

Moringa oleifera (Moringaceae) i Lepidium meyenii (Brassicaceae) kao superhrana : citotoksična aktivnost dobivenih ekstrakata

Lokas, Klaudija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:640946>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

KLAUDIJA LOKAS

***MORINGA OLEIFERA* (MORINGACEAE) I *LEPIDIUM MEYENII* (BRASSICACEAE)
KAO SUPERHRANA: CITOTOKSIČNA AKTIVNOST DOBIVENIH EKSTRAKATA**

Diplomski rad

Akademska godina:
2020./2021.

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

KLAUDIJA LOKAS

***MORINGA OLEIFERA* (MORINGACEAE) I *LEPIDIUM MEYENII* (BRASSICACEAE)
KAO SUPERHRANA: CITOTOKSIČNA AKTIVNOST DOBIVENIH EKSTRAKATA**

Diplomski rad

Akademska godina:
2020./2021.

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2021.

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 odobrena na 70. sjednici Vijeća studija Farmacije, 8. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 5. sjednici Vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

***Moringa oleifera* (Moringaceae) i *Lepidium meyenii* (Brassicaceae) kao superhrana: citotoksična aktivnost dobivenih ekstrakata**

Klaudija Lokas, broj indeksa 201

Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksični učinak uzoraka dobivenih iz *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii*. na stanične linije humanih karcinoma dojke i mokraćnog mjehura. Korišteni su autolizom dobiveni ekstrakti iz *Moringa oleifera* te iz *Lepidium meyenii*, žute i crvene mace. Obje stanične linije tretirane su ekstraktima u koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 h korištenjem MTT metode. Utjecaj na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 svih korištenih uzoraka je značajniji pri većim koncentracijama, od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najveći citotoksični učinak na T24 staničnu liniju ima ekstrakt crvene mace pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 h inkubacije, s IC₅₀ vrijednosti od 17,57 µg/mL, što se smatra značajno aktivnim ekstraktom. *In vitro* istraživanje na stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 pokazalo je umjerenu citotoksičnu aktivnost kod svih korištenih ekstrakata. Najveći učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica pokazao je ekstrakt *Moringa oleifera* pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 h inkubacije, ali u manjoj mjeri od ekstrakta crvene mace kod T24 linije. Citotoksični učinak biljnih vrsta *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii* je potvrđen, a potvrđene učinke je potrebno ispitati *in vivo* na životinjskim modelima.

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, MTT metoda

Rad sadrži: 63 stranice, 20 slika, 2 tablice, 38 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Maja Valić, član
2. doc. dr. sc. Marina Degoricija, član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 26.10.2021.

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.70 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.8 and Faculty Council of School of Medicine, session no.5
Mentor: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD
Technical assistance: Assoc. Prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

***Moringa oleifera* (Moringaceae) and *Lepidium meyenii* (Brassicaceae) as superfood: cytotoxic effect of given extracts**

Klaudija Lokas, index number 201

The aim of this research was to examine the cytotoxic effect of samples obtained from *Moringa oleifera* and *Lepidium meyenii* on human breast and bladder cancer cell lines. Extracts obtained by autolysis from *Moringa oleifera* and *Lepidium meyenii*, yellow and red maca, were used. Both of the cell lines were treated with concentrations of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL. Cytotoxicity was determined after 4, 24, 48 and 72 h using the MTT method. Effect on bladder carcinoma cells of all used samples was more significant at the higher concentrations, of 50 µg/mL and 100 µg/mL. The most significant cytotoxic effect on the T24 cell line was achieved by red maca extract at a concentration of 50 µg/mL after 72 h of incubation, with IC₅₀ value of 71,57 µg/mL, which is characterized as a very active extract. *In vitro* research on breast carcinoma cells MDA-MB-231 has shown moderate cytotoxic activity with all used extracts. *Moringa oleifera* extract has shown the most significant effect on reduction of metabolically active cells, at a concentration of 50 µg/mL after 72 h of incubation, but weaker than red maca extract on the T24 cell line. The cytotoxic effect of *Moringa oleifera* and *Lepidium meyenii* is confirmed and it should be examined *in vivo* on animal models.

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

Keywords: plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay

Thesis contains: 63 pages, 20 figures, 2 tables, 38 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Maja Valić, PhD, member
2. Marina Degoricija, assistant professor, PhD, member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, member - supervisor

Defence date: 26.10.2021.

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	1
1.1. KARCINOM	2
1.1.1. ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI	4
1.2. KARCINOM DOJKE	6
1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	6
1.2.2. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	6
1.2.3. LIJEČENJE	7
1.3. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA	10
1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	10
1.3.2. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	10
1.3.3. LIJEČENJE	11
1.4. <i>LEPIDIUM SPP.</i>	12
1.4.1. <i>LEPIDIUM MEYENII</i>	13
1.5. IZOTIOCIJANATI	16
1.6. <i>MORINGA SPP.</i>	18
1.6.1. <i>MORINGA OLEIFERA</i>	18
1.7. POLIFENOLI	24
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	26
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. METODA IZOLACIJE	29
3.1.1. AUTOLIZA (EKSTRAKCIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA)	29
3.2. STANIČNE LINIJE	30
3.3. POSTUPAK	31
3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI	32
4. REZULTATI	34
4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – STANIČNA LINIJA T24	35
4.1.1. <i>MORINGA OLEIFERA</i> EKSTRAKT	35
4.1.2. <i>LEPIDIUM MEYENII</i> EKSTRAKT – ŽUTA MACA	36
4.1.3. <i>LEPIDIUM MEYENII</i> EKSTRAKT – CRVENA MACA	37

4.2. KARCINOM DOJKE – STANIČNA LINIJA MDA-MB-231.....	38
4.2.1. <i>MORINGA OLEIFERA</i> EKSTRAKT	38
4.2.2. <i>LEPIDIUM MEYENII</i> EKSTRAKT – ŽUTA MACA.....	39
4.2.3. <i>LEPIDIUM MEYENII</i> EKSTRAKT – CRVENA MACA.....	40
5. RASPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČAK	46
7. LITERATURA.....	48
8. SAŽETAK.....	53
9. SUMMARY	55

ZAHVALA

Roditeljima i obitelji na beskrajnoj podršci tijekom studiranja.

Prijateljima koji su mi uvijek bili oslonac i učinili ovo razdoblje nezaboravnim.

Mentorici prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić na ukazanoj prilici za provođenje ovog istraživanja, na svim savjetima, pomoći i razgovorima.

1. UVOD

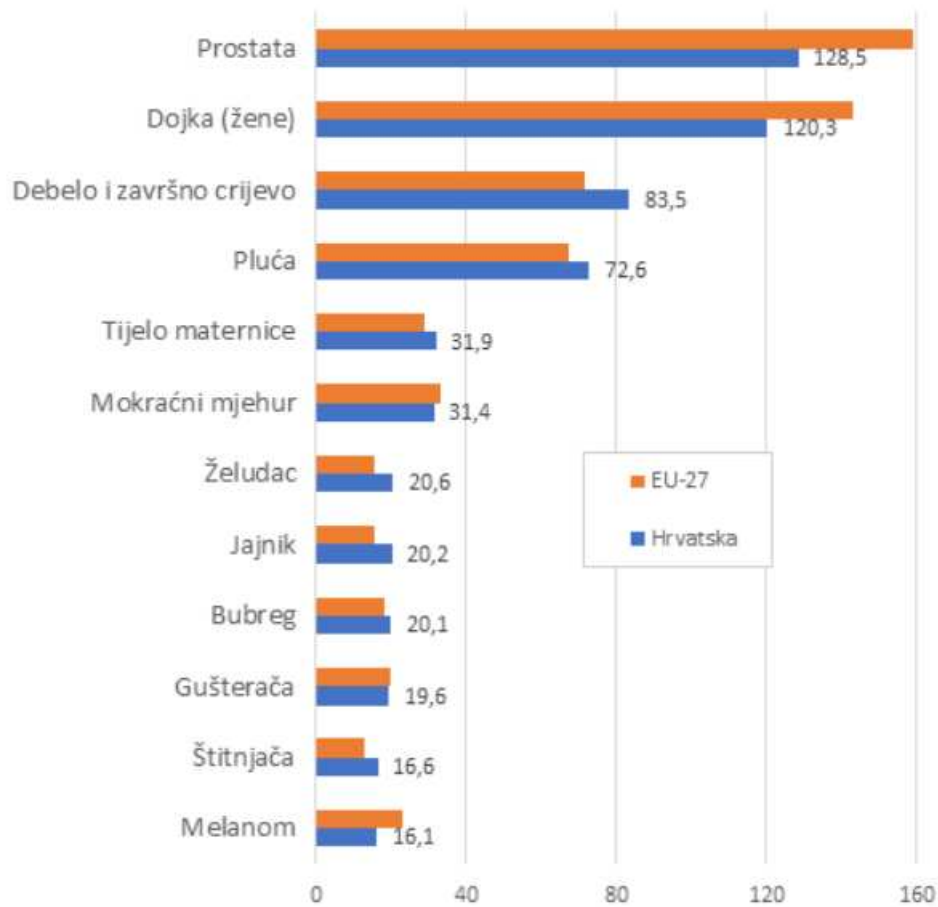
1.1. KARCINOM

Karcinom se definira kao zloćudna preobrazba koju karakterizira pretjerano umnožavanje epitelnih stanica. Posljedično pretjeranom umnožavanju, stanice formiraju tumore, odnosno, nakupljaju se u izvanstaničnim tekućinama, krvi, ascitesu i metastaziraju (1).

Kao glavni uzročnik tvorbe tumora navodi se mutacija gena koji nadziru ciklus staničnog umnožavanja. Mutacije mogu biti nasljedne ili stečene, a nerijetko tumori nastaju kao posljedica međudjelovanja endogenih i egzogenih čimbenika. Od endogenih čimbenika važno je napomenuti nasljedne poremećaje DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) te prevelik oksidativni stres kao nokse koje pokreću nestabilnost genoma. Egzogeni čimbenici su brojni, a dijele se na fizičke (ionizacijska i ultraljubičasta zračenja), kemijske (ksenobiotici, citostatici, imunosupresivi itd.) i biološke (neke virusne infekcije, neki mikotoksini). Pod utjecajem navedenih noksi, dolazi do disfunkcije mehanizma popravka DNA i potencijalne nekontrolirane diobe stanica, odnosno karcinoma (1).

U odnosu na normalne stanice, zloćudne stanice pokazuju neograničeno razmnožavanje kao svojstvo koje im omogućava besmrtnost, dokle god postoje povoljne metaboličke okolnosti. Druga važna razlika koja omogućuje tumorskim stanicama prednost nad stanicama domaćina je povećana učinkovitost anaboličkih enzima, a smanjena kataboličkih, to jest povećana je sinteza nukleinskih kiselina i bjelančevina, a smanjena njihova razgradnja. Premda rast tumora prati angiogeneza, u slučajevima kada nije dostatna, tumorske se stanice prilagođavaju na hipoksiju. Tumorske stanice izražavaju antigene koje imunološki sustav prepoznaje i pokreće imunološku reakciju, no tijekom svog razvijanja različitim mehanizmima zaobilaze imunološki odgovor domaćina (1).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2018., 1 od 6 smrti u svijetu događa se kao posljedica raka. Karcinom pluća, prostate, želuca i kolorektalni karcinom su najčešći tipovi karcinoma u muškaraca, dok su kod žena najčešći karcinomi dojke, pluća, štitnjače, kolorektalni te karcinom grlića maternice (Slika 1) (2).



Slika 1. Incidencija raka u Hrvatskoj i EU, 2020. godina

Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>

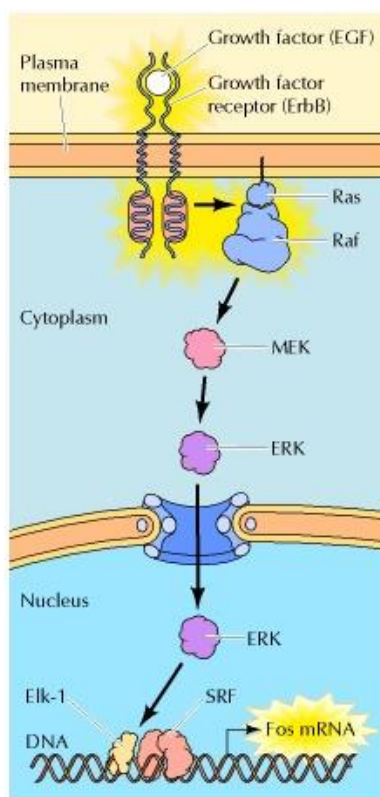
1.1.1. ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI

Onkogeni su geni koji su povezani sa zloćudnom preobrazbom stanica. Stanični geni koji izazivaju tumor nazivaju se protoonkogeni, a oni koji se nalaze u tumorskim stanicama, stanični onkogeni. Do nastanka staničnih onkogenata dovode promjene protoonkogenata, kao što su povećanje aktivnosti ili promjena građe. Funkcija protoonkogenata pod nadzorom je tumor supresorskih gena, gena koji sprječavaju zloćudnu preobrazbu, a ona nastaje kada se poremeti ravnoteža između aktivnosti navedenih gena. Neki od onkogenata ljudskog genoma su onkogeni čimbenika rasta (*sis*), receptora za čimbenike rasta (*HER2/neu*), Ras proteina, protein kinaza (*src*, *fos*), inhibitora apoptoze (*bcl 2*) i proteina jezgre (*myc*, *ets*, *fos*). Protoonkogeni određuju sintezu proteina važnih za razmnožavanje stanica, stoga je očito da njihova promjena u onkogene dovodi do poremećaja u razmnožavanju. Kao primjer navedenog mehanizma može poslužiti receptor za epidermalni čimbenik rasta koji je pod kontrolom protoonkogenata *c-erbB-1*. Navedeni receptor nalazi se na membranama mnogih stanica u organizmu, a na njegov izvanstanični dio veže se epidermalni čimbenik rasta čime se potiče enzimska aktivnost citoplazmatskog dijela i njen učinak tirozin – kinaze koja zatim izvršava autofosforilaciju i fosforilaciju brojnih drugih staničnih proteina. Fosforilacijom se potiču razni stanični mehanizmi kao što su pinocitoza, glikoliza, sinteza RNA i proteina, ali i stanična dioba. Membrane zloćudnih stanica sadrže povećan broj receptora za epidermalni čimbenik rasta. Inhibitor apoptoze *bcl 2* također može preuzeti ulogu onkogenata budući da njegova pretjerana aktivnost omogućava tumorskim stanicama smanjenu apoptozu, odnosno povećano preživljavanje (1).

Točkaste mutacije *RAS* gena (*H-ras*, *K-ras*, *N-ras*) predstavljaju jedne od najčešćih genetskih promjena pronađenih kod raznih karcinoma u ljudi. *RAS* GTP–aza je enzim koji normalno inaktivira *RAS* tako što katalizira hidrolizu *RAS*–GTP. Njegovom mutacijom dolazi do smanjenog enzimskog djelovanja te se na taj način omogućuje prekomjerna aktivnost *RAS* proteina. Protein kodiran mutiranim *RAS* genima regulira staničnu diobu zloćudnih stanica, apoptozu, metabolizam i angiogenezu preko MAPK, PI3K i drugih signalnih puteva (3).

Onkogeni proteini mogu djelovati kao čimbenici rasta (epidermalni čimbenik rasta), receptori za čimbenike rasta i kao unutarstanične signalne molekule (Ras i Raf). Ras i Raf aktiviraju signalni put ERK MAP kinaze čime dovode do transkripcije dodatnih gena (npr. *Fos*) koji kodiraju potencijalno onkogene regulatorne proteine (Slika 2.) (4).

Tumor supresorski geni ili antionkogeni sprječavaju izražaj onkogeni na različite načine. Najviše je istraženo djelovanje proteina p53 kontroliranog antionkogenom *p53* koji je smješten na 17. kromosomu. Tumor supresorski gen *p53* djeluje tako da kontrolira popravak oštećenja DNA te tako sprječava mutacije koje bi mogle izazvati zloćudan rast. U većini zloćudnih tumora, na primjer u 70% karcinoma kolona i rektuma, 50% raka pluća i 40% raka dojke, pronađene su promjene *p53* tumor supresorskog gena. Takvi tumori obično brže metastaziraju i bolesnici kraće preživljavaju u odnosu na istovrsne tumore bez navedene mutacije (3).



Slika 2. Onkogeni i signalni putevi

(proteini s poznatim onkogenim potencijalom označeni su žuto)

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9840/figure/A2650/>

1.2. KARCINOM DOJKE

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom dojke je najčešći karcinom koji se pojavljuje kod žena u razvijenom svijetu. U Hrvatskoj se godišnje dijagnosticira oko 2 600 novih slučajeva karcinoma dojke, od čega oko 800 sa smrtnim ishodom. Drugim riječima, svaka deveta žena oboli od raka dojke. Rizični čimbenici za razvoj karcinoma dojke su dob, reproduktivne značajke, prethodne lezije, genetička predispozicija, hormonski status te čimbenici okoliša. Rak dojke rijetko se pojavljuje u mlađih žena, a najčešće tijekom i nakon menopauze, kao i kod žena s ranom prvom mjesečnicom i kasnom menopauzom, kod žena koje nisu rađale ili su rodile u starijoj životnoj dobi. Rizik za rak dojke raste kod žena kojima je ranije dijagnosticiran karcinom endometrija ili estrogen ovisni tumor jajnika, kod žena koje imaju povećan BMI u postmenopauzalnom razdoblju te kod žena koje su kao hormonsku nadomjesnu terapiju uzimale velike doze estrogena. Nije dokazano da oralni kontraceptivi povišuju rizik od nastanka karcinoma dojke (5).

Ipak, dokazano je da su žene koje su uzimale oralne kontraceptive u razdoblju duljem od 4 godine, a prije navršениh 25 godina, u 52% većem riziku od nastanka raka dojke u odnosu na žene koje nisu uzimale oralne kontraceptive. Uzimanje oralnih kontraceptiva u žena starijih od 25 godina nije pokazalo povećan rizik za nastanak raka dojke (6).

1.2.2. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Karcinom dojke najčešće se očituje kao bezbolan čvor u dojci. Ostali znakovi uključuju pojavu smeđeg krvavog iscjetka iz dojke, uvlačenje bradavice, otekline, navlačenje kože i upale u području zahvaćenom tumorom. Ukoliko su zahvaćeni regionalni limfni čvorovi, oni postaju vidljivi i moguće ih je palpirati u aksili ili supraklavikularnoj regiji, ovisno o lokalizaciji. U uznapredovaloj fazi bolesti, vidljiv je ulcerirani tumor koji zahvaća dio ili cijelu dojku te katkada i edem ruke kao posljedica zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorom. Karakteristična je klinička slika upalnog raka dojke gdje se dojka opisuje kao crvena, otečena i upaljena s kožom poput kore naranče (6).

U današnje vrijeme kada su dostupne suvremene dijagnostičke tehnike kao što su mamografija, ultrazvuk ili MR (engl. *magnetic resonance*) pregled dojki, inspeksijsko – palpacijski pregled liječnika, ali i sve veća svijest žena o važnosti redovite samokontrole dojki, rak dojke morao bi biti otkriven u pretkliničkom stadiju. Na otkrivanje primarnog tumora dojke većeg od 2 cm, gleda se kao na dijagnostičko – preventivski neuspjeh, a razvijene zemlje bilježe trend smanjenja veličine primarnog tumora dojke. Dijagnostički postupak započinje anamnezom i kliničkim pregledom. Prilikom uzimanja anamneze, važno je definirati potencijalnu izloženost rizičnim čimbenicima, vrijeme pojave simptoma i znakova te njihovo trajanje. Klinički pregled započinje vizualnim pregledom simetrije dojki, vizualnih nepravilnosti na koži te veličine limfnih čvorova. Nakon vizualnog pregleda, pregled se nastavlja palpacijom, uspoređujući lijevu i desnu dojku, a zatim se palpacijom pregledava regionalna limfna drenaža, aksile i supraklavikularne regije. Kao najvažnija pretraga koja se koristi u postavljanju rane dijagnoze raka dojke, navodi se mamografija, radiološka dijagnostička pretraga koja koristi x – zrake niskih energija. Osim za ranu detekciju tumora dojke (nepalpabilni tumori), mamografija se koristi i za potvrdu palpabilnog nalaza. Danas su preporuke za svaku ženu da napravi ovu pretragu u dobi od 40 godina (35 – 40 u slučaju pozitivne obiteljske anamneze) te da se nakon toga mamografija ponavlja svake 2 – 3 godine, odnosno češće ovisno o nalazima i obiteljskoj anamnezi. U dijagnostici se također koristi i ultrazvučni pregled dojki. Nakon postavljene dijagnoze primarnog tumora dojke, rade se i daljnje pretrage koje uključuju laboratorijske pretrage krvi, rendgen torakalnih organa i ultrazvučni pregled abdomena, kako bi se isključilo postojanje udaljenih presadnica. U slučaju povećanja limfnih čvorova, potrebno je napraviti punkciju i procijeniti njihovu zahvaćenost tumorom (6).

1.2.3. LIJEČENJE

Rano otkrivanje preduvjet je za visoku stopu izlječenja, a mamografija je temelj ranog otkrivanja i smanjuje smrtnost od raka dojke za 30%. U definiranju terapijskog cilja u obzir se uzima stupanj proširenosti. Kod lokalnog raka dojke svrha liječenja je izlječenje, a kod proširenog – diseminiranog raka cilj je pacijentici osigurati što dulje preživljenje sa što većom kvalitetom života (6).

U slučaju lokalnog, primarno operabilnog raka dojke, primjenjuje se kirurško uklanjanje primarnog tumora te mogućih presadnica u aksilarnim limfnim čvorovima. Kirurški se uklanja cijela dojka (mastektomija) ili samo dio dojke zahvaćen tumorom (kvadrantektomija i segmentektomija). Moguće je i izvođenje supkutane mastektomije pri čemu se rekonstruira dojka tkivom pacijentice ili silikonskim implantatima. Kod uklanjanja dijela dojke, potrebno je ordinirati poslijeoperacijsku radioterapiju u svrhu smanjenja učestalosti recidiva. Radioterapijom se stopa recidiva smanjuje sa 30 – 35% bez radioterapije na manje od 5%. Nakon kirurškog zahvata i patofiziološkog pregleda tumora, vrši se procjena stadija bolesti, stupanj vjerojatnosti pojave lokalnog recidiva ili diseminacije raka dojke. Ukoliko je procjenom ustanovljen srednji ili visok stadij rizika recidiva, primjenjuje se adjuvantna terapija u cilju uništavanja mogućih zaostalih mikropresadnica. Adjuvantna terapija podrazumijeva radioterapiju, hormonsku terapiju, kemoterapiju i imunoterapiju. Radioterapija se primjenjuje obično mjesec dana nakon operacije, a polje zračenja zahvaća dojku te po potrebi i aksilarne limfne čvorove. Adjuvantna hormonska terapija indicirana je u svih pacijentica s pozitivnim nalazom estrogenskih ili progesteronskih receptora. Ova se terapija primjenjuje nakon kemoterapije i radioterapije, a kao zlatni standard u premenopauzalnih pacijentica primjenjuje se selektivni estrogenski receptor modulator (SERM), tamoksifen. Primjenom hormonske terapije smanjuje se rizik smrti za oko 25% te rizik lokalnog recidiva za 45%. Kod postmenopauzalnih pacijentica s hormonski ovisnim tumorima primjenjuju se inhibitori aromataze (letrozol, anastrozol i egzemestan) tijekom 10 – 15 godina. Adjuvantna kemoterapija se primjenjuje kod pacijentica sa srednjim i visokim rizikom za recidiv, kod pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova te kod pacijentica sa trostruko negativnim i HER2 pozitivnim tumorima. Kemoterapija uključuje primjenu antraciklina ili taksana. Primjenom kemoterapije rizik smrti od raka dojke smanjuje se za oko 30%. Adjuvantna imunoterapija podrazumijeva primjenu trastuzumaba u periodu od jedne godine, a primjenjuje se kod HER2 pozitivnih tumora i tumora većih od 0,5 cm, a rizik smrti smanjuje se za oko 40% (6).

Kod liječenja lokalnog, primarno neoperabilnog raka dojke, primarno se primjenjuje kemoterapija te rijetko hormonska terapija. Cilj terapije je smanjenje primarnog tumora kako bi stanje prešlo u operabilno te zatim izvođenje mastektomije uz uklanjanje regionalnih limfnih čvorova. U slučaju da se tumor nije smanjio dovoljno za izvođenje kirurškog zahvata, primjenjuje se radioterapija (6).

Kod pacijentica oboljelih od metastatskog raka dojke, primarni je cilj postići najduže moguće preživljenje, a da pritom nije narušena kvaliteta života pacijentice. Pri liječenju se koriste kemoterapija, hormonska terapija (SERM – tamoksifen i LHRH agonisti – leuprolid i goserelin kod premenopauzalnih žena te aromatazni inhibitori, SERM, megestrol acetat i SERD – fulvestrant koji smanjuje ekspresiju estrogenskih receptora, kod postmenopauzalnih žena), imunoterapija, ciljani lijekovi (tirozin – kinazni inhibitori: lapatinib – unutarstanični inhibitor HER1 i HER2 receptora), inhibitori ciklin ovisnih kinaza 4 i 6 (anti – CDK4/6: palbociklib, ribociklib, abemaciclib), radioterapija te simptomatsko – potporna terapija. Pacijentice u ovom stadiju bolesti preživljavaju prosječno 3 – 5 godina, ovisno o stupnju diseminacije bolesti, zahvaćenosti parenhimalnih organa, broju zahvaćenih organa, obilježjima tumora te vlastitom zdravstvenom stanju i dobi. Terapija se prilagođava individualno svakoj pacijentici pazeći pritom na želje pacijentice, obilježja tumora, odnos učinkovitosti i toksičnosti terapije te odnos duljine preživljenja i kvalitete života (6).

Nakon provedenog liječenja, nužno je praćenje pacijentica kako bi se moglo na vrijeme postupati u slučaju recidiva. Savjetuje se provođenje triju kontrola tijekom prve dvije godine, a zatim dvije kontrole godišnje tijekom sljedeće tri godine. Ukoliko nema pojave recidiva, kontrola se zakazuje jednom godišnje. Kontrola se sastoji od mamografije, ultrazvuka, kliničkog pregleda i biokemijskih pretraga krvi (6).

1.3. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Svake godine dijagnosticira se gotovo 550 000 novih slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura. Približno 2,1% svih smrti koje su posljedica obolijevanja od raka su uzrokovane karcinomom mokraćnog mjehura. Broj novooboljelih od ove bolesti u stalnom je porastu u razvijenim zemljama (7).

Kao rizični čimbenici navode se pušenje cigareta, industrijske kemikalije (anilinske boje), shizostomijaza te kemoterapija citostaticima. Vjerojatno je da se pušenjem rizik od nastanka karcinoma mokraćnog mjehura povećava pet do sedam puta, a kao mehanizam nastanka karcinoma navodi se izlučivanje karcinogenih tvari putem bubrega pri čemu se navedene tvari zadržavaju u mokraćnom mjehuru. Shizostomijaza kao uzrok ovog karcinoma potvrđena je u zemljama u kojima je infekcija parazitom *Schistosoma haematobium* rasprostranjena, npr. Egipat. Kemoterapija citostaticima kao što je ciklofosamid djeluje na epitel mokraćnog mjehura izazivajući mutacije s ishodom nastanka karcinoma mokraćnog mjehura (5).

1.3.2. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Kod većine pacijenata karcinom mokraćnog mjehura očituje se bezbolnom hematurijom, u nekim slučajevima mikroskopskom, u nekim makroskopskom. Osim hematurije, česta je pojava učestalog mokrenja kao posljedica smanjenja kapaciteta mokraćnog mjehura. U slučaju lokalnog širenja karcinoma dolazi do pojave hidronefroze, opstipacije, limfedema i palpabilne mase u maloj zdjelici. Ukoliko bolest napreduje, dolazi do pojave drugih simptoma ovisno o lokalitetu sijela presadnica. Presadnice su uglavnom lokalizirane u trbušnim limfnim čvorovima, jetri, plućima i kostima (6).

Kod pojave hematurije, pretrage izbora su intravenska urografija i cistoskopija. Ukoliko se cistoskopijom dokaže postojanje tumora, izvodi se transuretralna resekcija tumora u mjehuru. Dijagnoza tumora gornjeg dijela urotrakta određuje se retrogradnom pijelografijom te ureteroskopijom. U dijagnostici se također koristi i citološki pregled mokraće, a za procjenu stadija

bolesti koristi se CT (engl. *computed tomography*), MR abdomena i male zdjelice te rendgenski prikaz pluća. Ukoliko laboratorijske pretrage krvi pokažu povišene vrijednost alkalne fosfataze ili u slučaju prisutnosti simptoma koji su vezani za koštani sustav, vrši se scintigrafija kostiju (6).

1.3.3. LIJEČENJE

Način liječenja ovisi o stadiju bolesti pa se tako liječenje neinvazivnog (površinskog) karcinoma uvelike razlikuje od liječenja mišićno – invazivnog karcinoma ili metastatske bolesti (6).

Kod površinskog raka mokraćnog mjehura, okosnica liječenja je transuretralna endoskopska resekcija koju je potrebno ponavljati svaka tri mjeseca zbog visoke stope recidiva. Po izvođenju zahvata, primjenjuje se adjuvantna imunoterapija ili kemoterapija intravezikalnim putem. Kao imunoterapija najčešće se primjenjuje BCG (*Bacillus Calmette – Guerin*), a kao kemoterapija mitomicin C. Površinski rak mokraćnog mjehura je izlječiv, a primjenom navedene adjuvantne terapije, produljuje se preživljenje te smanjuje broj recidiva (6).

Kao osnova liječenja mišićno invazivnog raka mokraćnog mjehura navodi se radikalna cistektomija uz neoadjuvantnu kemoterapiju cisplatinom. Izraz neoadjuvantan označava ordiniranje terapije preoperativno, u cilju smanjenja veličine primarnog tumora i osiguranja radikalnog kirurškog zahvata. Adjuvantna kemoterapija primjenjuje se ovisno o stadiju bolesti, patohistološkoj slici tumora i statusu lokalnih limfnih čvorova. Kod određenih pacijenata provodi se usporedno radioterapija i kemoterapija kako bi se očuvao mokraćni mjehur. Radioterapija može izazvati lokalne komplikacije u vidu iritabilnosti mjehura i proktitisa (6).

Kod metastatske bolesti osnovu liječenja čine kemoterapija i imunoterapija. Citostatici koji se koriste su cisplatin, metotreksat, doksorubicin, vinblastin, gemcitabin te paklitaksel, a najčešće cisplatina i gemcitabin u kombinaciji, tzv. CG – protokol. Od imunoterapije primjenjuju se atezolizumab ili pembrolizumab, a kao najdjelotvornija terapija pokazala se primjena anti PD 1 i PD – L1 protutijela. Ukoliko je bolest metastazirala do kostiju, indicirana je primjena bifosfonata i palijativne radioterapije bolnih mjesta (6).

1.4. *LEPIDIUM SPP.*

Lepidium je rod biljaka iz porodice krstašica (Brassicaceae) koji broji oko 200 biljnih vrsta (Slika 3). Ovaj rod je široko rasprostranjen u Americi, Aziji, Africi, Aziji, Europi i Australiji. Uključuje poznate vrste kao što su vrtna kreša i maca, o kojoj će ovdje biti riječi, a općenito se biljke ovog roda često nazivaju paprenjačama (8).



Slika 3. *Lepidium spp.*

Preuzeto s: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Lepidium+spp.>

1.4.1. *LEPIDIUM MEYENII*

Lepidium meyenii, maca ili peruanski ginseng je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice krstašica (Brassicaceae) (9).

Maca raste na visinama 4 000 – 4 500 metara diljem peruanskih središnjih Andi gdje se i uzgaja zbog svojeg korijena. Tradicionalno se koristi zbog bogatog nutritivnog sastava i ljekovitih svojstava, a Peru izvozi macu u obliku praška, kapsula, tableta, brašna, soka i ekstrakata (10).

Što se tiče karakteristika rasta i veličine mace, možemo je usporediti s repom i rotkvicom. Zeleni, mirisni vrhovi su kratki i naslonjeni na tlo. Tanki listovi niču u rozeti na površini tla, ne postižući duljinu veću od 20 centimetara. Značajan dio biljke je mesnati hipokotil koji je stopljen s glavnim korijenom čineći oblik kruške. Korijen mace značajno varira u veličini, obliku i boji pa se tako hipokotil pojavljuje u žutoj, ljubičastoj, crnoj, crvenoj, zelenoj i zlatnoj boji (Slika 4). Razlike u boji uzrokuju varijabilne razine antocijana. Korijen se najčešće suši te dalje obrađuje u brašno za pripremu hrane ili kao dodatak prehrani u obliku praha (11).



Slika 4. *Lepidium meyenii*

Preuzeto s: https://sunflowerss.en.ecplaza.net/products/lepidium-meyenii-walp_3792834

Korijen ove biljke bogat je vlaknima, esencijalnim masnim kiselinama i drugim nutrijentima, uključujući vitamin C, bakar, željezo i kalcij (Slika 5). Osim vrijednih nutrijenata, korijen mace sadrži i razne bioaktivne sastojke koji povoljno utječu na organizam čovjeka, zbog čega je njena konzumacija u zadnjih 20 godina u stalnom porastu diljem svijeta (12).

Vitamins	mcg/100g	Proteins	10%	Amino Acids	mg/g of protein
Vitamins B1	800mcg			Alanine	63.1
Vitamins B2	530mcg	Carbohydrates	51%	Arginine	99.4
Niacin	40.1mg			Aspartic Acid	91.7
Vitamin C	2160 mcg	Fiber	5%	Glutamic Acid	156.5
				Glycine	68.3
		Fatty Acids	mcg/100g	Histidine	21.9
		Linoleic	7200mcg	HO-Proline	26
Minerals	mg/100g	Palmitic	5200mcg	Isoleucine	47.4
Calcium	5.9	Oleic	2450mcg	Leucine	91
Copper	16.6			Lysine	54.5
Iron	80			Methionine	28
Iodine	92.3			Phenylalanine	55.3
Magnesium	256			Proline	0.5
Phosphorus	2050			Sarcosine	37
Potassium	18.7			Serine	50.4
Sodium	3.8			Threonine	33.1
Zinc	4.46			Tryptophan	4.9
				Tyrosine	30.6
				Valine	79.3

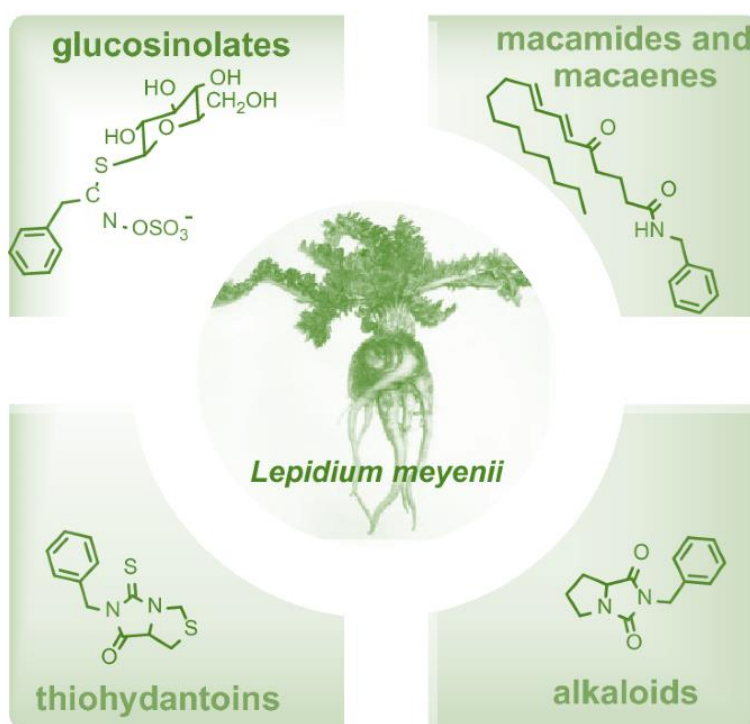
Slika 5. Sadržaj nutrijenata *Lepidium meyenii*

Preuzeto s: <http://www.lepidiummeyenii.com/composition.htm>

Brojna istraživanja pokazala su povoljne učinke mace na seksualnu funkciju, spermatogenezu, reproduktivnu funkciju kod žena, pamćenje, depresiju, anksioznost, raspoloženje općenito, kao i djelovanje kod benigne hiperplazije prostate, osteoporoze i metaboličkog sindroma. Uočene su razlike u djelovanju crne, žute i crvene vrste mace. Crna maca pokazala je najbolje učinke kod spermatogeneze, pamćenja i umora, dok je crvena korisna kod benigne hiperplazije prostate i eksperimentalno inducirane osteoporoze (13).

Korijen žute mace korišten je u istraživanju na eksperimentalnim životinjama kako bi se dokazali učinci na spermatogenezu. Kod životinja koje su dobijale vodene ekstrakte većih korijena, dokazano je značajno povećanje broja spermija (14).

Poboljšanje plodnosti primijećeno u istraživanjima, maca vjerojatno duguje sadržaju fitosterola ili fitoestrogena. Dokazano je i prisustvo drugih potencijalno aktivnih sastojaka: macaridina, macamida, macaena, glukozinolata i maca alkaloida (Slika 6). Osim spomenutih spojeva, maca također sadrži alkaloide, sterole, masne kiseline, vitamine i minerale. Alkaloidi dokazani u maci pokazali su djelovanje protiv sterilnosti, a glukozinolati antioksidativno djelovanje. Nadalje, u kliničkim istraživanjima zabilježeni su podatci o potencijalno pozitivnim učincima ove biljke na simptome menopauze u postmenopauzalnih žena. Svi navedeni podatci zahtijevaju daljnja istraživanja (15).



Slika 6. Kemijski spojevi mace

Preuzeto s: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13659-018-0185-7>

1.5. IZOTIOCIJANATI

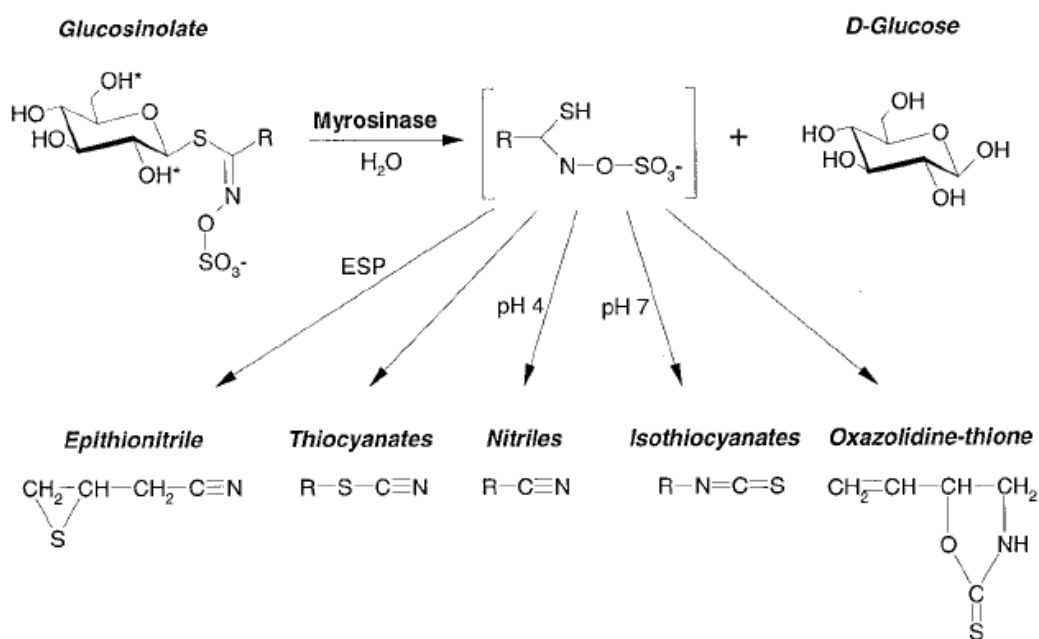
Glukozinolati su spojevi koji sadrže sumpor i dušik sa zajedničkom osnovnom strukturom koja sadrži β – D – tioglukoenu skupinu vezanu na sulfonirani dušični ostatak i različite lance građene od aminokiselina. Sve biljke koje sadrže glukozinolate, sadrže i enzim mirozinazu, koji se oslobađa tijekom ozljede tkiva biljke, primjerice žvakanjem, te zatim hidrolizira glukozinolate u izotiocijanate i druge spojeve. Ova se reakcija također može odvijati djelovanjem mirozinaze iz mikroflore gastrointestinalnog trakta (16).

Izotiocijanati su produkti hidrolize glukozinolata, spojeva koji su kao sekundarni metaboliti u visokim koncentracijama prisutni u biljkama roda krstašica. Uloga ovih spojeva u biljkama jest obrana od različitih patogena, a najviše je istražena njihova antifungalna aktivnost. Djelovanjem enzima mirozinaze, kao razgradni produkti glukozinolata mogu nastati izotiocijanati, tiocijanati, nitrilni i epitionitrilni spojevi, ovisno o uvjetima u kojima se reakcija odvijala (Slika 7). Upravo je za izotiocijanate poznato kako daju ovim biljkama opore arome i povoljne bioaktivne učinke (17).

Uvjeti kemijske reakcije razgradnje glukozinolata koji određuju krajnji sastav produkta uključuju pH vrijednost, dostupnost iona željeza i prisutnost proteina koji interferiraju s mirozinazom (18).

Izotiocijanati se smatraju jednim od najvažnijih razgradnih produkata glukozinolata zahvaljujući svojim antikancerogenim svojstvima. Alilizotiocijanati, produkt hidrolize glukorafanina, i sulforafan, produkt hidrolize singrina, pokazali su značajne učinke vezane uz navedena svojstva. Ovi spojevi interferiraju s metaboličkim reakcijama faze 1 i faze 2 jetrenih enzima te epitelnih stanica, na način da utječu na stabilnost navedenih reakcija kancerogenih komponenti. Inaktiviraju toksine koji nastaju u reakcijama faze 1, stvarajući pritom u vodi topljive spojeve tijekom faze 2, koji se zatim izlučuju urinom. Posljedično, dolazi do detoksikacije organizma. Istraživanja su pokazala kako ovi spojevi djeluju protektivno na stanice inhibirajući mitozu i na taj način ispoljavaju antitumorsko djelovanje. Također, primijećeni su učinci stimulacije apoptoze (19).

Osim navedenih učinaka, izotiocijanati su pokazali i značajne protuupalne učinke. Kada govorimo o protuupalnom djelovanju izotiocijanata, važno je naglasiti njihovu sposobnost da smanje ili čak inhibiraju aktivnost NF – κ B aktiviranih B stanica (engl. *nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer”*). Poznato je da NF – κ B regulira ekspresiju ciklooksigenaze – 2, enzima čijom aktivacijom dolazi do porasta koncentracije prostaglandina, jednog od ključnih faktora upalnih reakcija (20).



Slika 7. Razgradni produkti glukozinolata

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/The-general-structure-of-glucosinolates-their-intermediate-and-final-degradation_fig1_226971139

1.6. MORINGA SPP.

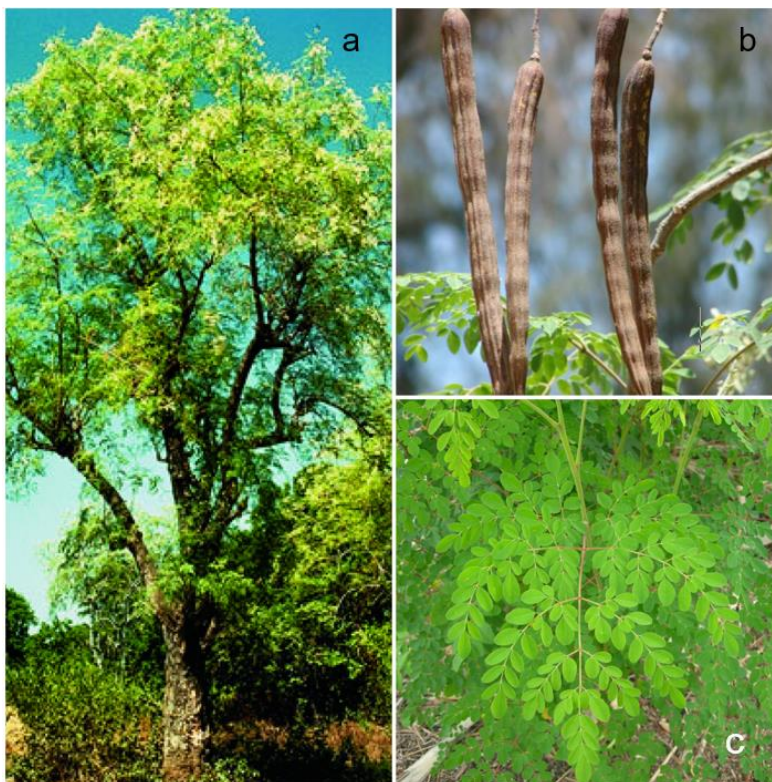
Moringa je biljni rod iz reda kupusolike, porodice Moringaceae, rasprostranjen po dijelovima Afrike i Azije. Rod broji 13 vrsta tropskih i subtropskih biljaka koje variraju u veličini od malih zeljastih biljaka do masivnih stabala. Ovdje će biti riječi o vrsti *Moringa oleifera* čiji se mahunasti plodovi koriste kao hrana u mnogim dijelovima svijeta, a poglavito u južnoj Aziji (21).

1.6.1. MORINGA OLEIFERA

Konjska rotkvica (*Moringa oleifera*) je najčešće uzgajana vrsta roda *Moringa*, prirodnog staništa u podnožju Himalaje i sjeverozapadne Indije. *Moringa oleifera* ubraja se u listopadnu vrstu drveća, može narasti do visine 10 – 12 metara i promjera debla od 45 centimetara. Stablo ima otvorenu krošnju od padajućih, krhkih grana i listova nalik na perje. Biljka na područjima s hladnijom klimom cvjeta jednom godišnje, u kasno proljeće ili rano ljeto, a u toplijim uvjetima moguće je i cvjetanje dva puta u godini ili čak cijelu godinu. Plod je viseća, trostrana smeđa mahuna veličine 20 – 45 centimetara, koja sadrži tamnosmeđe okrugle sjemenke veličine oko 1 centimetar koje se jedu i svježe (Slika 8) (22).

Listovi krošnje stabla *Moringe* koriste se u pripremi čaja, sjemenke se koriste za pripremu ulja, a prah se izrađuje od lišća, kao i od korijena. Raznim istraživanjima utvrđeno je kako upotreba ove biljke donosi brojne povoljne učinke na zdravlje (23).

Ekstrakti sjemenki pokazali su antibakterijsko djelovanje te se koriste kao sredstvo za pročišćavanje vode. U populacijama ljudi koji pate od malnutricije i siromaštva, *Moringa* predstavlja superhranu upravo zbog svojeg bogatog sastava, a pri tome je važno naglasiti i činjenicu da njezina redovita konzumacija zadovoljava dnevne potrebe za proteinima neuhranjenih ljudi (24).



Slika 8. *Moringa oleifera*

a) cijela biljka, b) plodovi, c) listovi

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/Full-grown-Moringa-oleifera-in-Jabalpur-Madhya-Pradesh-India_fig2_288327947 a)

<https://www.feedipedia.org/content/moringa-moringa-oleifera-pods-0> b)

<https://www.echocommunity.org/resources/d98f8a44-1849-4753-abc2-ce22c843518c> c)

Moringa oleifera je biljka koja ima velike nutritivne i medicinske dobrobiti, a tradicionalno se naziva i „čudesno drvo“. Bogata je makro i mikronutrijentima te ostalim bioaktivnim sastojcima važnima za normalno funkcioniranje organizma (Slika 9). Suplementi ove biljke u prehrani smatraju se iznimno korisnima ponajviše zbog visokog sadržaja proteina, ali i ostalih sastojaka. *Moringa* sadrži 10 puta više vitamina A od mrkve, 7 puta više vitamina C od naranče, 17 puta više kalcija od mlijeka i 15 puta više kalija od banana (Slika 10) (24).

Nutrients	g/100 g plant materials		
	Fresh leaves	Dry leaves	Dry leaf powder
Protein (g)	6.7	29.4	27.1
Fats (g)	1.7	5.2	2.3
Carbohydrate (g)	12.5	41.2	38.2
Fiber (g)	0.9	12.5	19.2

Slika 9. Sadržaj makronutrijenata u svježim i suhim listovima, u prahu suhih listova *Moringe oleifera*

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8373516/>

Nutrients	mg/100 g plant materials				
	Fresh leaves	Dry leaves	Powder	Seed	Pods
Vitamin B1	0.06	2.02	2.64	0.05	0.05
Vitamin B2	0.05	21.3	20.5	0.06	0.07
Vitamin B3	0.8	7.6	8.2	0.2	0.2
Vitamin C	220	15.8	17.3	4.5 ± 0.17	120
Vitamin E	448	10.8	113	751 ± 4.41	—
Calcium	440	2185	2003	45	30
Magnesium	42	448	368	635 ± 8.66	24
Phosphorus	70	252	204	75	110
Potassium	259	1236	1324	—	259
Copper	0.07	0.49	0.57	5.20 ± 0.15	3.1
Iron	0.85	25.6	28.2	—	5.3
Sulphur	—	—	870	0.05	137

Slika 10. Sadržaj vitamina i minerala u listovima, sjemenkama i mahunama *Moringe oleifera*

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8373516/>

Poznato je kako su proteini jedni od osnovnih nutrijenata potrebnih za normalno funkcioniranje organizma, a njihove sastavnice, aminokiseline, dijelimo na esencijalne i neesencijalne. Dok neesencijalne aminokiseline može sintetizirati sam organizam, esencijalne smo obavezni unositi hranom. Listovi *Moringe* u obliku praha i u ovom slučaju mogu poslužiti kao izvrstan izvor hranjivih tvari, pogotovo ako govorimo o populaciji vegeterijanaca koja ima znatno smanjene mogućnosti unosa esencijalnih aminokiselina hranom (Slika 11) (24).

Source	Animal-derived sources					Plant-derived Sources			MLP*
	Egg	CB	Rui fish	Pangas fish	Tilapia fish	SB	Rice	WF	
Essential amino acids (g/100 g of dry matter)									
Histidine	2.4	4.5	0.63	0.54	0.32	2.6	0.15	0.23	2.2
Isoleucine	6.6	3.24	0.76	0.62	0.76	5.3	0.23	0.31	4.8
Leucine	8.8	6.4	1.43	1.14	1.49	7.7	0.50	0.69	9.2
Lysine	5.3	7.9	1.58	1.25	1.60	6.4	0.23	0.28	5.6
Methionine	3.2	2.5	0.63	0.56	0.68	1.3	0.21	0.22	1.8
Phenyl-alanine	5.8	3.2	0.83	0.63	0.82	5.0	0.35	0.48	6.2
Threonine	5.0	3.7	0.87	0.68	0.9	4.0	0.22	0.30	4.2
Tryptophan	1.7	—	0.31	0.23	0.3	1.4	0.05	0.12	—
Valine	7.2	3.46	0.98	0.76	0.94	5.3	0.37	0.45	5.4
Nonessential amino acids (g/100 g of dry matter)									
Tyrosine	4.2	3.65	0.54	0.47	0.61	3.7	0.24	0.27	4.0
Alanine	—	4.7	2.19	1.63	2.22	5.0	0.57	0.56	6.3
Arginine	6.2	5.8	1.24	0.99	1.28	7.4	0.48	0.44	7.4
Asparagine	11.0	7.8	—	—	—	1.3	—	—	—
Glutamic acid	12.6	11.2	3.46	2.58	3.5	19.0	1.30	3.54	10.7
Glycine	4.2	3.4	1.36	2.58	3.49	4.5	0.29	0.41	5.3
Proline	4.2	3.2	0.99	0.75	0.89	5.3	0.27	1.07	2.9
Serine	6.9	3.4	0.80	0.63	0.81	5.8	0.32	0.51	4.1
Cystine	2.3	1.1	0.13	0.14	0.15	1.9	0.14	0.22	0.6

Slika 11. Sadržaj aminokiselina u različitim izvorima u usporedbi s MLP (engl. *moringa leaf powder*)

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8373516/>

Analizom vodenih i etanolnih ekstrakata *Moringe*, utvrđen je visok sadržaj aktivnih sastojaka od kojih su najznačajniji fenoli, cijanogeni glikozidi, flavonoidi, tanini i saponini (25).

Vjeruje se da je sadržaj raznih alkaloida, sterola, polifenola i fenolne kiseline, masnih kiselina, flavonoida, izotiocijanata, terpena i antocijanina odgovoran za antibiotsko, antitumorsko, antioksidativno, kardioprotektivno, hepatoprotektivno i neuroprotektivno djelovanje *Moringe* (26).

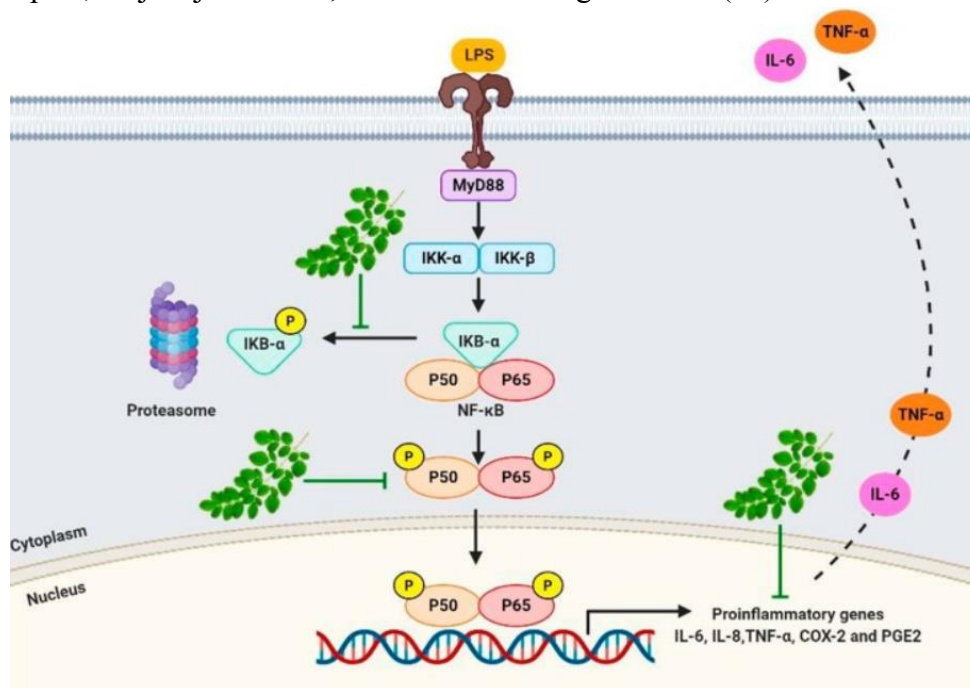
Gotovo svaki dio stabla *Moringe* smatra se važnim i pronalazi svoju upotrebu u tradicionalnoj medicini. Kao što je već spomenuto, ova biljka koristi se kao visokovrijedna hrana, ali i kao lijek za razna stanja. Vodeni ekstrakti korijena *Moringe* pokazali su značajnu protuupalnu, antiulkusnu i antitumorsku aktivnost. Pterigospermin, sastojak ekstrakta lišća i kore *Moringe*, ima snažna antibakterijska, fungicidna i antiparazitna svojstva. Aktivni sastojci lišća koji se smatraju odgovornima za antitumorsku aktivnost su glukozinolati, niazimicin i benzil izotiocijanat. *Moringa* također sadrži zeatin, prirodno prisutan biljni hormon koji ima snažno antioksidativno djelovanje, a pokazao je i antitumorsku aktivnost. U normalnim okolnostima, organizam održava ravnotežu odnosa oksidansa i antioksidansa. Kao posljedica raznih vanjskih i unutarnjih stresova, dolazi do narušavanja navedenog odnosa i povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva, a ovo se stanje naziva oksidativni stres. Poznata je direktna veza između reaktivnih kisikovih spojeva i stanične smrti. Ukoliko se organizam predugo nalazi u stanju oksidativnog stresa, dolazi do razvoja raznih kroničnih bolesti i oštećenja, zbog čega je poželjna konzumacija antioksidansa. *Moringa* se pokazala kao visokovrijedan izvor antioksidansa, s mnogo većim antioksidativnim potencijalom od konvencionalnih biljaka koje se koriste u ove svrhe. Ekstrakti lišća *Moringe* pokazali su hepatoprotektivno djelovanje, gastroprotektivno djelovanje i spazmolitičko djelovanje, zbog čega se tradicionalno koriste za tretiranje poremećaja motiliteta crijeva. Alkaloidi iz *Moringe* pokazali su korisno djelovanje kod stabilizacije krvnog tlaka, izazivajući blago diuretski učinak te reducirajući serumske razine triglicerida i LDL (engl. *low density lipoprotein*) kolesterola (24).

Sve su brojnija istraživanja o povoljnim učincima *Moringe* na kontrolu dijabetesa melitusa. Posljednje istraživanje provedeno na glodavcima oboljelim od dijabetesa melitusa pokazalo je kako su se dijabetička hipertrigliceridemija i hiperkolesterolemija značajno poboljšale kod glodavaca tretiranih *Moringom*, a tromjesečnom kroničnom primjenom smanjile su se i razine glukoze izmjerene natašte (27).

U posljednje vrijeme, istražuje se i potencijal hidroalkoholnog ekstrakta sjemenki *Moringe* kao hidrogela za zacjeljivanje rana. Trenutni rezultati pokazuju kako bi se ovaj pripravak mogao koristiti kao alternativna terapija za zacjeljivanje rana, ravnopravno s uobičajenim pripravcima (28).

Kao što je već spomenuto, listovi, sjemenke i kora *Moringe* sadrže aktivne sastojke koji uključuju fenolne kiseline, flavonoide, glukozinolate i izotiocijanate. Iako postoje brojna istraživanja, mehanizam djelovanja ovih tvari još uvijek nije razjašnjen, ali njihovo antitumorsko djelovanje je dokazano mnogo puta. Vodeni ekstrakti lišća *Moringe* pokazali su djelovanje na smanjenje ekspresije *p53* gena kod svih testiranih staničnih linija. Kod stanične linije karcinoma dojke, BRCA – 1 i drugi markeri proliferacije također su bili sniženi prilikom tretiranja navedenim ekstraktima (29).

Istraživanja su pokazala kako stanice tretirane ekstraktima *Moringe* imaju smanjenu proizvodnju upalnih spojeva (Slika 12). *Moringa* je suprimirala mRNA ekspresiju IL – 1 (engl. interleukin), IL – 6, TNF- α (engl. tumor necrosis factor), PTGS2 (engl. prostaglandin endoperoxide synthase) i NF- κ B. Također je dokazana mogućnost inhibicije već sintetiziranih medijatora upale, uključujući IL – 6, TNF- α i ciklooksigenaze – 2 (30).

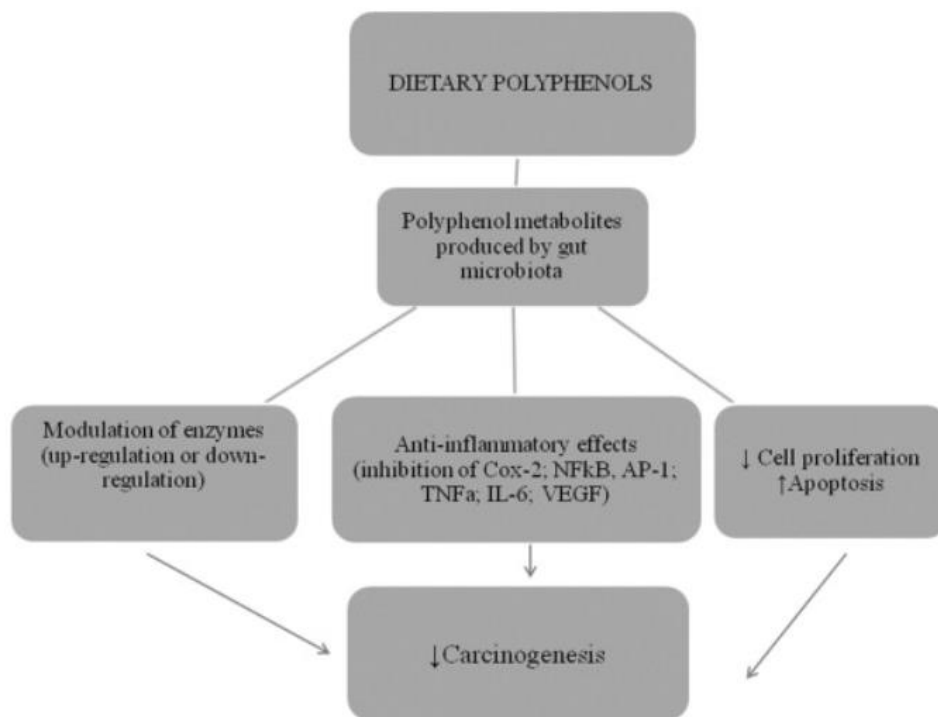


Slika 12. Mehanizam protuupalnog djelovanja vrste *Moringa oleifera*

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6982846/>

1.7. POLIFENOLI

Polifenoli su grupa spojeva koji su prirodno prisutni u biljkama, primjerice voću, povrću, čaju, kavi i vinu. Kemijski se polifenoli karakteriziraju kao velika heterogena skupina koja u svom sastavu sadrži hidroksilirane fenolne skupine. Na temelju njihove kemijske strukture, odnosno prema broju fenolnih prstenova i na njih vezanih skupina, polifenole možemo podijeliti na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi čine skupinu od preko 9 000 različitih spojeva koji se dalje dijele na podskupine, flavanole, antocijanidine, izoflavone i proantocijanidine. Jednom kad su ingestirani, naš organizam ih prepoznaje kao ksenobiotike i njihova biodostupnost je relativno niska u usporedbi s mikro i makronutrijentima. Procjenjuje se da se od ukupnog unosa polifenola svega 5 – 10 % apsorbira u tankom crijevu. Ostatak polifenola nakuplja se u lumenu debelog crijeva i ondje podliježe enzimatskoj razgradnji crijevne mikroflore. Tako nastali metaboliti apsorbiraju se gotovo u potpunosti te se smatra da su upravo oni odgovorni za zdravstvene učinke hrane bogate polifenolima. Zdravstveni učinci uključuju zaštitu od gastrointestinalnih poremećaja i patogena, smanjenje serumske razine kolesterola i pojačavanje crijevnog imunološkog odgovora preko stimulacije citokina. Istraživanjima tijekom posljednjeg desetljeća dokazani su i razni drugi učinci polifenola, a neki od njih su protuupalni, antioksidativni, antikancerogeni, antiadipogeni, antidijabetički, kardioprotektivni i neuroprotektivni učinci. Posljedično se nameće zaključak kako postoji veza između konzumacije hrane bogate polifenolima i smanjenog rizika nekoliko kroničnih bolesti. Postoji nekoliko istraživanja koja su potvrdila vezu između konzumacije polifenola i smanjenja ukupnog rizika za obolijevanje od raka (Slika 12). Predloženi mehanizmi djelovanja uključuju inhibiciju proinflammatoryh medijatora, inhibiciju enzima ciklooksigenaze – 2, kao i čimbenika NF- κ B, AP-1 (engl. *activator protein*), TNF- α , IL6 and VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*). Čini se da inhibicija karcinogeneze ovim kemijskim spojevima uključuje kombinaciju više mehanizama djelovanja. Ipak, ostaje nepoznato možemo li unosom polifenola isključivo prehranom postići dovoljne koncentracije da bi utjecali na navedene puteve (31).



Slika 12. Predloženi mehanizmi djelovanja u prevenciji raka hranom unesenim polifenolima

Preuzeto s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286313000946?via%3Dihub>

Kao prirodno prisutni kemijski spojevi, polifenoli su pokazali potencijal u medicinskim intervencijama vezanim za razne bolesti, od kojih su neke tumori, upalne i kardiovaskularne bolesti. Zahvaljujući svojoj specifičnoj molekularnoj strukturi, polifenoli se mogu kombinirati s proteinima, metalnim ionima, polimerima i nukleinskim kiselinama te su tako postali važne komponente sustava za dostavljanje lijekova. Njihova uloga očituje se u zaštiti nanolijekova od oksidacije, gdje služe kao zaštitni sloj i na taj način poboljšavaju svojstva polimernih nosača lijekova. Osim navedenog svojstva, polifenoli se inkorporiraju u nosače lijekova i kako bi ostvarili farmakološke učinke u progresiji bolesti (32).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje ekstrakata iz biljnih vrsta *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii* na linijama humanih karcinomskih stanica. Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnoj aktivnosti ispitivana je na staničnoj liniji karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i staničnoj liniji trostruko negativnog karcinoma dojke (MDA–MB–231).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. METODA IZOLACIJE

3.1.1. AUTOLIZA (EKSTRAKCIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA)

Kako bi se pripremili za postupak ekstrakcije, uzorci su prethodno podvrgnuti procesu autolize. Odgovarajuće mase uzoraka stavljene su u tikvice zajedno s malom količinom destilirane vode i alikvotom otopine enzima mirozinaze. U svaki uzorak dodano je po 10 mL diklormetana, organskog otapala, u svrhu poticanja razgradnje glukozinolata. Tikvice s uzorcima omotane su parafilmom te stavljene na tresilicu oko 10 minuta. Sadržaj tikvica je potom filtriran preko cjediljke i filter papira u lijevak za odjeljivanje. Nakon mućkanja u lijevku za odjeljivanje i odvajanja dvaju slojeva, donji sloj je odliven u čašu u koju je dodan bezvodni natrijev sulfat kako bi se adsorbirala zaostala voda. Biljni materijal dodatno je ispran malom količinom diklormetana, a zatim ponovljen postupak odjeljivanja. Dobiveni ekstrakti spremljeni su u bočice koje se čuvaju u hladnjaku do analize.

3.2. STANIČNE LINIJE

In vitro ispitivanje citotoksičnog djelovanja uzoraka dobivenih iz biljnih vrsta *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii* provodilo se na humanim karcinomskim stanicama MDA–MB–231 i T24. Obilježja ovih staničnih linija prikazana su u tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Obilježja MDA–MB–231 stanične linije

Preuzeto s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/>

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tip stanica	epitelne stanice
Morfologija	epitelna
Obilježja rasta	adherentna
Tkivo	dojka, mliječna žlijezda
Bolest	adenokarcinom
Dob	51 godina
Spol	ženski
Etnicitet	bijela rasa
Format proizvoda	smrznuto
Uvjeti čuvanja	hlapljiva faza tekućeg dušika

Tablica 2. Obilježja T24 stanične linije

Preuzeto s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/>

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Morfologija	epitelna
Tkivo	mokraćni mjehur
Bolest	karcinom prijelaznog epitela
Dob	81 godina
Spol	ženski
Etnicitet	bijela rasa
Format proizvoda	smrznuto

3.3. POSTUPAK

Nakon odmrzavanja, stanične linije su uzgojene u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO₂. DMEM je medij koji sadrži hranjive tvari potrebne za uzgoj stanica, aminokiseline, minerale i FBS (engl. *Fetal bovine serum*). Osim navedenih tvari, u mediju se nalaze antibiotici i Red fenol indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je potrebno zamijeniti medij svježim.

Po uklanjanju DMEM – a, stanice koje su adherirale na podlogu tretiraju se tripsinom. Tripsin je enzim koji kidanjem peptidnih veza omogućuje odvajanje stanica od podloge i njihovo presađivanje.

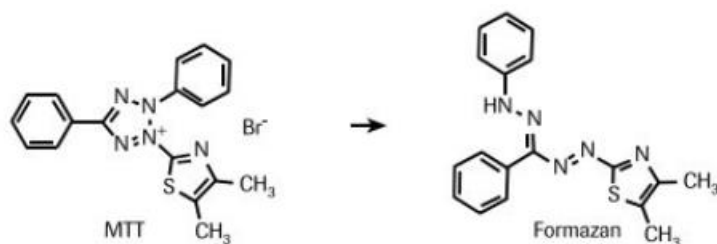
Stanice se broje na način da se 50 µl stanica pomiješa s 50 µl Trypan Blue boje koja oboji mrtve stanice i tako omogućava brojenje živih stanica koje ostaju nebojene. Nakon brojanja, jednak broj stanica presađuje se u mikrotitarsku pločicu sa 96 jažica u 3 replikata i ostavi preko noći u inkubatoru kako bi se prihvatile za podlogu.

U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim uzorcima dobivenim iz vrste *Moringa oleifera* i s dvama uzorcima vrste *Lepidium meyenii*, žutom i crvenom macom u koncentracijama 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL tijekom 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. U tri jažice koje predstavljaju kontrolu, dodan je samo medij.

3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

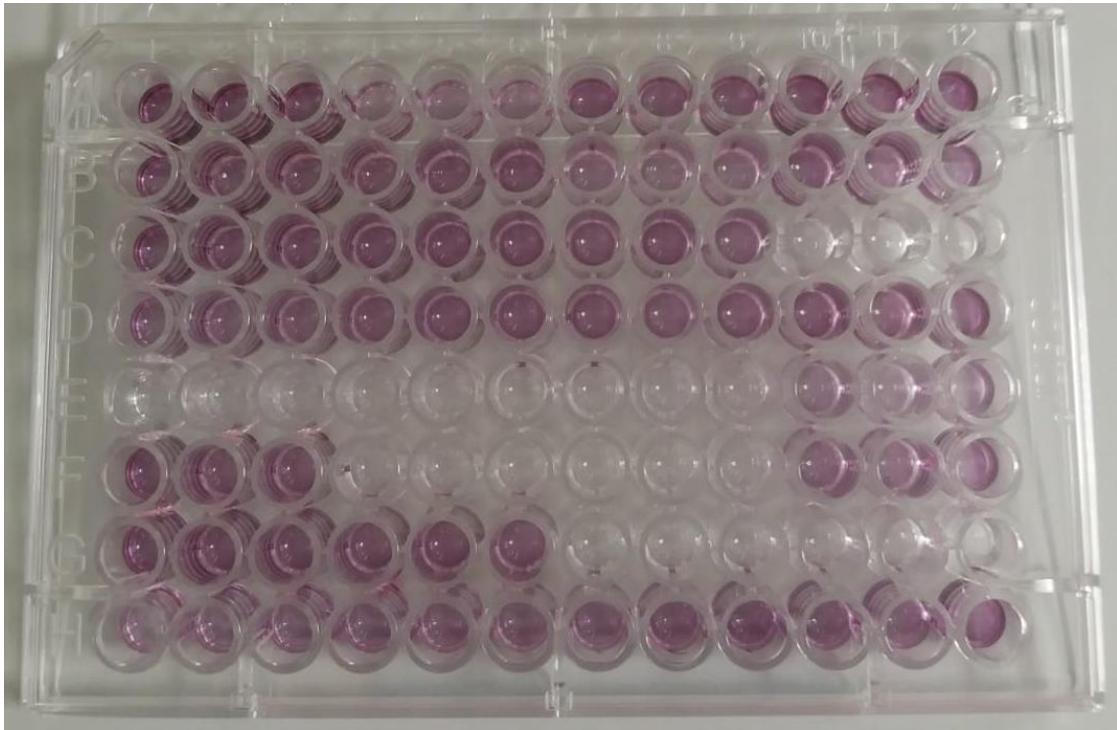
Mjerenjem staničnog metabolizma određeno je preživljenje stanica, korištenjem MTT metode. Žuti tetrazolin MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) se reducira u metabolički aktivnim stanicama. MTT test korišten je za određivanje postotka metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja pojedinom ekstraktu biljaka, s obzirom na to da mrtve ili metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Žive ili metabolički aktivne stanice, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj, formazan (Slika 13). Dakle, kako stanice odumiru, tako nestaje i njihova sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Nastali unutarstanični ljubičasti formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski. Kako bi se očitala apsorbancija nastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid).

Nakon dva sata inkubacije, MTT je ispran i dodan je DMSO. Pločice su inkubirane 10 minuta na 37°C uz treskanje. Apsorbancija je mjerena na 570 nm. Omjer apsorbancije stanica tretiranih uzorcima dobivenima iz biljke *Moringa oleifera*, odnosno *Lepidium meyenii* i apsorbancije stanica koje nisu tretirane, pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih ekstrakata.



Slika 13. Redukcija MTT-a u formazan

Preuzeto s: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>



Slika 14. Ljubičasto obojenje nakon dodavanja DMSO

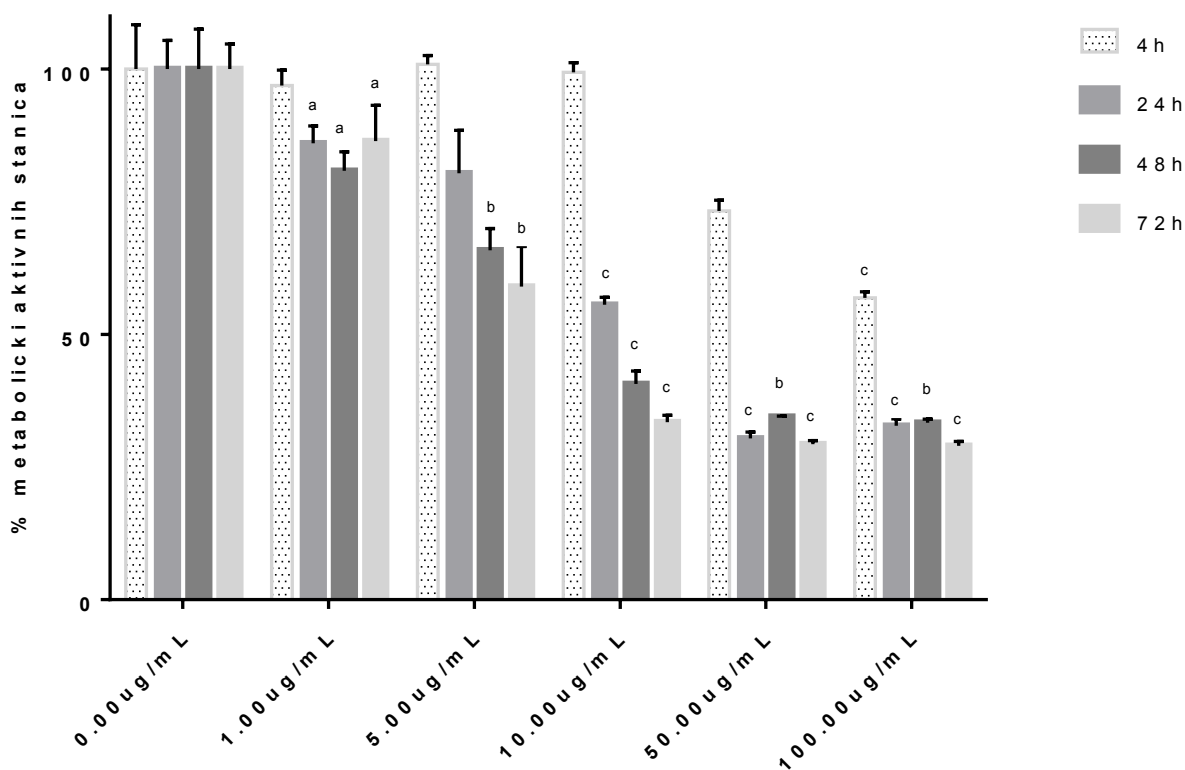
4. REZULTATI

Empirijska obrada:

Kao ograničenje istraživanja uzima se premala serija podataka.

4.1. KARCINOM MOKRAČNOG MJEHURA – STANIČNA LINIJA T24

4.1.1. MORINGA OLEIFERA EKSTRAKT



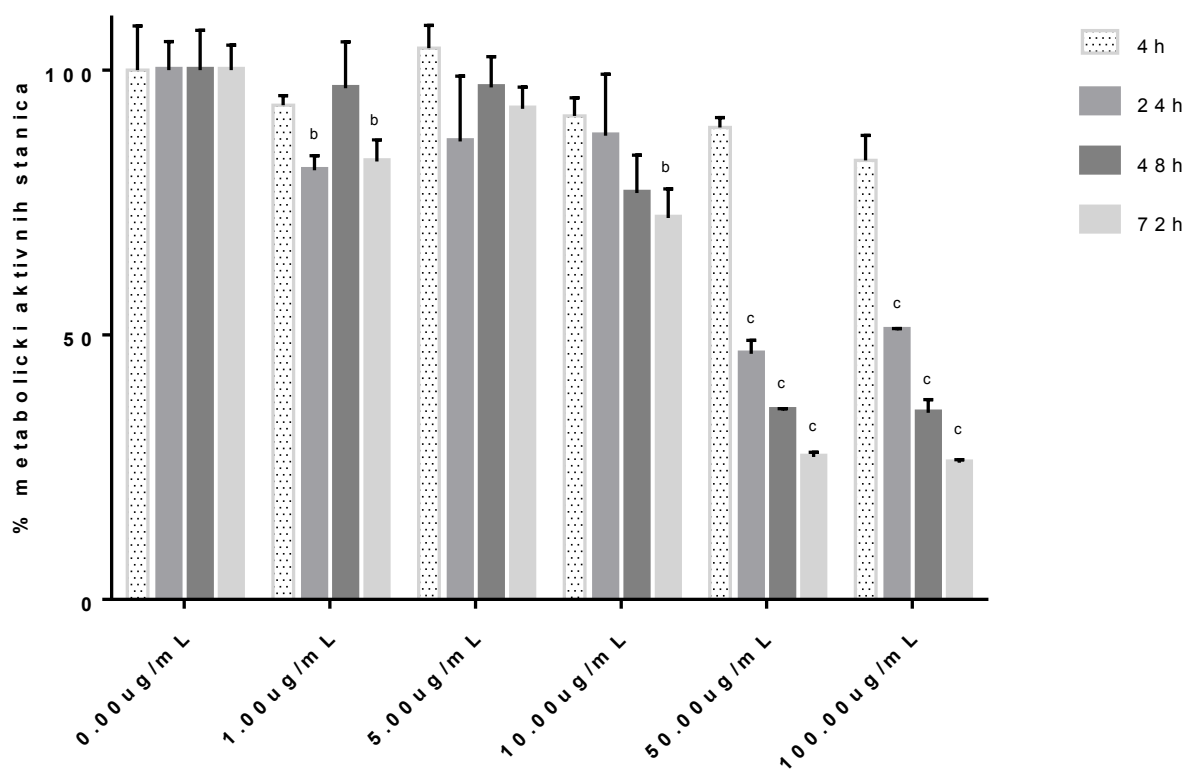
T24	4 h	24 h	48 h	72 h
IC50 (µg/mL)	ND	19,63	9,683	7,844

Slika 15. Citotoksična aktivnost ekstrakta *Moringa oleifera* na staničnu liniju T24

a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$; IC50, inhibitorna koncentracija 50; ND, ne može se odrediti

Moringa oleifera ekstrakt povećanjem koncentracije pokazuje povećanje citotoksičnog učinka koji je najizraženiji pri koncentracijama od 50 i 100 µg/mL nakon 72 h inkubacije. IC50 vrijednost nakon 72 h inkubacije iznosi 7,844 µg/mL, što se karakterizira kao značajno aktivan ekstrakt.

4.1.2. *LEPIDIUM MEYENII* EKSTRAKT – ŽUTA MACA



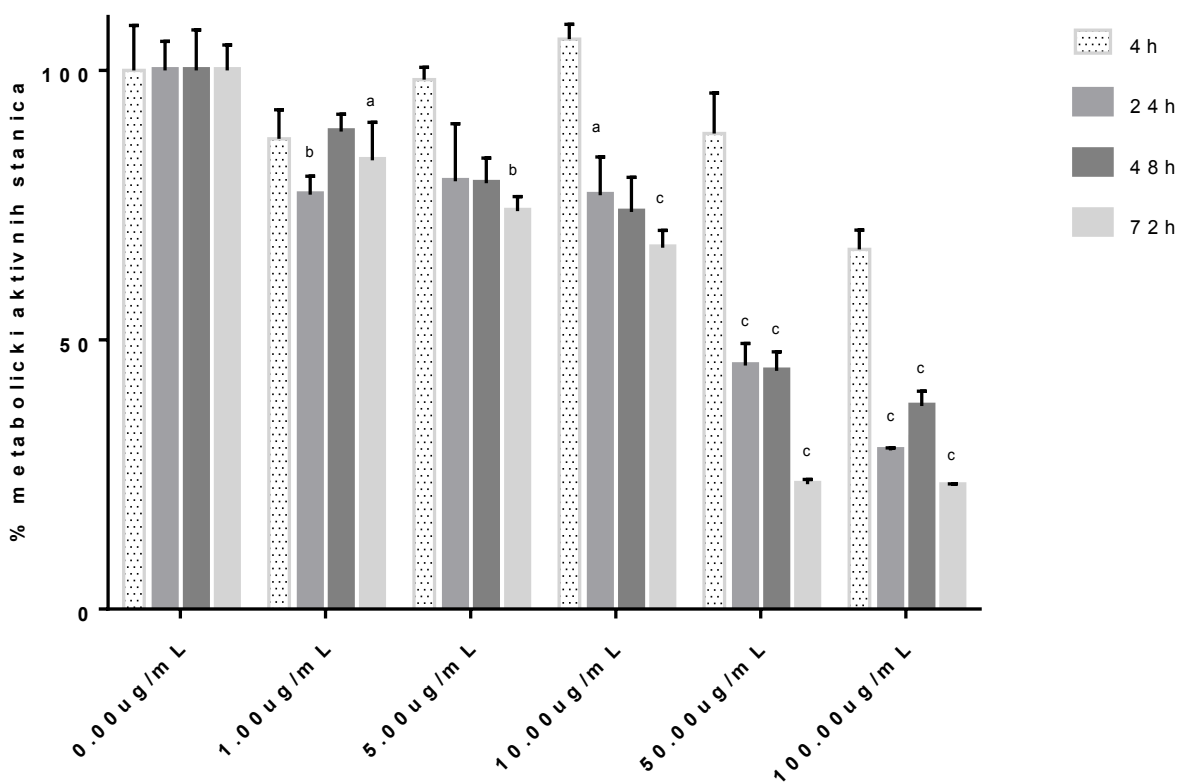
T24	4 h	24 h	48 h	72 h
IC50 (µg/mL)	ND	63, 4	38, 47	25, 81

Slika 16. Citotoksična aktivnost ekstrakta *Lepidium meyenii* – žuta maca na staničnu liniju T24

a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$; IC50, inhibitorna koncentracija 50; ND, ne može se odrediti

Ekstrakt žute mace pokazuje citotoksičan učinak pri koncentracijama od 50 i 100 µg/mL. Učinak se povećava usporedno s trajanjem inkubacije. Citotoksična aktivnost najveća je nakon 72 h inkubacije kada IC50 vrijednost iznosi 25,81 µg/mL, odnosno ekstrakt pokazuje umjerenu citotoksičnu aktivnost.

4.1.3. *LEPIDIUM MEYENII* EKSTRAKT – CRVENA MACA



T24	4 h	24 h	48 h	72 h
IC50 (µg/mL)	ND	35, 19	38, 76	17, 57

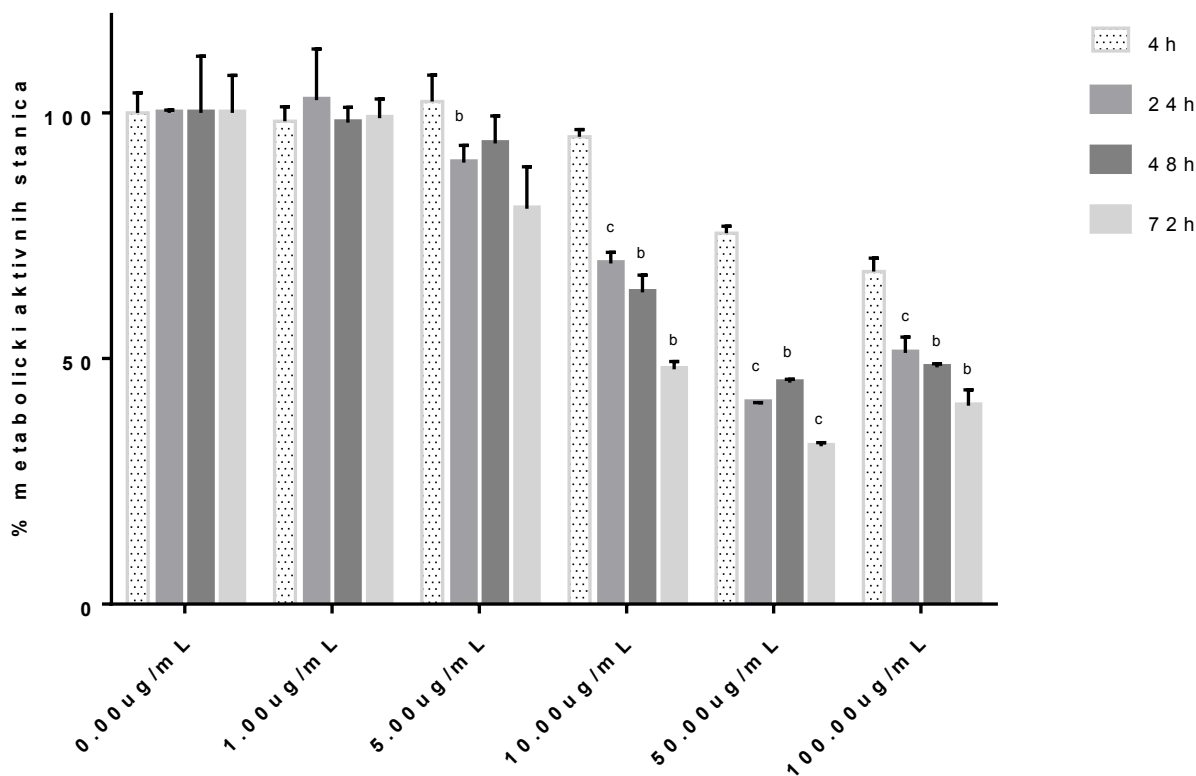
Slika 17. Citotoksična aktivnost ekstrakta *Lepidium meyenii* – crvena maca na staničnu liniju T24

a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$; IC50, inhibitorna koncentracija 50; ND, ne može se odrediti

Ekstrakt crvene mace pokazuje značajan citotoksičan učinak pri koncentracijama od 50 i 100 µg/mL. Pri koncentraciji od 50 µg/mL, učinak je najveći nakon 72 h inkubacije. Pri koncentraciji od 100 µg/mL, nakon 24 h inkubacije zabilježen je citotoksičan učinak, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica, a nakon 72 h inkubacije ponovno je zabilježen značajan citotoksičan učinak. IC50 vrijednost od 17,57 µg/mL nakon 72 h inkubacije ukazuje na značajnu citotoksičnu aktivnost ekstrakta crvene mace.

4.2. KARCINOM DOJKE – STANIČNA LINIJA MDA-MB-231

4.2.1. MORINGA OLEIFERA EKSTRAKT



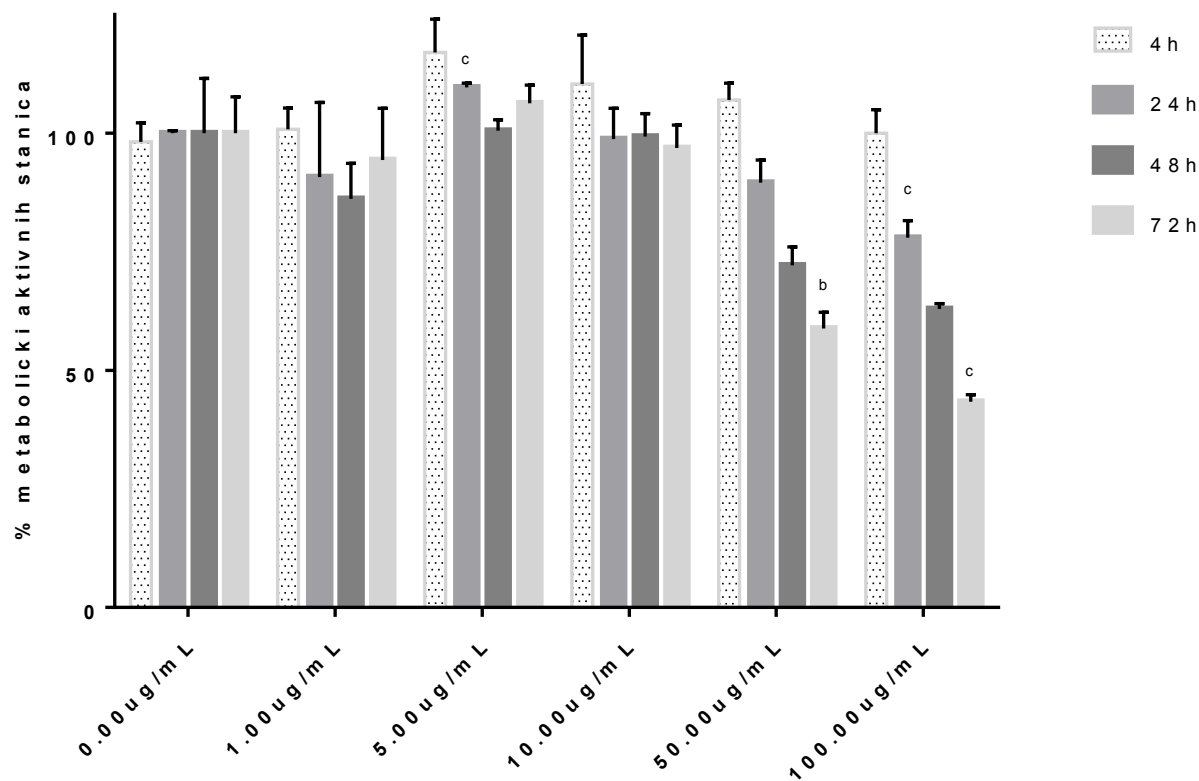
MDA-MB-231	4 h	24 h	48 h	72 h
IC50 (µg/mL)	ND	49, 01	48, 04	20, 16

Slika 18. Citotoksična aktivnost ekstrakta *Moringa oleifera* na staničnu liniju MDA-MB-231

a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$; IC50, inhibitorna koncentracija 50; ND, ne može se odrediti

Moringa oleifera ekstrakt pokazuje značajan citotoksičan učinak pri koncentracijama od 10, 50 i 100 µg/mL. Pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 24 h inkubacije dolazi do neznatnog oporavka stanica, dok pri koncentracijama od 10 i 100 µg/mL citotoksičan učinak raste usporedno s duljinom trajanja inkubacije. Nakon 72 h inkubacije najveći učinak ostvaren je pri koncentraciji od 50 µg/mL, a IC50 vrijednost iznosi 20,16 µg/mL što se karakterizira kao umjerena citotoksična aktivnost.

4.2.2. LEPIDIUM MEYENII EKSTRAKT – ŽUTA MACA



MDA-MB-231	4 h	24 h	48 h	72 h
IC50 (µg/mL)	ND	ND	ND	82, 89

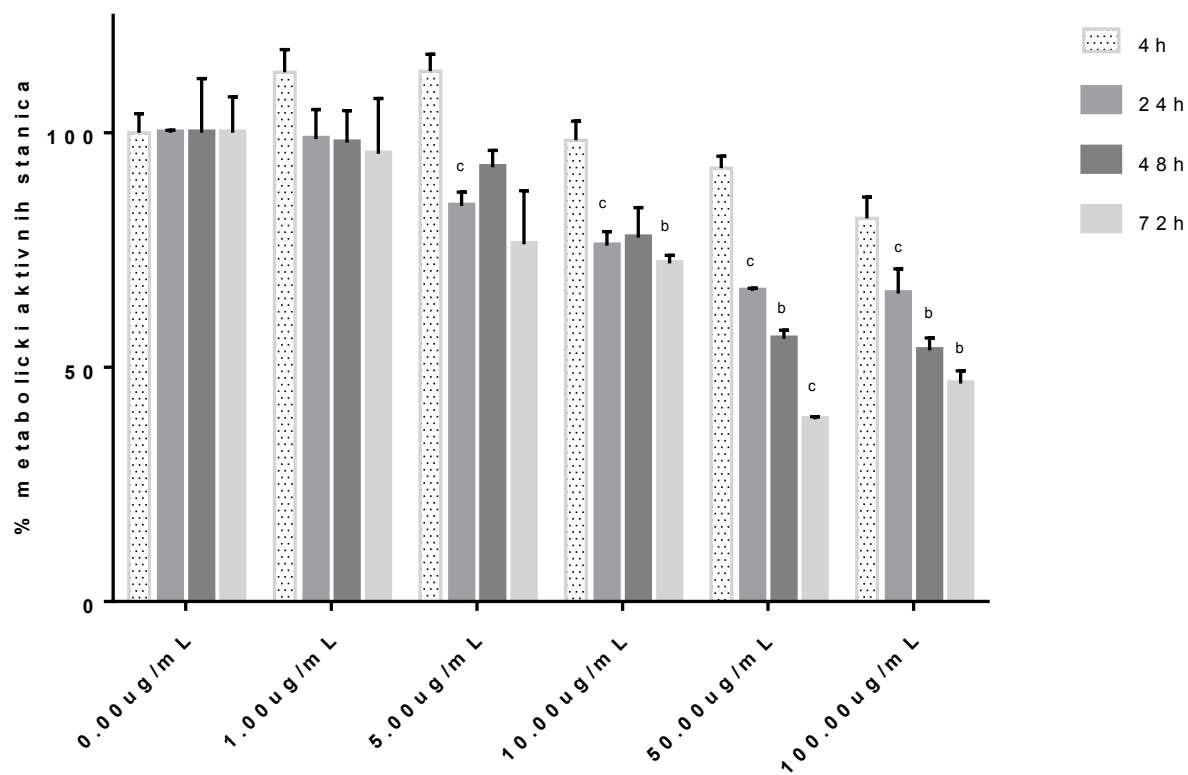
Slika 19. Citotoksična aktivnost ekstrakta *Lepidium meyenii* – žuta maca na staničnu liniju

MDA-MB-231

a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$; IC50, inhibitorna koncentracija 50; ND, ne može se odrediti

Ekstrakt žute mace pokazuje znatan citotoksičan učinak tek pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72 h inkubacije. IC50 vrijednost od 82,89 µg/mL ukazuje na umjerenu citotoksičnu aktivnost ekstrakta.

4.2.3. *LEPIDIUM MEYENII* EKSTRAKT – CRVENA MACA



MDA-MB-231	4 h	24 h	48 h	72 h
IC50 (µg/mL)	ND	ND	78, 32	38, 93

Slika 20. Citotoksična aktivnost ekstrakta *Lepidium meyenii* – crvena maca na staničnu liniju MDA-MB-231

a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$; IC50, inhibitorna koncentracija 50; ND, ne može se odrediti

Ekstrakt crvene mace pokazuje zamjetan citotoksičan učinak pri koncentracijama od 50 i 100 µg/mL. Najveći učinak zabilježen je pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 h inkubacije. IC50 vrijednost od 38,93 µg/mL nakon 72 h inkubacije ukazuje na umjerenu citotoksičnu aktivnost ekstrakta.

5. RASPRAVA

Rak je zajednički naziv za veliku skupinu bolesti koja može zahvatiti svaki dio tijela. Ono što je zajedničko svim vrstama raka jest stvaranje abnormalnih stanica koje nekontrolirano rastu i šire se po organizmu. Kada se ove stanice iz primarnog sijela prošire na druge dijelove tijela, govorimo o metastazama koje predstavljaju glavni uzrok smrti od raka. Uzrok raka su uglavnom mutacije naših vlastitih stanica u kombinaciji s vanjskim ili unutarnjim čimbenicima. Neki od čimbenika koji doprinose nastanku raka su fizikalni karcinogeni (ultraljubičasto i ionizirajuće zračenje), kemijski karcinogeni (npr. sastojci duhanskog dima, profesionalna izloženost) i biološki karcinogeni (infekcije virusima, bakterijama ili parazitima). Kao ostali čimbenici rizika navode se nezdrava prehrana, konzumacija alkohola, manjak tjelesne aktivnosti i starija životna dob (33).

Tijekom proteklih 50 godina došlo je do značajnog napretka u borbi s određenim oblicima raka. Primjerice, stopa preživljenja djece oboljele od leukemije povećala se s 10% na 80%. Međutim, načini liječenja ili produljenja remisije često su opasni i mukotrpniji za pacijenta. Usprkos velikom trudu koji znanstvenici ulažu u razumijevanje mehanizama nastanka raka, a samim time i u razvoj metoda liječenja, rak i dalje ostaje bolest s visokom stopom smrtnosti. Jedan od najvećih problema s kojima se susrećemo u liječenju raka jest mogućnost tumorskih stanica da zaobiđu mehanizme koji reguliraju stanični rast te njihova brza prilagodba na nove uvjete, čime ostvaruju nekontrolirani rast. S vremenom su otkriveni neki mehanizmi prilagodbe tumora i njihovog izbjegavanja imunološkog sustava pa se tako mnogi terapijski postupci i lijekovi temelje upravo na djelovanju na spomenute mehanizme (34).

Između 30 i 50% slučajeva raka može se spriječiti izbjegavanjem čimbenika rizika i redovitim sistematskim pregledima, odnosno ranom detekcijom. Kao vodeći uzrok smrti u svijetu, rak je odgovoran za 10 milijuna smrtnih slučajeva u 2020. godini. Rak dojke je najčešće dijagnosticirana vrsta raka, a broji 2,26 milijuna slučajeva, dok je rak pluća najčešći uzrok smrti kod oboljelih od ove bolesti s čak 1,8 milijuna smrtnih slučajeva (33).

Od spomenutih 2,26 milijuna slučajeva raka dojke u svijetu, 685 000 žena je umrlo. Povećanje stope preživljenja počelo je u osamdesetim godinama prošlog stoljeća kao rezultat provođenja nacionalnih programa ranog otkrivanja raka dojke, ali i napredaka u načinima liječenja. Rak dojke započinje rasti u epitelnim stanicama žljezdanog tkiva dojke te je početno lokaliziran na žljezdane vodove ili režnjeve i ne uzorkuje nikakve simptome. S vremenom dolazi do progresije bolesti i širenja, odnosno metastaziranja na okolno tkivo dojke te na limfne čvorove u blizini. Liječenje raka dojke može biti visokoučinkovito, naročito u slučaju ranog otkrivanja bolesti, a uključuje kombinaciju kirurškog uklanjanja, terapije zračenjem i lijekova. Kako bi se smanjila stopa smrtnosti od raka dojke, važno je kontinuirano provoditi javnozdravstvene kampanje za podizanje svijesti među ženama o znakovima i simptomima raka, podići svijest o važnosti rane detekcije i liječenja, samopregleda dojke i redovitih mamografskih pregleda (33).

Rak mokraćnog mjehura je četvrti najčešći dijagnosticirani rak kod muškaraca, a često obolijevaju i žene. Ova bolest uključuje cijeli spektar stanja, od rekurentnih neinvazivnih tumora do agresivnih ili uznapredovalih stadija bolesti koja zahtijevaju invazivna liječenja. Razvoju ove vrste raka doprinose ponajprije starija životna dob, muški spol i pušenje. Često se rak mokraćnog mjehura prezentira kao mikroskopska ili makroskopska hematurija. Razumijevanje bioloških procesa uključenih u nastanak i progresiju raka mokraćnog mjehura, dovelo je do značajnih napredaka u načinima dijagnosticiranja i liječenja. Osim konvencionalnih metoda liječenja, sve se više razvija imunoterapija koja djeluje inhibiranjem kritičnih točaka u staničnim signalnim putevima, ciljana terapija, kao i konjugati lijekova s antitijelima na proteine samog tumora. Od 2016. godine do danas, odobreno je pet novih lijekova, monoklonalnih protutijela koja djeluju na signalne puteve imunološkog sustava kako bi se potaknuo imunološki odgovor koji su stanice raka uspjele izbjeći (35).

Lepidium meyenii ili maca je biljka bogata brojnim sekundarnim metabolitima koji se smatraju odgovornima za njene antioksidativne, protuupalne, antimikrobne, citotoksične i imunomodulatorne učinke. Neki od bioaktivnih sastojaka uključuju alkaloidne, fenole (fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, tanine), steroide, glukozide, tanine i terpenoide. Ova biljka koristi se kao dodatak prehrani zbog svoje izuzetne nutritivne vrijednosti i medicinskih učinaka. Istraživanjima je dokazan povoljan utjecaj mace na spermatogenezu, plodnost žena, smanjenje

osteoporozu, kao i hepatoprotektivno djelovanje. Zbog svih navedenih učinaka, maca je predmet brojnih istraživanja kako bi se otkrili potencijalni novi lijekovi (36).

Moringa oleifera je biljka koja izvorno potječe iz Indije, ali se u posljednje vrijeme uzgaja diljem svijeta te tradicionalno koristi kao biljni lijek i bogat izvor nutrijenata. Brojna istraživanja potvrdila su razna povoljna djelovanja ove biljke, a neka od njih uključuju antimikrobno, antitumorsko, antioksidativno, kardioprotektivno, hepatoprotektivno i neuroprotektivno djelovanje. Vjeruje se da je sadržaj niza spojeva poput alkaloida, sterola, polifenola, masnih kiselina i glukozinolata odgovoran za učinke *Moringe* koji je svrstavaju u kategoriju superhrane (26).

Zbog navedenih učinaka, *Moringa* je tijekom posljednjeg desetljeća postala predmet mnogih istraživanja koja su uglavnom usmjerena na razumijevanje njenog farmakološkog djelovanja i mehanizama na kojima se pojedino djelovanje temelji. Također, ova biljka potencijalno bi mogla biti korisna u prevenciji i liječenju niza bolesti, uključujući upalne bolesti, dijabetes i rak (37).

Biljke iz porodice krstašica (Brassicaceae) bogate su izotiocijanatima koji nastaju kao sekundarni metaboliti hidrolizom glukozinolata. Ovi spojevi predmet su brojnih istraživanja zbog dokazane citotoksične aktivnosti. Citotoksično djelovanje posljedica je interferencije s metaboličkim reakcijama razgradnje toksina u organizmu pri čemu dolazi do njihove inaktivacije i izlučivanja iz organizma. Osim navedenog djelovanja, izotiocijanati inhibiraju mitozu, stimuliraju apoptozu stanica, inhibiraju angiogenezu i djeluju protuupalno (17, 19, 20).

Mnoge biljke bogate su spojevima iz grupe polifenola kojima se pripisuju brojni povoljni zdravstveni učinci. Neki od učinaka ovih spojeva su gastroprotekcija, snižavanje serumske razine kolesterola, stimulacija imunološkog odgovora, protuupalni, antioksidativni, kardioprotektivni, neuroprotektivni i antikancerogeni učinci. Istraživanjima je potvrđeno smanjenje ukupnog rizika za obolijevanje od raka kao posljedica konzumacije polifenola, no nije potvrđeno može li se unosom polifenola samo iz hrane postići sve navedene povoljne učinke na zdravlje (31). Neki od pretpostavljenih mehanizama antikancerogenog djelovanja polifenola uključuju njihovo djelovanje na stanične signalne puteve koji uključuju preživljenje, proliferaciju i diferencijaciju stanica, na

angiogenezu i utjecaj na imunološki odgovor. Kako bi se iskoristio potencijal ovih spojeva, potrebno je provesti daljnja istraživanja i randomizirana klinička ispitivanja (38).

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su ekstrakti biljnih vrsta *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii*, odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije humanih karcinoma: mokraćnog mjehura (T24) i dojke (MDA-MB-231).

Utjecaj na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 svih korištenih uzoraka je značajniji pri većim koncentracijama, od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najveći citotoksični učinak ima ekstrakt crvene mace pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 h inkubacije, s IC₅₀ vrijednosti od 17,57 µg/mL, što se smatra značajno aktivnim ekstraktom.

In vitro istraživanje na stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 pokazalo je umjerenu citotoksičnu aktivnost kod svih korištenih ekstrakata. Najveći učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica pokazao je ekstrakt *Moringa oleifera* pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 h inkubacije.

Na temelju dobivenih rezultata, vidljivo je da biljne vrste *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii* imaju potencijal za liječenje različitih bolesti, a osobito su važna njihova kemoprotektivna i antitumorska svojstva, koja smo u našem *in vitro* ispitivanju pokazali na stanicama karcinoma dojke i mokraćnog mjehura. Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica, tj. citotoksični učinak ovisi o koncentraciji ispitivanih uzoraka, odnosno spojeva, i vremenu izlaganja, te je glavna hipoteza potvrđena i ostvaren je cilj istraživanja. Potrebne su još dodatne *in vivo* studije koje će utvrditi njihove pozitivne učinke. Potrebno je i detaljno ispitivanje kemijskog sastava obiju biljaka kako bi se utvrdilo koji su kemijski spojevi nositelji citotoksičnog djelovanja. Saznanja koja bi se dobila navedenim ispitivanjima potencijalno bi omogućila korištenje ovih biljaka u terapiji različitih bolesti.

6. ZAKLJUČAK

- 1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i dojke (MDA-MB-231) uzorcima iz biljnih vrsta *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii* dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.
- 2) Ispitivani uzorci pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji.
- 3) Djelovanje uzoraka nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica.
- 4) Ispitivani uzorci iz biljne vrste *Moringa oleifera* najveći citotoksičan učinak pokazuju na MDA-MB-231 stanicama nakon 72 h inkubacije pri koncentraciji od 50 µg/mL.
- 5) Najznačajniji citotoksičan učinak pokazao je uzorak *Lepidium meyenii*, odnosno crvene mace, nakon 72 h inkubacije pri koncentraciji od 50 µg/mL, na T24 stanice.

7. LITERATURA

- 1) Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. 8. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 685-87, 697-04 str.
- 2) https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- 3) Chen S, Li F, Xu D, Fang W, Li Y. The function of RAS mutation in cancer and advances in its drug research. *Curr Pharm Des.* 2019;25(10):1105-14.
- 4) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9840/figure/A2650/>
- 5) Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 570-71, 645-47 str.
- 6) Vrdoljak E, Lovasić Belac I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 203, 205-13, 156-59 str.
- 7) Richters A, Aben KKH, Kiemeney LA. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol.* 2020;38(8):1895-04.
- 8) <https://en.wikipedia.org/wiki/Lepidium>
- 9) <https://www.plantea.com.hr/maca/>
- 10) Gonzales G, Gonzales C, Gonzales – Castaneda C. *Lepidium meyenii* (Maca): a plant from the highlands of Peru – from tradition to science. *Forsch Komplementmed.* 2009;16(6):373-80.
- 11) https://en.wikipedia.org/wiki/Lepidium_meyenii datum pristupa: 5.5.2021
- 12) Leitao Peres N, Cabrera Parra Bortoluzzi L, Medeiros Marques L, Formigoni M. Medicinal effects of Peruvian maca (*Lepidium meyenii*): a review. *Food funct.* 2020;11(1):83-2.
- 13) Gonzales G, Villaorduna L, Gasco M, Rubio J, Gonzales C. Maca (*Lepidium meyenii* Walp, a review of its biological properties). *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2014;31(1):100-10.
- 14) Sanchez – Salazar L, Gonzales GF. Aqueous extract of yellow maca (*Lepidium meyenii*) improves sperm count in experimental animals but response depends on hypocotyl size, pH and routes of administration. *Andrologia.* 2018. doi: 10.1111/and.12929.

- 15) Lee MS, Shin BC, Yang EJ, Lim HJ, Ernst E. Maca (*Lepidium meyenii*) for treatment of menopausal symptoms: A systematic review. *Maturitas*. 2011;70(3):227-33.
- 16) Pinela J, Carvalho AM, Ferreira ICFR. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*. 1. izdanje. Dublin: Elsevier; 2020. 197-19 str.
- 17) Troncoso Rojas R, Tiznado Hernandez ME. *Alternaria alternata* (Black rot, black spot). 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3.
- 18) Tomás-Barberán FA, Gil-Izquierdo A, Moreno DA. Bioavailability and metabolism of phenolic compounds and glucosinolates. 2009. doi: 10.1533/9781845696603.1.194.
- 19) Moreb N, Murphy A, Jaiswal S, Jaiswal AK. *Cabbage*. 2020. doi: 10.1016/B978-0-12-812780-3.00003-9.
- 20) Prieto MA, Lopez CJ, Gandara JS. Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Adv Food Nutr Res*. 2019;90:305-50.
- 21) <https://en.wikipedia.org/wiki/Moringa>
- 22) https://en.wikipedia.org/wiki/Moringa_oleifera
- 23) Abdull Razis AF, Ibrahim MD, Kntayya SB. Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(20):8571-6.
- 24) Islam Z, Rashadul Islam SM, Hossen F, Mahtab-ul-Islam K, Hasan R, Karim R. *Moringa oleifera* is a prominent source of nutrients with potential health benefits. *Int J Food Sci*. 2021. doi: 10.1155/2021/6627265.
- 25) Garcia – Beltran JM, Mansour Tageldein A, Alsaqufi Saud A, Ali HM, Angeles Esteban M. Effects of aqueous and ethanolic leaf extracts from drumstick tree (*Moringa oleifera*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, and their cytotoxic, antitumor, bactericidal and antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol*. 2020;106:44-45.
- 26) Dhakad AK, Ikram M, Sharma S, Khan Salman Pandey VV, Singh A. Biological, nutritional, and therapeutic significance of *Moringa oleifera* Lam. *Phytoter Res*. 2019;33(13):2870-03.

- 27) Watanabe S, Okoshi H, Yamabe S, Shimada M. *Moringa oleifera* Lam. In diabetes mellitus: A systematic review and meta – analysis. 2021. doi: 10.3390/molecules26123513.
- 28) Ali A, Garg P, Goyal R, Khan A, Negi P, Li X i sur. An efficient wound healing hydrogel based on a hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera* seeds. *Molecules*. 2021;26(12):3513.
- 29) Pappas IS, Siomou S, Bozinou E, Lalas SI. *Moringa oleifera* leaves crude aqueous extract down – regulates of BRCA1, mta-1 and oncogenes c – myc and p53 in AsPC – 1, MCF – 7 and HTC – 116 cells. *Food biosci*. 2021. doi: doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101221.
- 30) Luetragoon T, Sranujit RP, Noysang C, Thongsri Y, Potup P, Suphrom N i sur. Bioactive compounds in *Moringa oleifera* Lam. Leaves inhibit the pro – inflammatory mediators in lipopolysaccharide – induced human monocyte – derived macrophages. *Molecules*. 2020;25:191.
- 31) Cardona F, Andres – Lacueva C, Tulipani S, Tinahones J, Queipo – Ortuno MI. Benefits od polyphenols on gut microbiota and implications in human health. 2013. *J Nutr Biochem*. 2013;24(8):1415-22.
- 32) Farag A, Zhong Z, Zhang C, Yang Y, Wang S, Wang Y. Multifaceted role of phyto – derived polyphenols in nanodrug delivery systems. 2021. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;176:113870.
- 33) <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- 34) Hausman DM. What is cancer? *Perspect Biol and Med*. 2019;62:778-84.
- 35) Lenis TA, Lec PM, Chamie K. Bladder cancer; a review. *JAMA*. 2020;324(19):1980-91.
- 36) Carvalho FV, Ribeiro PR. Structural diversity, biosynthetic aspects, and LC-HRMS data compilation for the identification of bioactive compounds of *Lepidium meyenii*. *Food Res Int*. 2019;125:108615.
- 37) Kou X, Li B, Olayanju JB, Drake JM, Chen N. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*. 2018;10(3):343.

38) Zhou Y, Zheng J, Xu DP, Li S, Chen YM, Li HB. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*. 2016;8(8):515.

Cilj istraživanja:

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje biljnih vrsta *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii* na humane karcinomske stanice dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24). Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica nakon izlaganja uzorcima smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

Materijali i metode:

Ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama karcinoma dojke i mokraćnog mjehura rađeno je MTT metodom kojom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon tretiranja ekstraktima dobivenima autolizom. Uzorci biljaka pripremljeni su u pet različitih koncentracija (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL), a citotoksični učinak se određivao nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. Djelotvornost ekstrakata određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm.

Rezultati:

Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica. Kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24) svi uzorci ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Uzorak crvene mace pokazuje najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica nakon 72 h inkubacije pri koncentraciji od 50 µg/mL. Također, zabilježena je IC50 vrijednost od 17,57 µg/mL što se karakterizira kao značajno aktivan ekstrakt. Kod stanica karcinoma dojke, svi uzorci pokazali su umjerenu citotoksičnu aktivnost pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najznačajniji učinak pokazuje uzorak biljke *Moringa oleifera* pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 h inkubacije.

Zaključci:

In vitro izlaganje stanica karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) ekstraktima dobivenim iz biljnih vrsta *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii* dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak ovisan je o vremenu inkubacije i koncentraciji. Citotoksični učinak biljnih vrsta *Moringa oleifera* i *Lepidium meyenii*, ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen. Potvrđene učinke potrebno je ispitati *in vivo* na životinjskim modelima.

9. SUMMARY

The aim of the research:

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of *Moringa oleifera* and *Lepidium meyenii* plants on human carcinoma cells of breast (MDA-MB-231) and bladder (T24). The assumption is that number of carcinoma cells after the exposure to plant extracts will be reduced in comparison to the control group.

Material and methods:

The cytotoxicity was tested by the MTT method used to determine the percentage of metabolically active cells after exposure to plant extracts obtained by autolysis. Plant samples were prepared at five different concentrations (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL), and the effect is seen after 4, 24, 48 and 72 hours. The efficacy of the extracts was observed spectrophotometrically after measurement of absorbance at 570 nm

Results:

The results are graphically presented in relation to incubation times and the percentages of metabolically active cells. In bladder carcinoma cells all of the samples show better effects in higher concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL. The most prominent effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by red *Lepidium meyenii* sample after 24 hour incubation time in a concentration of 50 µg/mL. Also, IC₅₀ value of 17,57 µg/mL was detected, which is characterized as a very active extract. In breast cancer cells, all of the samples showed moderate cytotoxic activity at the higher concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL. The most significant effect was achieved by the sample of *Moringa oleifera* at a concentration of 50 µg/mL after 72-hour incubation time.

Conclusions:

In vitro exposure of human carcinoma cells of breast (MDA-MB-231) and bladder (T54) to extracts obtained from *Moringa oleifera* and *Lepidium meyenii* leads to reduced cell survival rate. Cytotoxic effect depends on incubation time and concentration. The cytotoxic effect of *Moringa oleifera* and *Lepidium meyenii* plants, which was the hypothesis of the research, is confirmed. Confirmed effects need to be examined *in vivo* on animal models.