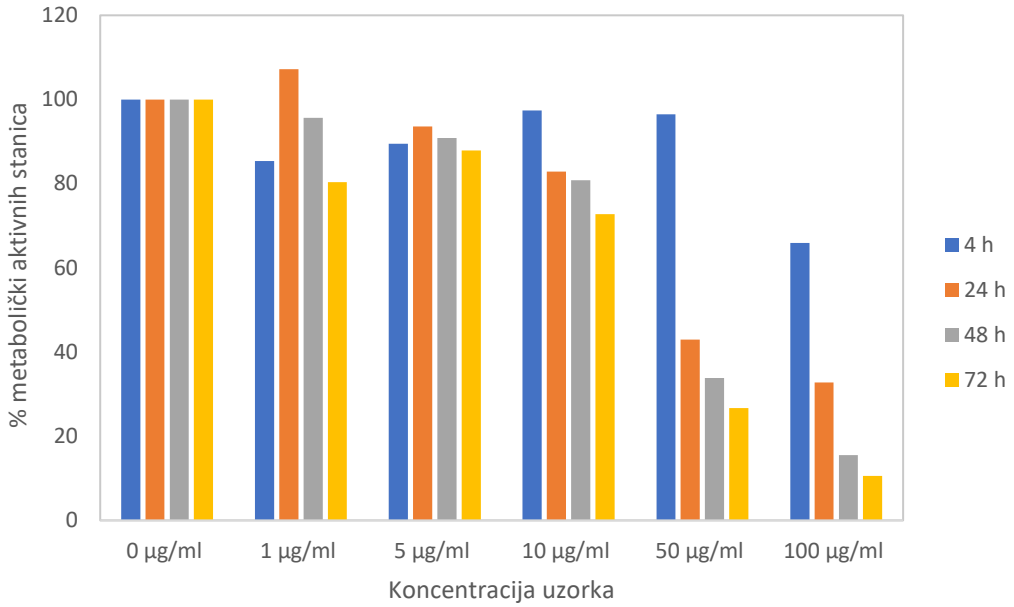
Slika 17. Citotoksični učinak mikrovalnog ekstrakta bijele gorušice na staničnu liniju MBA-MB-231

Citotoksični učinak se ostvaruje pri svim koncentracijama. Za uzorke koncentracije 1 µg/ml, 5 µg/ml i 10 µg/ml učinak je najbolji nakon 4 sata inkubacije, nakon čega dolazi do oporavka stanica. Za uzorke koncentracije 50 µg/ml i 100 µg/ml najbolji je nakon 48 sati inkubacije, a najveći učinak (45 %-tna inhibicija) se ostvaruje pri koncentraciji 100 µg/ml nakon 48 sati.



Slika 18. Citotoksični učinak eteričnog ulja divlje gorušice na staničnu liniju MBA-MB-231

Uzorak koncentracije 1 µg/ml ne pokazuje citotoksičan učinak dok onaj od 5 µg/ml pokazuje citotoksično djelovanje tek nakon 72 sata. Uzorak koncentracije 10 µg/ml je najdjelotvorniji nakon 72 sata, a koncentracije 50 µg/ml nakon 48 sati. Zbog malog prinosa nije bilo moguće pripremiti otopinu koncentracije 100 µg/ml, a najbolji učinak ostvaruje uzorak koncentracije 10 µg/ml nakon 72 sata inkubacije (30 %-tna inhibicija).

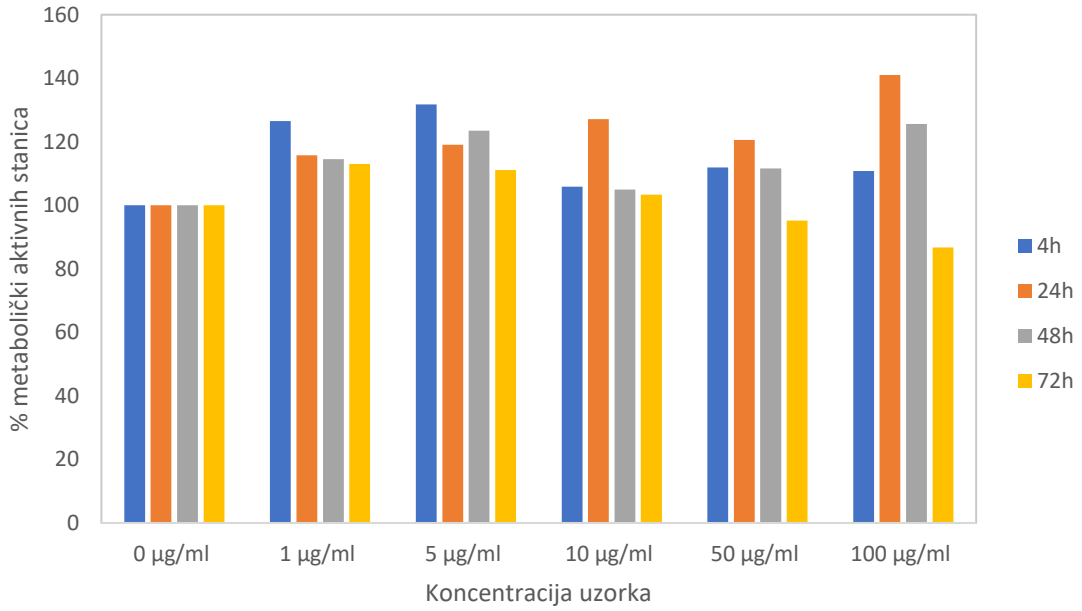


Slika 19. Citotoksični učinak mikrovalnog ekstrakta divlje gorušice na staničnu liniju MBA-MB-231

Citotoksični učinak se ne ostvaruje samo pri koncentraciji 1 µg/ml nakon 24 sata inkubacije. Pri koncentracijama 10 µg/ml, 50 µg/ml i 100 µg/ml učinak se povećava s vremenom, a najbolje rezultate daje koncentracija od 100 µg/ml nakon 72 sata inkubacije (90 %-tna inhibicija).

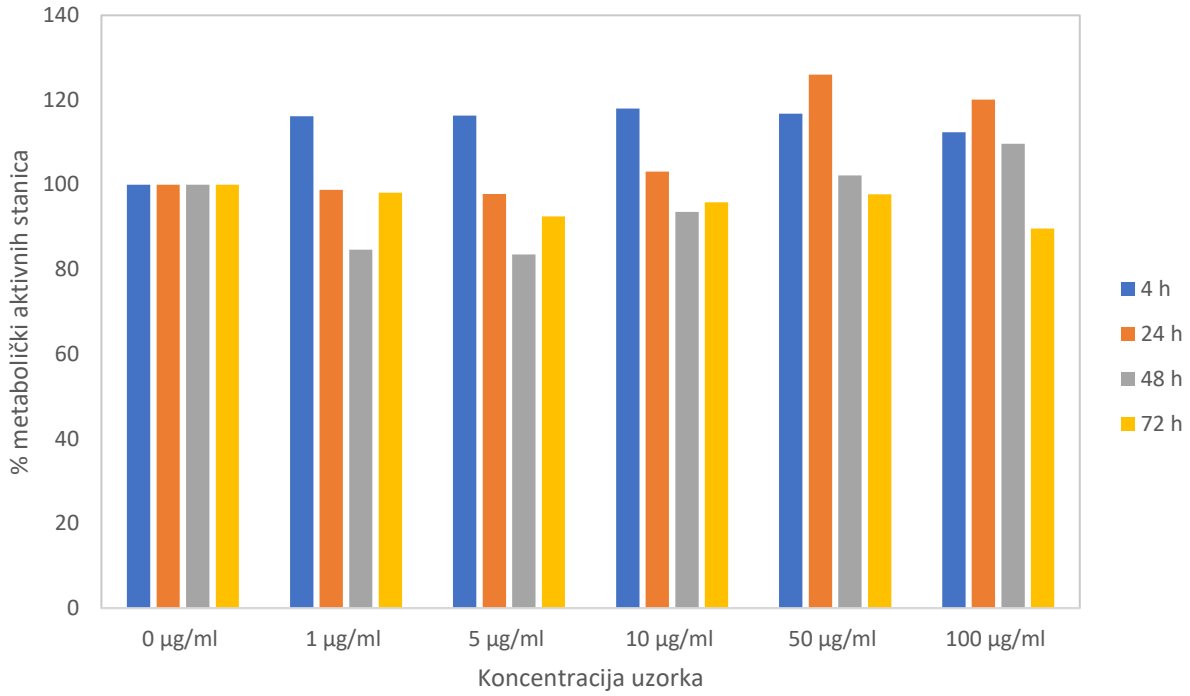
Također, mikrovalni ekstrakt divlje gorušice pokazuje najveće citotoksično djelovanje na MBA-MB-231 staničnu liniju od sve 4 vrste ekstrakata.

3.3.2. Karcinom mokraćnog mjehura-stanična linija TCCSUP



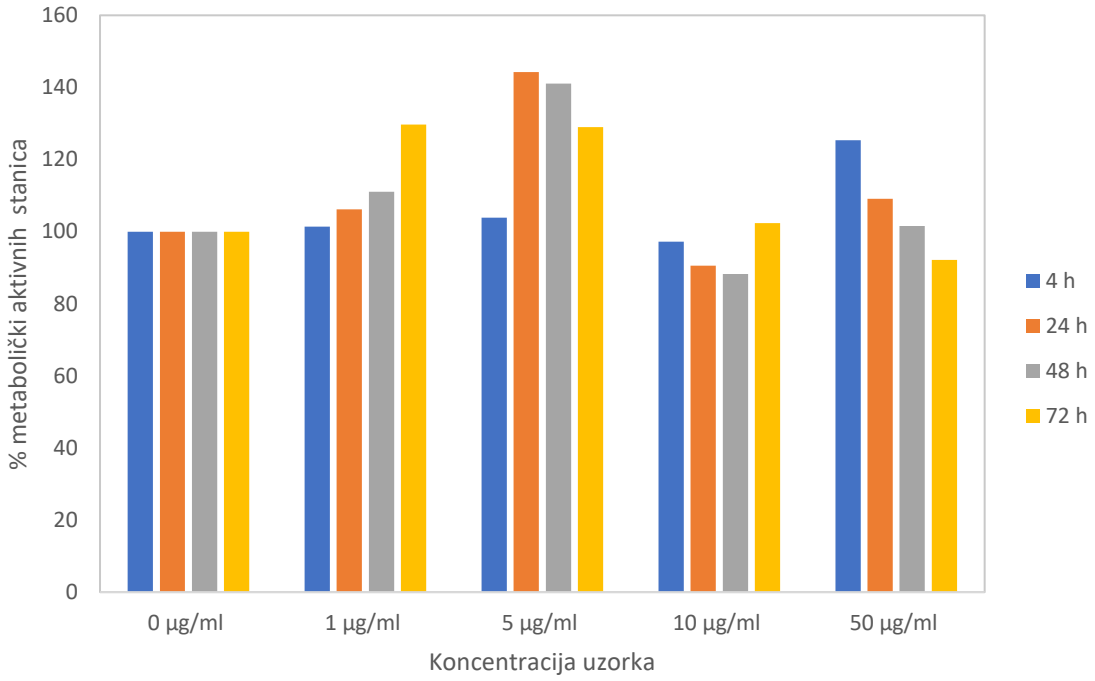
Slika 20. Citotoksični učinak eteričnog ulja bijele gorušice na staničnu liniju TCCSUP

Blago citotoksičan učinak pokazuju samo uzorci koncentracije 50 µg/ml i 100 µg/ml nakon 72 sata inkubacije. Svi ostali uzorci imaju pozitivan učinak na rast kancerogenih stanica.



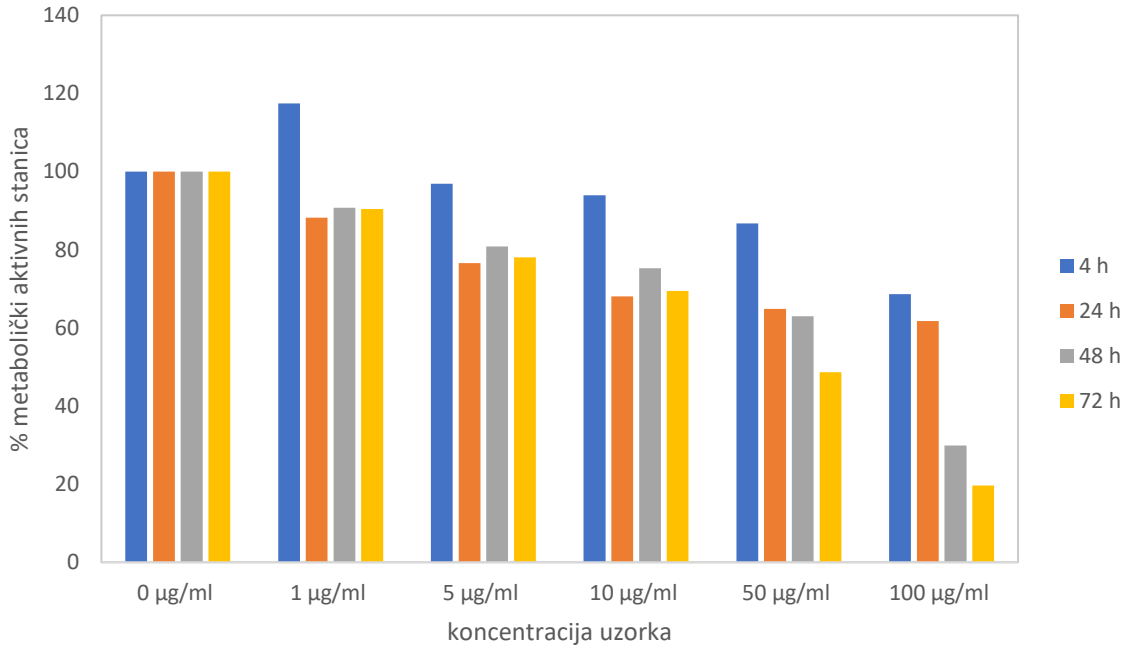
Slika 21. Citotoksični učinak mikrovalnog ekstrakta bijele gorušice na staničnu liniju TCCSUP

Uzorci pokazuju proliferativno ili blago citotoksično djelovanje, ovisno o koncentraciji i vremenu inkubacije. Niže koncentracije imaju bolji učinak, a najbolji je pri koncentraciji od 5 µg/ml, nakon 48 sati (17 %-tna inhibicija).



Slika 22. Citotoksični učinak eteričnog ulja divlje gorušice na staničnu liniju TCCSUP

Pri koncentracijama 10 µg/ml i 50 µg/ml ostvaruje se blagi citotoksičan učinak. Zbog malog prinosa nije bilo moguće pripremiti otopinu koncentracije 100 µg/ml



Slika 23. Citotoksični učinak mikrovalnog ekstrakta divlje gorušice na staničnu liniju TCCSUP

Citotoksični učinak je ostvaren pri svim koncentracijama, a najveći pri koncentraciji od 100 µg/ml nakon 72 sata inkubacije (80 %-tna inhibicija).

Mikrovalni ekstrakt divlje gorušice pokazuje najveće citotoksično djelovanje na TCCSUP staničnu liniju od sve 4 vrste ekstrakata.

4. ZAKLJUČAK

- Mikrovalna ekstrakcija se koristi za dobivanje eteričnog ulja iz sjemenki gorušice.
- GC-MS analizom nisu detektirani glukozinolati ni njihovi razgradni produkti u eteričnim uljima i mikrovalnim ekstraktima sjemenki divlje (*Sinapis arvensis* L.) i bijele gorušice (*Sinapis alba* L.).
- Dokazana je citotoksična aktivnost eteričnih ulja i mikrovalnih ekstrakata divlje i bijele gorušice na karcinom dojke-stanična linija MBA-MB-231 (do 90% inhibicije) i karcinom mokraćnog mjehura-stanična linija TCCSUP (do 80% inhibicije) primjenom MTT metode.
- Najveću citotoksičnu aktivnost pokazuje mikrovalni ekstrakt divlje gorušice na MBA-MB-231 staničnu liniju (90%-tna inhibicija).
- Citotoksična aktivnost u ovisnosti je o koncentraciji uzorka i vremenu inkubacije, premda njezin stupanj nije nužno u korelaciji s ovim faktorima.

5. LITERATURA

1. Kopjar M, Šubarić D, Piližota V. Glukozinolati: Biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. Hrana u zdravlju i bolesti. 2012;1(1):22-35

2. Prieto MA, Jiménez López C, Simal-Gandara J. Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. Adv Food Nutr Res. 2019;90(1):305-350
https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.008

3. Blažević I, Montaut S, Burčul F, Rollin P. Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential. U: Mérillon JM., Ramawat K. (urednici) Glucosinolates. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2015. pp. 1-58.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-26479-0_1-1

4. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/48/Glucosinolates.svg
[Pristupljeno: 20.07.2019.]

5. Isothiocyanates. Linus Pauling Institute; Oregon State University. [Pristupljeno: 19.07.2019.]
https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates

6. https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0926669004000494-gr1.gif
[Pristupljeno: 24.08.2019.]

7. Possenti M, Baima S, Raffo A, Durazzo A, Giusti AM, Natella F Glucosinolates in Food. U: Mérillon JM., Ramawat K. (urednici) Glucosinolates. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2017. pp. 87-132.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-25462-3_4

8. Kala C, Ali SS, Ahmad N, Gilani SJ, Ali Khan N. Isothiocyanates: a Review. Res J Pharmacogn. 2018;5(2):71-89. https://dx.doi.org/10.22127/rjp.2018.58511

9. Thomas J, Kuruvilla KM, Hrideek TK, Mustard. U: Peter KV, urednik. Handbook of Herbs and Spices. Oxford, UK: Woodhead Publishing; 2004. pp. 196-205. https://doi.org/10.1533/9781855738355.2.196

10. Bijela gorušica (*Sinapis alba*). Priroda i biljke. [Pristupljeno: 14.08.2019.] https://www.plantea.com.hr/bijela-gorusica/

11. https://www.kisspng.com/png-mustard-seed-white-mustard-spice-seeds-881751/ [Pristupljeno: 16.08.2019.]

12. Singh S, Das SS, Singh G, Perroti M, Schuff C, Catalán, CAN. Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial potentials of essential oils and oleoresins obtained from seeds of brassica juncea and sinapis Alba. MOJ Food Process Technol. 2017;4(4):113-120. https://doi.org/10.15406/mojfpt.2017.04.00100

13. Al-Qudah M, Al-Jaber HI, Muhaidat R, Hussein EI, Al Abdel Hamid A, Al-Smadi ML i sur. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Sinapis alba L. and Sinapis arvensis L. (Brassicaceae) growing wild in Jordan. Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.2011;2(4): 1136-1144.

14. http://1.bp.blogspot.com/-xnD8y3wiG_c/T4QD1HNSK6I/AAAAAAAABGo/-6RgJStShsI/s565/77-Sinapine-Acid-Sulphate.jpg [Pristupljeno: 24.08.2019.]

15. Poljska gorušica (*Sinapis arvensis*). Priroda i biljke. [Pristupljeno: 19.07.2019.] https://www.plantea.com.hr/poljska-gorusica/

16. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fc/Sinapis_arvensis_s_IP0310010.jpg [Pristupljeno: 19.07.2019.]

17. Arumugam A, Razis AFA. Apoptosis as a Mechanism of the Cancer Chemopreventive Activity of Glucosinolates: a Review. Asian Pac J Cancer Prev. 2018; 19(6): 1439–1448. https://dx.doi.org/10.22034%2FAPJCP.2018.19.6.1439

18. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacol. Rev., 2007;1(1): 7-18.

19. Gas Chromatography-Mass Spectroscopy. [Pristupljeno: 16.08.2019.] http://cires1.colorado.edu/jimenez/CHEM-5181/Labs/Gas_Chromatography.pdf

20. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph-vector.svg [Pristupljeno: 25.08.2019.]

21. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. *In Vitro* Tumor Models: Advantages, Disadvantages, variables, and Selecting the Right Platform. Front. bioeng. biotechnol. 2016;4 https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012

22. http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo_country=hr [Pristupljeno: 05.09.2019.]

23. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-5.aspx [Pristupljeno: 05.09.2019.]