

# Antiproliferativno djelovanje izolata crnog i bijelog češnjaka

---

**Prkić, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:171:354611>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



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

**Petra Prkić**

**ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE IZOLATA CRNOG I BIJELOG ČEŠNJAKA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**  
**2021./2022.**

**Mentor:**  
**izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2022.**

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

**Petra Prkić**

**ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE IZOLATA CRNOG I BIJELOG ČEŠNJAKA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**  
**2021./2022.**

**Mentor:**  
**izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijско-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 predložena na 74. sjednici vijeća studija Farmacija te odobrena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta i 14. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Sandra Marijan

### Antiproliferativno djelovanje izolata crnog i bijelog češnjaka

Petra Prkić, broj indeksa 215

#### Sažetak:

**Ciljevi:** Cilj ovog istraživanja je ispitati citotoksično djelovanje uzoraka bijelog i crnog češnjaka (*Allium sativum* L.) dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom na stanične linije humanog adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i humanog karcinoma mokraćnog mjehura T24. Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica, uspoređujući s kontrolom, smanjiti nakon izlaganja biljnim uzorcima.

**Materijali i metode:** Stanice su tretirane s uzorcima *A. sativum* L. dobivenim mikrovalnom ekstrakcijom (liofilizirani ostaci i mikrovalni ekstrakti bijelog i crnog češnjaka) u koncentraciji od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksična aktivnost odredila se MTT testom nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. Spektrofotometrom je dobivena apsorbancija na 570 nm koja je korištena za određivanje djelotvornosti uzoraka češnjaka.

**Rezultati:** Rezultati su prikazani grafički u odnosu koncentracije uzorka, vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica. Kod stanične linije MDA-MB-231, liofilizirani ostaci bijelog i crnog češnjaka pokazuju neznatan citotoksični učinak. Mikrovalni ekstrakti bijelog i crnog češnjaka pokazuju učinak ovisan o koncentraciji i vremenu izloženosti. Duljom inkubacijom ostvaruje se veće smanjenje broja metabolički aktivnih stanica, a najizraženiji učinak je pri koncentracijama od 50 i 100 µg/mL. Kod stanične linije T24, liofilizirani ostaci bijelog i crnog češnjaka pokazuju neznatan citotoksični učinak. Mikrovalni ekstrakti bijelog i crnog češnjaka pokazuju učinak u svim ispitivanim koncentracijama, ali najizraženiji je pri 50 i 100 µg/mL. Značajna citotoksičnost postiže se nakon inkubacije od 72 sata.

**Zaključci:** *In vitro* izlaganje staničnih linija humanih karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) uzorcima bijelog i crnog češnjaka uzrokuje smanjeno preživljavanje stanica. Citotoksični učinak ovisan je o koncentraciji i vremenu inkubacije. Učinkovitost je potvrđena za hlapljive spojeve sadržane u mikrovalnim ekstraktima, ali ne i za liofilizirane ostatke koji sadrže nehlapljive spojeve.

**Ključne riječi:** biljke, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda

**Rad sadrži:** 53 stranice, 10 slika, 3 tablice, 45 literaturnih referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |   |                    |
|---|--------------------|
| 1. prof. dr. sc. Anita Markotić           | član – predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Diana Gujinović           | član               |
| 3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić | član – mentor      |

**Datum obrane:** 14. listopada 2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici 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. 74 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14  
**Mentor:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD  
**Technical assistance:** Sandra Marijan, PhD

### **Antiproliferative effect of black and fresh garlic isolates**

Petra Prkić, index number 215

#### **Summary:**

**Objectives:** The aims of this diploma thesis were to investigate the cytotoxic effects of black and white garlic isolates from microwave extraction on breast cancer cell line MDA-MB-231 and bladder cancer cell line T24.

**Materials and methods:** The cells were treated with samples of *A. sativum* L. obtained by microwave extraction (lyophilized residues and microwave extracts of white and black garlic) at concentrations of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL. ml. Cytotoxic activity was determined by the MTT test after 4, 24, 48 and 72 hours of incubation. Absorbance at 570 nm was measured with a spectrophotometer, which was used to determine the effectiveness of garlic samples.

**Results:** The results are presented graphically in relation to sample concentration, incubation time and percentage of metabolically active cells. In the MDA-MB-231 cell line, lyophilized residues of white and black garlic show a slight cytotoxic effect. Microwave extracts of white and black garlic show an effect dependent on concentration and exposure time. Longer incubation results in a greater reduction in the number of metabolically active cells, and the most pronounced effect is at concentrations of 50 and 100 µg/mL. In the T24 cell line, lyophilized residues of white and black garlic show a slight cytotoxic effect. Microwave extracts of white and black garlic show an effect in all tested concentrations, but it is most pronounced at 50 and 100 µg/mL. Significant cytotoxicity is achieved after 72 hours of incubation.

**Conclusions:** In vitro exposure of human breast (MDA-MB-231) and bladder (T24) carcinoma cell lines to samples of white and black garlic causes decreased cell survival. The cytotoxic effect depends on the concentration and incubation time. Efficacy has been confirmed for volatile compounds contained in microwave extracts, but not for lyophilized residues containing non-volatile compounds.

**Key words:** plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay

**Thesis contains:** 53 pages, 10 figures, 3 tables, 45 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

- |  |                     |
|--|---------------------|
| 1. Prof. Anita Markotić, PhD             | Chair person        |
| 2. Asst. prof. Diana Gujinović, PhD      | Member              |
| 3. Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD | Member - Supervisor |

**Defense date:** October 14<sup>th</sup>, 2022

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited** in Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## SADRŽAJ

### ZAHVALA

### POPIS KRATICA

1.UVOD.....	1
1.1.Zloćudna novotvorina .....	2
1.2.Molekularna patologija novotvorina .....	2
1.3.Epidemiologija.....	3
1.4.Rak dojke.....	4
1.4.1.Epidemiologija i etiologija .....	4
1.4.2.Patohistologija.....	5
1.4.3.Klinička slika i dijagnostika .....	6
1.4.4.Liječenje .....	7
1.5.Rak mokraćnog mjehura.....	9
1.5.1.Epidemiologija i etiologija .....	9
1.5.2.Patohistologija.....	10
1.5.3.Klinička slika i dijagnoza .....	11
1.5.4.Liječenje .....	12
1.6.Porodica <i>Amaryllidaceae</i> .....	13
1.7. <i>Allium sativum</i> L. ....	13
1.7.1.Kemijski sastav .....	14
1.7.2.Dodaci prehrani.....	15
2.CILJ ISTRAŽIVANJA .....	18
2.1.Hipoteza.....	20
3.MATERIJALI I METODE .....	21
3.1.Stanične linije .....	22
3.2.Biljni materijali .....	24
3.2.1. <i>Allium sativum</i> L. ....	24
3.3.Metoda izolacije.....	25
3.4.Postupak .....	26
3.4.1.Stanična kultura.....	26
3.4.2.Određivanje broja živih stanica u kulturi .....	26
3.4.3.Tretiranje stanica raka uzorcima bijelog i crnog češnjaka .....	27

3.4.4. Test citotoksične aktivnosti .....	27
3.5. Statistička analiza.....	27
4. REZULTATI.....	28
4.1. Stanična linija MDA-MB-213 .....	29
4.1.1. <i>Allium sativum</i> L., liofilizirani ostatak bijelog ili svježeg češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije.....	29
4.1.2. <i>Allium sativum</i> L., liofilizirani ostatak crnog ili fermentiranog češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije .....	30
4.1.3. <i>Allium sativum</i> L., mikrovalni destilat bijelog ili svježeg češnjaka .....	31
4.1.4. <i>Allium sativum</i> L., mikrovalni destilat crnog ili fermentiranog češnjaka.....	32
4.2. Stanična linija T24 .....	33
4.2.1. <i>Allium sativum</i> L., liofilizirani ostatak bijelog ili svježeg češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije.....	33
4.2.2. <i>Allium sativum</i> L., liofilizirani ostatak crnog ili fermentiranog češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije .....	34
4.2.3. <i>Allium sativum</i> L., mikrovalni destilat bijelog ili svježeg češnjaka .....	35
4.2.4. <i>Allium sativum</i> L., mikrovalni destilat crnog ili fermentiranog češnjaka.....	36
5. RASPRAVA .....	37
6. ZAKLJUČCI .....	40
7. LITERATURA.....	42
8. SAŽETAK .....	48
9. SUMMARY .....	50
10. ŽIVOTOPIS .....	52

## **ZAHVALA**

*Hvala izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić i dr. sc. Sandri Marijan, predivnim osobama, na poklonjenom vremenu, uloženom trudu i svakom izrečenom savjetu.*

*U riječi ne stane zahvalnost koju osjećam prema svojim roditeljima. Majko, oče, pomogli ste mi da izgradim sebe i prihvatim druge. Pomoću vas, svaka borba prijeđe u ljubav.*

*Hvala mom Josipu koji razumi i voli na svoj način, poseban i predivan.*

*Uvijek blizu, moja sestra, vrijedi više od svega.*

*Hvala Duškencu koji se toliko odricao, iako ništa nije razumio.*

*Domagoj, hvala ti za sve – prošlost, sadašnjost i budućnost.*



## POPIS KRATICA

AGE – ekstrakt crnog češnjaka (engl. *Aged Garlic Extract*)

AJCC – Američko udruženje za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*)

BRCA – engl. *BReast CAncer gene*

CRP – C-reaktivni protein

CT – kompjuterizirana tomografija (engl. *Computerized Tomography*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

DADS – dialil-disulfid

DAS – dialil-sulid

DATS – dialil-trisulfid

DMEM – Dulbecco modificirani Eagleov medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO – dimetil-sulfoksid

ER – estrogenski receptor

EU-27 – Europska unija

FBS – fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

GC-MS – plinska kromatografija-masena spektroskopija (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

GSAC –  $\gamma$ -glutamil-S-alil-L-cistein

HER2 – receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2

MRI – magnetska rezonancija (engl. *Magnetic Resonance Imaging*)

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid

OSC – organski spojevi sumpora

PR – progesteronski receptor

PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate-Buffered Saline*)

TNF- $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor alpha*)

TP53 – gen koji kodira tumorski protein 53

TP53 – tumorski protein 53

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

## **1. UVOD**

## 1.1. Zloćudna novotvorina

Novotvorina ili tumor patološka je tvorba koja rastom nadmašuje okolno zdravo tkivo šireći se nesvrhovito i autonomno. Takvom nekontroliranom rastu prethodi neoplastična pretvorba, odnosno nasljedna genetska promjena (1). Tumor nastaje transformacijom jedne stanice koja potom nenormalno proliferira, što objašnjava svojstvo klonalnosti tumora. Postepeno se događaju nove mutacije i klonovi najotpornijih ili najagresivnijih stanica postaju dominantni (2). Zloćudna ili maligna novotvorina razara tkivo u kojem je nastala, širi se u okolna tkiva i druge dijelove tijela krvlju ili limfom, što je veže uz nepovoljan klinički ishod. Nerijetko recidivira nakon operacije zbog zahtjevnosti potpunog kirurškog uklanjanja. Dobroćudna ili benigna novotvorina ne utječe znatno na zdravlje i ima povoljniju prognozu (1).

Proučavanje tumorskih stanica temelji se na promjenama koje su nastale, dakle razgraničavanju normalnih i neoplastičnih stanica. Transformirane stanice imaju promijenjen stanični metabolizam i sposobnost izbjegavanja apoptoze (programirane stanične smrti), imunološkog nadzora i signala koji usporavaju staničnu proliferaciju i rast. Takve stanice imaju konstantan poticaj na proliferaciju uz svojstvo besmrtnosti zbog sprječavanja skraćivanja kromosoma. Kisik i hranjive sastojke osiguravaju poticanjem izgradnje novih krvnih žila (1).

## 1.2. Molekularna patologija novotvorina

Promjena u genetskom materijalu stanice koja nije pravovremeno uočena ili ispravljena vodi k nastanku tumorskog tkiva (1).

Protoonkogeni su geni uključeni u regulaciju proliferacije i rasta stanica pod nadzorom endogenih i egzogenih kontrolnih mehanizama. Protoonkogeni kodiraju čimbenike rasta, receptore za čimbenike rasta, signalne molekule, molekule vezane na DNK i regulatore mitotičkog ciklusa. Mutirani ili nenormalno eksprimirani navedeni geni nazivaju se onkogeni (1, 3).

Tumor-supresorski geni su geni koji zaustavljaju proliferaciju stanice, dakle imaju antionkogeni funkciju. Stanica se transformira u tumorsku kada ovi geni prestanu obavljati svoju funkciju zbog mutacije ili se izgube delecijom (1).

U većini humanih tumora nalazi se mutacija *TP53* ili gena koji određuju njegovu ekspresiju što naglašava važnost regulacije staničnog ciklusa. TP53 transkripcijski je faktor koji blokira početak replikacije DNK ako postoji njezino oštećenje, sve dok se ono ne ispravi, no ako je riječ o nepopravljivom defektu aktivira se apoptoza ili starenje i sprječava opstanak potencijalno opasne stanice. Izbjegavanje apoptoze zaslužno je za smanjen terapijski uspjeh zračenja ili lijekova koji oštećuju DNK na tumorske stanice bez TP53 (3). Specifične nasljedne mutacije u tumor-supresorskim genima *BRCA-1* i *BRCA-2* koji kodiraju proteine važne za popravak oštećene DNK, povećavaju rizik razvoja raka dojke i jajnika (4).

Tumorska stanica s mutacijom u genima koji kodiraju proteine zadužene za regulaciju apoptoze, ne pokazuje povećanu mitotičku aktivnost nego produljeno preživljavanje (1).

### 1.3. Epidemiologija

Zloćudni tumor ili rak kao jedan od vodećih uzroka smrti u svijetu predstavlja globalni javnozdravstveni problem. Godišnje od raka premine 10 milijuna ljudi, od kojih 70 % potječe iz zemalja s nisko do umjereno visokim dohotkom (5). Muškarcima u 2020. godini najčešće su dijagnosticirani rak pluća (14,3 %) i rak prostate (14,1 %), a najveću smrtnost uzrokovao je rak pluća (21,5 %). Rak koji je u 2020. godini imao najveću učestalost (24,5 %) i smrtnost (15,5 %) u ženskoj populaciji je rak dojke. Rak pluća usmrtio je 13,7 % oboljelih žena iste godine (6).

Tijekom 2020. godine 2,7 milijuna stanovnika Europske unije oboljelo je od zloćudnog tumora, a 1,3 milijuna zbog njega preminulo uključujući 2000 mladih ljudi. Strategija Europske komisije usmjerena je na prevenciju novotvorina obzirom da se njezin nastanak može spriječiti u približno 40 % slučajeva pravovremenom promjenom životnih navika, odnosno promjenjivih faktora rizika, kao što su pušenje, konzumacija alkohola, dijeta i fizička aktivnost. Smatra se da će izostanak adekvatnih mjera povećati broj oboljelih za 24 % do 2035. godine, što će rak postaviti na mjesto vodećeg uzroka smrti u Europskoj uniji (7).

U Republici Hrvatskoj zabilježena su 25 352 nova slučaja zloćudnih bolesti 2019. godine i iste godine od raka umrle su 13 344 osobe. U muškaraca najzastupljeniji je rak prostate i zauzima 20 % od ukupnog broja novodijagnosticiranih slučajeva u toj populaciji, a u žena rak dojke u 25 % novih slučajeva. Najveća stopa smrtnosti zabilježena je za rak traheje, bronha i pluća u oba spola (8).

## 1.4. Rak dojke

### 1.4.1. Epidemiologija i etiologija

Rak dojke nadmašio je rak pluća kao najčešće dijagnosticirani rak u svijetu 2020. godine, s preko 2,26 milijuna novih slučajeva (11,7 % svih zloćudnih tumora u svijetu) (6). Broj žena, izražen dobno standardiziranom stopom, s novootkrivenim zloćudnim tumorom dojke u 2020. godini, na području EU-27 iznosi 355 457 što odgovara incidenciji od 142,8, a na istom području tijekom iste godine od raka dojke umrlo je 91 826 žena. Najveći broj novih slučajeva na 100 000 stanovnika zabilježen je u Belgiji, a najveća smrtnost u Slovačkoj (9). U Republici Hrvatskoj zabilježeno je 2 999 novih slučajeva i umrle su 752 žene, u skladu s čim se rak dojke nalazi na prvom mjestu po incidenciji (143,2) i drugom po smrtnosti u ovoj populaciji (8). Inicijalno se postavlja dijagnoza uznapredovalog ili metastatskog tumora u između 5 i 10 % novootkrivenih slučajeva, no rano otkriveni rak može se razviti u uznapredovali ili metastatski u trećine oboljelih (10).

Učestalost raka dojke porasla je nakon uvođenja mamografskog probira i nastavlja rasti sa starenjem stanovništva. Najvažniji čimbenici rizika su genetska predispozicija, stupanj gustoće tkiva dojke, anamneza atipičnih hiperplazija, izloženost estrogenima, ionizirajuće zračenje i dob (11). Preventivne globalne mjere usmjerene su na promjenu životnih navika koje su s etiologijom zloćudnih novotvorina dojke vjerojatno povezane putem hormonalnih mehanizama. Procjenjuje se da je 25 % slučajeva raka dojke u svijetu povezano s prekomjernom tjelesnom težinom i sjedilačkim načinom života te epidemiološke studije pokazuju da žene koje se bave tri – četiri sata tjedno, umjerenom ili zahtjevnijom tjelesnom aktivnošću imaju 30 – 40 % manji rizik za njegov razvoj. Također, pretila žene imaju 50 – 250 % veći rizik od obolijevanja u postmenopauzi. Konzumacija alkohola, čak i u umjerenim količinama (dva pića dnevno) povećava rizik od raka dojke u predmenopauzi i postmenopauzi (12).

Rak dojke zauzima približno jedan posto svih zloćudnih tumora u muškaraca, dakle rijetko se dijagnosticira. Klinički poremećaji koji uzrokuju hormonsku neravnotežu, izloženost zračenju, pozitivna obiteljska anamneza i genetska predispozicija glavni su čimbenici rizika za njegov razvoj u ovoj populaciji (11).

#### 1.4.2. Patohistologija

Rak dojke naziv je za skupinu heterogenih tumora s različitim kliničkim karakteristikama, tijekom bolesti i odgovorom na specifične tretmane. Značajke svojstvene tumoru koriste se za klasičnu histološku i imunopatološku klasifikaciju, kao i novije opisane molekularne podtipove (13).

Klasična patologija razdvojila je tumore dojke u više kategorija na temelju njihove morfologije i strukturne organizacije (13). Histološko podrijetlo tumora dojke može biti stroma ili epitel, a zloćudni tumor koji potječe iz epitelnih stanica dojke, prema definiciji, naziva se adenokarcinom (14). Lokalizirani lobularni karcinom (*in situ*) slučajan je mikroskopski nalaz abnormalnog rasta stanica u režnjevima tkiva dojke i povezan je s povećanim rizikom od naknadnog invazivnog raka u obje dojke za približno 7 % tijekom 10 godina. Međutim, lokalizirani duktalni karcinom (*in situ*) kojeg karakteriziraju abnormalne stanice u mliječnom kanaliću tkiva dojke može napredovati do invazivnog raka dojke (15).

Najčešće opaženi i prijavljeni su invazivni karcinom dojke nespecificiranog tipa (prethodno zvan duktalni karcinom; 70 – 75 % slučajeva) i lobularni karcinom (12 – 15 % slučajeva). Ostalih 18 podtipova je rijetko (1,5 – 5 % slučajeva) i pokazuju specifične morfološke osobine (11). Histološka klasifikacija povezana je s prognozom, a prisutnost specifičnih tumorskih markera i s identifikacijom tumora osjetljivih na ciljano liječenje. Glavni markeri su estrogenski receptor (ER), progesteronski receptor (PR) i receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2), a određuju se imunohistokemijski (13).

Razvoj genske tehnologije početkom 21. stoljeća potvrdio je povezanost između prirodne progresije tumora dojke u svake žene i genske ekspresije tumorskih stanica što je dovelo do nove molekularne klasifikacije koja se pokazala učinkovitijom od anatomske, u vidu individualizacije terapije i prognoze (16). Molekularni podtipovi djelomično rekapituliraju izvorne imunopatološke klase osiguravajući dodatnu razinu informacija (13).

### 1.4.3. Klinička slika i dijagnostika

Simptomi koji se mogu uočiti na tumorski promijenjenom tkivu dojke su kvržica, bol, abnormalnost kože ili oblika i abnormalnost bradavice, no mogući su i drugi simptomi poput umora, otežanog disanja, aksilarnih promjena, kvržice na vratu i boli u leđima (17).

Dijagnoza raka dojke temelji se na kliničkom pregledu u kombinaciji sa snimanjem i potvrđuje patološkom procjenom. Klinički pregled uključuje bimanualnu palpaciju dojki i regionalnih limfnih čvorova te procjenu udaljenih metastaza (kosti, jetra i pluća; neurološki pregled samo uz prisutnost simptoma). Snimanje uključuje bilateralnu mamografiju te ultrazvuk dojke i regionalnih limfnih čvorova. Magnetska rezonancija (MRI) nije rutinski preporučena, ali u određenim slučajevima treba se razmotriti. Osim snimanja, procjena bolesti prije početka liječenja uključuje patološki pregled primarnog tumora i citologiju/histologiju aksilarnih čvorova, ako se sumnja na zahvaćenost. Konačnu patološku dijagnozu treba postaviti prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i osmom izdanju *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* TNM sustava. Ovaj sustav, uz anatomske podatke, uključuje i prognostičke informacije koje se odnose na biologiju tumora (11).

Cilj probira raka dojke je smanjenje smrtnosti i morbiditeta, povezanih s uznapredovalim stadijem bolesti, ranom detekcijom u asimptomatskih žena. U tu svrhu najčešće se koristi mamografija koja kao probirna tehnika pokazuje čistu korist za žene od 50 do 69 godina, a preporuka je da se izvodi svake godine ili svako dvije godine. Klinički pregled u kombinaciji s mamografijom povećava stopu otkrivanja raka dojke za od 5 do 10 % u usporedbi sa samom mamografijom (18). Žene s obiteljskom anamnezom raka dojke, s ili bez dokazanih *BRCA* mutacija, godišnjim probirom na rak dojke magnetskom rezonancijom (MRI) u kombinaciji s mamografijom mogu otkriti bolest u povoljnijem stadiju u usporedbi sa samom mamografijom (70 % manji rizik od dijagnoze raka dojke II ili višeg stadija) (11). Uvođenje mamografije značajno je poboljšalo tri glavna histološka prognostička čimbenika: veličinu tumora, status aksilarnog limfnog čvora i histološki stupanj malignosti (19).



#### 1.4.4. Liječenje

Liječenje raka dojke temelji se na lokalnoj kontroli (operaciji) s ili bez sistemske terapije koja uključuje hormonsku terapiju, citotoksičnu kemoterapiju, imunoterapiju i ciljanu terapiju. Općenito, sistemska terapija se pokazala korisnom u približno 90 % primarnih zloćudnih tumora dojke i 50 % metastatskih slučajeva. Međutim, ponekad tumorsko tkivo s vremenom razvija otpor na početno uspješnu terapiju i nastavlja napredovati. Postoji sve veća potreba za identifikacijom, usavršavanjem i validacijom prognostičkih i prediktivnih čimbenika kako bi se liječenjem osigurala najveća moguća koristi i najmanja šteta (20). Sistemska terapija je ključni čimbenik u smanjenju smrtnosti od raka dojke (16).

Lokalizirani lobularni karcinom zahtijeva strogi nadzor liječnika, ali lokalna i sistemska terapija nisu indicirane. Standardna terapija lokaliziranog dukalnog karcinoma je poštena operacija dojke nakon koje slijedi terapija zračenjem, no u određenim slučajevima može se preporučiti mastektomija. U ranim fazama invazivnog karcinoma prednost se daje poštenoj operaciji u pacijentica, koje nemaju vrlo visok rizik od lokalnog recidiva, kojom se uklanja tumorsko tkivo bez odstranjivanja zdravog tkiva dojke, što je pacijenticama estetski prihvatljivije od ishoda radikalne mastektomije. Terapija zračenjem nakon operacije smanjuje lokalni recidiv i osigurava stope preživljavanja ekvivalentne onima s mastektomijom. Status aksilarnih limfnih čvorova određuje potrebu za radioterapijom i adjuvantnom sustavnom terapijom. Većina žena s ranim stadijem raka dojke prima adjuvantnu sistemska terapiju koja poboljšava lokalnu terapiju značajno smanjujući recidiv raka i smrt specifičnu za bolest (15). Uznapredovali rak dojke uključuje inoperabilni lokalno uznapredovali i metastatski rak dojke, neizlječive bolesti s medijanom ukupnog preživljenja od oko tri godine (21). Lokalno uznapredovali rak liječi se indukcijskom kemoterapijom uz koju 75 % pacijentica ima smanjenje veličine tumora veće od 50 %, zatim slijedi lokalna terapija (kirurgija, radioterapija ili obje). Indukcijska endokrina terapija pokazuje manju učinkovitost, no lokalno uznapredovali rak pozitivan na hormonske receptore najbolje odgovara na kombiniranu indukcijsku kemoterapiju i hormonsku terapiju nakon operacije. U metastatskom tumoru radioterapija ili bifosfonati u kombinaciji s endokrinom terapijom ili kemoterapijom mogu ublažiti bol izazvanu koštanim komplikacijama. Sustavno liječenje ovisi o statusu hormonskih receptora, brzini progresije bolesti i podnošljivosti liječenja (15).

Prisutnost ER-a koristi se za identifikaciju tumora pogodnih za antiestrogensku terapiju uključujući antagoniste ER i inhibitore aromataze. Približno 40 % ER pozitivnih tumora je PR negativno, a povezuju se s manjom osjetljivošću na liječenje od ER+/PR+ tumora, također ER–/PR+ fenotip iznimno je rijedak i u većini slučajeva uzrokovan laboratorijskom pogreškom ili lažno negativnim očitanjem ER ili lažno pozitivnim PR očitanjem (20, 13). Endokrina terapija primarna je terapija u niskorizičnom tumoru s pozitivnim hormonskim receptorima, dok se i endokrina terapija i kemoterapija koriste u visokorizičnom slučaju te sama kemoterapija za rak s negativnim hormonskim receptorima (20). Tumor s pozitivnim HER2 nalazom liječi se ciljanom terapijom kao što je monoklonsko protutijelo trastuzumab koje se veže na ovaj receptor i remeti o njemu ovisnu signalizaciju. Trenutačno ne postoji standardna ciljana terapija za rak dojke koji je imunohistokemijski definiran kao ER negativan i HER negativan. S prognostičkog stajališta najbolji ishod ima ER pozitivni rak dojke (13). Zbog iznimne važnosti, kvaliteta procjene receptora pomno je ispitana u multicentričnim studijama koje su ukazale na do 20 % pogrešnih klasifikacija (22).

## 1.5. Rak mokraćnog mjehura

### 1.5.1. Epidemiologija i etiologija

Rak mokraćnog mjehura prema globalnoj incidenciji 2020. godine nalazi se na šestom mjestu u muškaraca i 17. mjestu u žena. Češći je u razvijenim zemljama, a zbog svoje relapsne prirode predstavlja ogroman teret za zdravstveni sustav (6, 23). Broj osoba, izražen dobno standardiziranim stopom, s novootkrivenim zloćudnim tumorom mokraćnog mjehura u 2020. godini, na području EU-27 iznosi 157 484 što odgovara incidenciji od 58,9 za muškarce i 13,4 za žene, najvećom u Grčkoj. Na istom području, tijekom iste godine od raka mokraćnog mjehura umrlo je 49 185 osoba s najvećom stopom smrtnosti u Slovačkoj (9). U Republici Hrvatskoj 2019. godine rak mokraćnog mjehura otkriven je 721 muškarcu (5 % zloćudnih tumora muškaraca) i 250 žena (2 % zloćudnih tumora žena) i od istog umrlo je 330 muškaraca (8).

Čimbenici rizika mogu se razdvojiti u dvije skupine: naslijeđenu genetsku predispoziciju i izloženost vanjskim faktorima. Kako je većina tumora mokraćnog mjehura povezana sa izloženošću karcinogenima, njihovo izbjegavanje moglo bi značajno smanjiti učestalost bolesti, a pokazalo se najučinkovitijim u smanjenju smrtnosti. Pušenje predstavlja najvažniji čimbenik rizika za urotelni karcinom mokraćnog mjehura i povezuje se s 50 % slučajeva. Razlika u incidenciji među spolovima često se pripisuje različitim povijesnim obrascima pušenja, no trenutačno je prevalencija pušenja slična u oba spola i incidencija raka mokraćnog mjehura opada u muškaraca i raste u žena. Drugi najvažniji čimbenik, koji se povezuje s približno 20 % urotelnih karcinoma, profesionalna je izloženost karcinogenima kao što su aromatski amini, policiklički aromatski ugljikovodici i klorirani ugljikovodici. Poduzete sigurnosne mjere posljednjih godina značajno su utjecale na izloženost ovim spojevima (23).

Urotelni karcinom može nastati zbog izlaganja ionizirajućem zračenju i farmaceutskim agensima. Ciklofosfamid alkilirajuće je sredstvo koje se uglavnom koristi u terapiji limfoma i leukemije, a njegova upotreba uz natrijev 2-merkaptotetan-sulfat (mesna) smanjuje rizik razvoja urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura. Pioglitazon je antidijabetik iz skupine tiazolidindiona koji može povećati rizik razvoja raka mokraćnog mjehura ovisno o dozi i vremenu izloženosti, zato bolesnike, koji dugotrajno uzimaju visoke doze, treba redovito nadzirati (23, 24).

Kronične infekcije mokraćnog sustava i infekcija parazitom *Schistosoma haematobium* povezane su s povećanim rizikom od raka mokraćnog mjehura, često karcinoma pločastih (skvamoznih) stanica (25).

### 1.5.2. Patohistologija

Većina zloćudnih tumora mokraćnog mjehura nastaje preobrazbom prijelaznog epitela i naziva se karcinomima prijelaznih stanica ili urotelnim karcinomima, a mogu biti niskog ili visokog gradusa. Rak niskog gradusa često se ponovno javlja u mokraćnom mjehuru nakon liječenja, ali rijetko napada mišićnu stjenku ili se širi drugdje po tijelu za razliku od raka mokraćnog mjehura visokog gradusa. Također, rak mokraćnog mjehura dijeli se na mišićnoinvazivnu i nemišićnoinvazivnu bolest ovisno o invaziji muskularis proprije (odnosno mišića detruzora). U uvjetima kronične upale može doći do skvamozne metaplazije, odnosno patološke preobrazbe zrele stanice mokraćnog mjehura u zrelu pločastu stanicu koja u ovom tkivu u normalnim uvjetima nije prisutna. Osim karcinoma prijelaznih stanica i karcinoma skvamoznih stanica, u mokraćnom mjehuru mogu nastati adenokarcinomi, karcinomi malih stanica i sarkomi. U više od 90 % slučajeva riječ je o karcinomima prijelaznih stanica, od 2 do 7 % slučajeva odnosi se na karcinome skvamoznih stanica i 2 % otpada na adenokarcinome. Patološki gradus urotelnih karcinoma od velike je prognostičke važnosti (25).

Obzirom na načinu rasta tumorskog tkiva, rak mokraćnog mjehura dijeli se na papilarni i ravni oblik. Papilarni karcinomi rastu u tankim izbočinama poput prstiju od unutrašnje površine mokraćnog mjehura prema njegovoj šupljini. Ravni tumor ne raste prema šupljem dijelu, a ako zahvaća samo stanice unutarnjeg sloja mokraćnog mjehura naziva se neinvazivan ravni karcinom ili karcinom *in situ* (26).

### 1.5.3. Klinička slika i dijagnostika

Rak mokraćnog mjehura obično se manifestira pojavom krvi u mokraći vidljive golim okom (makrohematurija) ili isključivo mikroskopom (mikrohematurija). Pacijenti se rjeđe žale na učestalo mokrenje, nokturiju (noćno mokrenje) i disuriju (bolno mokrenje), simptome koji su češći u bolesnika s karcinomom *in situ* (25).

Najkorisnija dijagnostička pretraga kod sumnje na rak mokraćnog mjehura je cistoskopija i ako se rak uoči cistoskopijom zakazuje se bimanualni pregled pod anestezijom i transuretralna resekcija i/ili biopsija. Ako je riječ o raku visokog gradusa ili invazivnom raku snima se abdominopelvični CT i radiogram ili CT prsnog koša. Urotelni karcinomi često su multifokalni pa je potrebno procijeniti cijeli urotel ako se pronađe tumor. Snimanje gornjeg dijela mokraćnog sustava ključno je za određivanje stadija i nadzor u bolesnika s rakom mokraćnog mjehura, a može se vršiti ureteroskopijom, retrogradnom pijelografijom tijekom cistoskopije, intravenskom pijelografijom ili kompjuteriziranom tomografijom (CT) mokraćnog sustava (25).

Cistoskopija i snimanje imaju ograničenu osjetljivost u otkrivanju malih lezija pa se u tim slučajevima oslanja na citologiju mokraće, neinvazivan test za otkrivanje i nadzor raka mokraćnog mjehura. Unatoč visokoj specifičnosti (približno 86 %), citologiju urina ograničava niska osjetljivost (48 %) posebno za tumore niskog gradusa stoga je Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila šest načina analize mokraće za poboljšanje dijagnostike i nadzora raka mokraćnog mjehura, međutim takvi testovi nisu dovoljno osjetljivi i često daju lažno pozitivne rezultate u benignim stanjima (27).

Približno je 75 % novodijagnosticiranih urotelnih karcinoma neinvazivno i imaju visoku stopu recidiva i progresije unatoč lokalnoj terapiji. Preostalih 25 % karakterizira mišićna invazija i loš ishod unatoč sistemskoj terapiji (23). Pacijenti, koji umru od raka mokraćnog mjehura, gotovo uvijek imaju bolest koja je metastazirala iz mjehura u druge organe. Otprilike od 70 do 80 % pacijenata s novodijagnosticiranim rakom mokraćnog mjehura ima površinske tumore mokraćnog mjehura (tj. stadij Ta, Tis ili T1). Prognoza ovih bolesnika uvelike ovisi o gradusu tumora. Pacijenti s tumorima visokog gradusa imaju značajan rizik od smrti i ako nije riječ o mišićnoinvazivnom tipu (25).

#### 1.5.4. Liječenje

Rak mokraćnog mjehura visokog gradusa liječi se agresivnije od raka mokraćnog mjehura niskog gradusa i mnogo je vjerojatnije da će rezultirati smrću. Površinski nemišićnoinvazivni rak visokog gradusa obično se može izliječiti, a mišićnoinvazivni tek ponekad (25).

Liječenje nemišićnoinvazivnog raka temelji se na stratifikaciji rizika. Svi pacijenti inicijalno se podvrgavaju transuretralnoj resekciji nakon koje slijedi instilacija intravezikalne kemoterapije (uvođenjem katetera u mokraćni mjehur). Tumori s niskim rizikom recidiva ili progresije zahtijevaju praćenje, dok se za one sa srednjim ili visokim rizikom progresije u mišićnoinvazivnu bolest obično najmanje jednu godinu koristi intravezikalni tretman s BCG-om (*bacille Calmette-Guérin*) uz nadzor zbog mogućih recidiva. Dodatna intravezikalna kemoterapija obično se koristi za tumore s visokim rizikom recidiva, ali niskim rizikom progresije u mišićnoinvazivnu bolest (25).

Standardna terapija pacijenata s mišićnoinvazivnim rakom obuhvaća uvodnu kemoterapiju temeljenu na cisplatinu nakon koje slijedi radikalna cistektomija (odstranjivanje mjehura i susjednih struktura) i diverzija mokraće ili terapija zračenjem uz istodobnu kemoterapiju. Ostali pristupi liječenju uključuju radikalnu cistektomiju praćenu kemoterapijom na bazi cisplatina, radikalnu cistektomiju bez perioperativne kemoterapije, radioterapiju bez kemoterapije, parcijalnu cistektomiju s ili bez perioperativne kemoterapije (25).

## 1.6. Porodica *Amaryllidaceae*

*Amaryllidaceae* (sunovrati), porodica višegodišnjih biljaka iz reda Asparagales i razreda jednosupnica, sadrži 73 roda i preko 1 600 vrsta rasprostranjenih prvenstveno u tropskim i suptropskim područjima. Dijeli se na tri potporodice: *Amaryllidoideae*, *Agapanthoideae* i *Allioideae* od kojih je prva spomenuta najveća i sadrži mnoge ukrasne vrtne vrste. Potporodica *Allioideae* (prethodno porodica *Alliaceae*) sadrži niz važnih prehrambenih usjeva poput luka (*Allium cepa* L.), češnjaka (*Allium sativum* L.), poriluka (*Allium porrum* L.) i vlasca (*Allium schoenoprasum* L.).

Biljke iz ove porodice imaju podzemne stabljike najčešće lukovicu, a rjeđe podanak. Listovi, uglavnom cijelog ruba, najčešće su grupirani pri dnu stabljike koja je iznad toga bezlisna. Na vrhu stabljike nalaze se, pojedinačno ili u cvatovima, dvospolni cvjetovi s obično tri ili šest latica i tri ili šest čašica (28, 29).

## 1.7. *Allium sativum* L.

Češnjak (*Allium sativum* L.) aromatična je zeljasta biljka koja se konzumira kao prehrambeni proizvod i tradicionalni lijek diljem svijeta (30). Porijeklom je iz središnje Azije, ali samoniklo raste u Italiji i južnoj Francuskoj. Naraste oko 60 cm u visinu, a ovisno o sorti dugi listovi obično izviru iz kratke tvrde stabljike iznad lukovice ili iz mekanije pseudostabljike koju tvori lisni omotač. Lukovica sadržava do 20 bijelih ili svijetložutih češnjeva pomoću kojih se biljka razmnožava, a obavijeni su opnastom košuljicom (31, 32).

Češnjak se duboko ukorijenio u mnoge kulture jer je jedna od najstarije kultiviranih biljaka na svijetu. Egipatski Ebers papirus datira iz 1550. godine prije Krista i spominje korištenje češnjaka kao tretmana za abnormalne izrasline, apscese, malaksalost, cirkulacijske tegobe i druga stanja. U staroj Grčkoj koristio se kod plućnih i crijevnih poremećaja, a tijekom Drugog svjetskog rata kao antiseptik za rane zbog svojih antimikrobnih svojstava. Povijesni medicinski tekstovi ukazuju na terapijsku primjenu češnjaka kao antitumorskog, laksativnog, diuretskog, antibakterijskog i antifungalnog sredstva. Ostali korisni učinci njegove konzumacije uključuju snižavanje krvnog tlaka, kolesterola, šećera i lipida u krvi (32). Unatoč svim zdravstvenim prednostima češnjaka, njegova globalna potrošnja je u opadanju. Neki ljudi ne žele jesti bijeli češnjak zbog njegovog oštrog i neugodnog okusa i mirisa ili izazivanja gastrointestinalnih tegoba, stoga je važno razvijati prikladne formulacije (33).

### 1.7.1. Kemijski sastav

Lukovica češnjaka sadrži približno 65 % vode, 28 % ugljikohidrata, 2,3 % organskih spojeva sumpora, 2 % proteina, 1,2 % slobodnih aminokiselina i 1,5 % vlakana. Bioaktivni sastojci češnjaka mogu se podijeliti u skupinu tvari koje sadrže sumpor i skupinu tvari koje ne sadrže sumpor. Pojedini sastojci su hlapljivi poput organskih spojeva sumpora (OSC), a pojedini nehlapljivi poput saponina, sapogenina, flavonoida i fenola. Organski spojevi sumpora, kojih je bogat izvor, doprinose karakterističnom mirisu, okusu i zdravstvenim dobrobitima. Dije se na spojeve topljive u vodi i spojeve topljive u ulju, no obje skupine pokazale su učinak u prevenciji raka. U cijelim češnjevima alin (S-alil-L-cistein-sulfoksid) i GSAC ( $\gamma$ -glutamyl-S-alil-L-cistein) glavna su dva organska spoja sumpora. Sinteza različitih OSC-a započinje pretvorbom GSAC u alin djelovanjem  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidaze i oksidaze u citoplazmi biljnih stanica. Češanj sadrži 8 g/kg alina, glavnog OSC u svježem češnjaku i češnjaku u prahu. Rezanjem, žvakanjem ili drobljenjem svježeg češnjaka oslobađa se enzim alinaza iz vakuole koji katalizira reakciju važnu za nastanak alicina (dialil-tiosulfinata). Alicin češnjaku daje tipičan oštar miris, no unutar nekoliko sati stajanja na sobnoj temperaturi i nekoliko minuta kuhanja odvija se njegova razgradnja na razne OSC uključujući dialil-sulfid (DAS), dialil-disulfid (DADS), dialil-trisulfid (DATS), dialil-tetrasulfid, dipropil-disulfid, alil-metil-sulfid, alil-metil-disulfid, alil-metil-trisulfid, (E)-ajoen i (Z)-ajoen. Alicin i njegovi metaboliti ne pronalaze se u krvi ili urinu nakon konzumacije veće količine češnjaka što znači da se u organizmu brzo metaboliziraju (32).

Sastojci odgovorni za zdravstvene dobrobiti češnjaka mogu varirati u vrsti i koncentraciji ovisno o načinu obrade, pripremi i uvjetima tla (34). Farmakološka aktivnost zgnječenih češnjeva gotovo u potpunosti se pripisuje alicinu. Kuhanje češnjaka deaktivira alinazu, ali zdravstvene dobrobiti povezane s alicinom mogu se postići konzumiranjem većih količina jer je bioekvivalencija alicina za pečeni češnjak oko 30 % i kuhani oko 16 %. Bioraspoloživost alicina iz dodataka češnjaka u prahu s alinom i aktivnom alinazom može biti identična ekvivalentnoj količini zdrobljenog sirovog češnjaka kada se konzumira uz obrok. Međutim, tablete s prilagođenim oslobađanjem pokazuju veliku varijabilnost u bioraspoloživosti i njezino znatno smanjenje uz obrok bogat proteinima. Bioraspoloživost alicina u ovom kontekstu obuhvaća enzimsko stvaranje alil-tiosulfinata (uglavnom alicina), njihovu apsorpciju i metabolizam do mjerljivog metabolita, a bioekvivalencija metaboličko stvaranje mjerljivog metabolita bez aktivnosti alinaze (35).



### 1.7.2. Dodaci prehrani

Komercijalno dostupni dodaci s češnjakom uključuju češnjak u prahu, eterično ulje češnjaka, uljni macerat češnjaka i ekstrakt češnjaka. Češnjak u prahu dobiva se od narezanih ili zgnječenih pa osušenih i usitnjenih češnjeva, a smatra se da zadržava sastojke sirovog češnjaka, ali u različitim količinama. Češnjevi sadržavaju od 0,2 do 0,5 % eteričnog ulja koje se dobiva destilacijom vodenom parom i sadržava razne sulfide, ali ne i alicin. Uljni macerati proizvode se maceriranjem usitnjenih češnjeva u biljnom ulju, a ekstrakti češnjaka njihovim namakanjem u ekstrakcijskoj otopini. Ekstrakti su dostupni u čvrstom i tekućem obliku te dominantno sadržavaju u vodi topljive sastojke češnjaka (36).

Crni češnjak proizvodi se procesom koji se u literaturi navodi kao fermentacija ili starenje češnjaka, a uključuje inkubaciju lukovica na temperaturi od 60 do 90°C i visokoj vlažnosti (80 – 90 %) tijekom 30 – 40 dana što rezultira nastankom crnih češnjeva zbog Maillardove reakcije. Procesom se oštar okus povezan sa sirovim češnjakom zamjenjuje slatkim okusom zbog izostanka aktivacije alinaze i nastanka reakcija između šećera i slobodnih aminokiselina (35). Ekstrakt crnog češnjaka (AGE) dobiva se namakanjem narezanog sirovog češnjaka u 15 – 20 % etanolu do 20 mjeseci na sobnoj temperaturi, koji se potom filtrira i koncentrira. Ovaj proces uzrokuje gubitak nestabilnih molekula s antioksidativnim djelovanjem poput alicina i povećava količinu stabilnih, visoko bioraspoloživih, u vodi topljivih organskih spojeva sumpora kao što su S-alil-cistein i S-alil-merkaptocistein. Osim OSC, u važne antioksidanse pristune u AGE-u ubrajaju se i flavonoidi (posebice aliksin) i selen (34, 37). U ekstraktu crnog češnjaka pronađen je antioksidans čija je aktivnost usporediva s askorbinskom kiselinom (38).

Upotreba češnjaka jedna je od najpopularnijih komplementarnih terapija povišenog krvnog tlaka i smatra se da ju koristi 53,3 % hipertenzivnih bolesnika. Biokemijski gledano, antihipertenzivni učinak posljedica je složenog mehanizma djelovanja u kojem sudjeluje više aktivnih sastojaka. Početna razina krvnog tlaka važan je čimbenik koji utječe na djelotvornost češnjaka u snižavanju krvnog tlaka pa tako u pacijenata sa sistoličkim arterijskim tlakom nižim od 140 mmHg nije bio učinkovit (39). Međutim, nema dokaza da konzumacija češnjaka smanjuje rizik od smrti i kardiovaskularnog morbiditeta u hipertenzivnih bolesnika (40).

Upala je važna komponenta patogeneze brojnih bolesti kao što su šećerna bolest tip 2, astma, ateroskleroza, reumatoidni artritis i druge autoimune bolesti, a učinak češnjaka na smanjenje upalnih čimbenika TNF- $\alpha$  i CRP treba se dodatno ispitati u prevenciji upale (41).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja je ispitati citotoksično djelovanje uzoraka bijelog i crnog češnjaka dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom na stanične linije humanog adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i humanog karcinoma mokraćnog mjehura T24.

## 2.1. Hipoteza

Hlapljivi i nehlapljivi spojevi sadržani u uzorcima bijelog i crnog češnjaka pokazuju citotoksično djelovanje na stanične linije humanih karcinoma MDA-MB-231 i T24.

### **3. MATERIJALI I METODE**

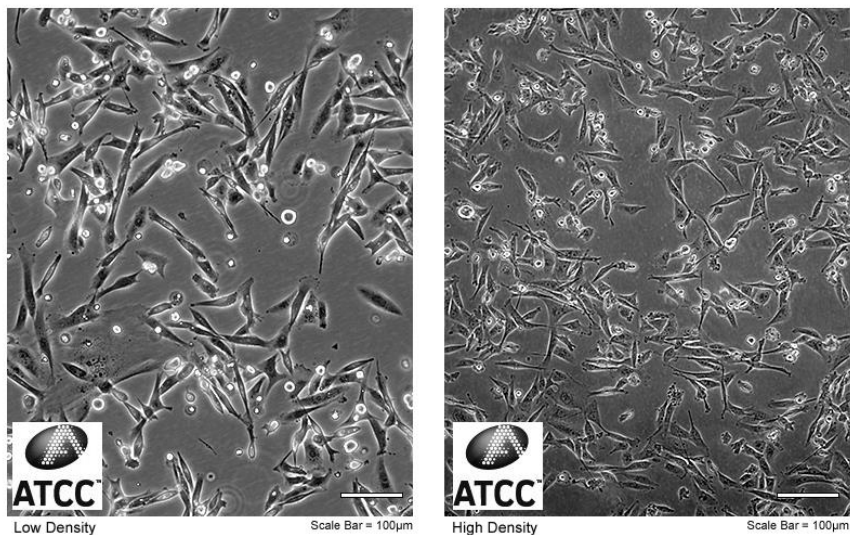
### 3.1. Stanične linije

Citotoksično djelovanje uzoraka bijelog i crnog češnjaka ispituje se *in vitro* na staničnim linijama humanih zloćudnih tumora MDA-MB-231 i T24. Njihove karakteristike i mikroskopski prikazi nalaze se u Tablicama 1 i 2 te na Slikama 1 i 2.

**Tablica 1.** Obilježja stanične linije MDA-MB-231 (42).

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	žljezdano tkivo dojke
Stanični tip	epitelne stanice
Forma proizvoda	smrznuta
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	adenokarcinom
Dob	51 godina
Spol	žensko
Etnicitet	bijela rasa
Uvjeti pohrane	tekući dušik

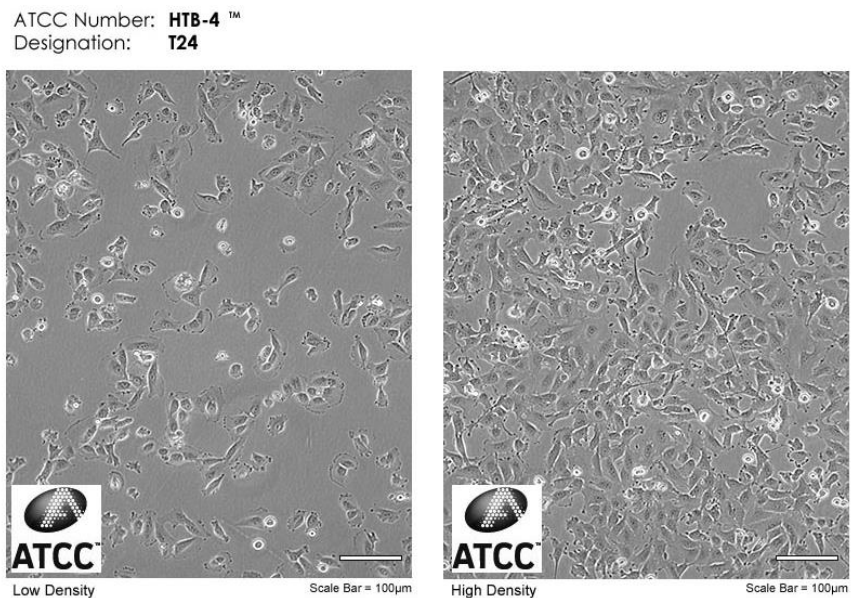
ATCC Number: **HTB-26**™  
Designation: **MDA-MB-231**



**Slika 1.** Mikroskopski prikaz stanične linije MDA-MB-231 (42).

**Tablica 2.** Obilježja stanične linije T24 (43).

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	mokraćni mjehur
Stanični tip	epitelne stanice
Forma proizvoda	smrznuta
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznih stanica
Dob	81 godina
Spol	žensko
Etnicitet	bijela rasa
Uvjeti pohrane	tekući dušik



**Slika 2.** Mikroskopski prikaz stanične linije T24 (43).

### 3.2. Biljni materijali

#### 3.2.1. *Allium sativum* L.

Bijeli i crni češnjak nabavljeni su 2019. godine u OPG-u Kralj, Zagreb. Osnovni taksoni prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Taksonomija biljke *A. sativum* L. (28, 29).

Vrsta	<i>Allium sativum</i> L.
Rod	<i>Allium</i>
Porodica	<i>Amaryllidaceae</i>
Red	Aspurgales
Razred	Dicotyledones



### 3.3. Metoda izolacije

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju omogućuje izolaciju dvije vrste biljnog sadržaja: hlapljivih spojeva (engl. *fragrance*) i aroma (engl. *flavour*). Biljni materijal bijelog (svježeg) i crnog (fermentiranog) češnjaka obrađen je mikrovalnom destilacijom i mikrovalnom ekstrakcijom.

Gornji dio aparature procesom mikrovalne destilacije izolira eterično ulje u kojem su sadržane hlapljive komponente. Mikrovalna destilacija traje vremenski kraće od hidrodestilacije i ne zahtjeva upotrebu organskog otapala.

Staklena posuda napunjena usitnjenim biljnim materijalom zatvori se poklopcem i poveže sa sustavom za refluks i hladilom. Voda kojom se napuni desna vertikalna cijev služi kao medij za prikupljanje hlapljivih spojeva koji se, po završetku destilacije, odvoje malenom količinom pentana. Destilacija se izvodi pri snazi od 500 W, 35 minuta na 98°C. Propipetom se u čistu čašu odvoji sloj hlapljivih spojeva i pentana nakon završetka destilacije, a ostatak vode iz aparature ispusti preko pipca. U čašu se doda bezvodni natrijev sulfat kao sredstvo za sušenje. Sadržaj čaše prebaci se u prethodno izvaganu bočicu pa se zaostalo organsko otapalo otpari u struji dušika. Uzorak se do GC-MS analize i ispitivanja citotoksične aktivnosti čuva u hladnjaku.

Donji dio aparature mikrovalnom ekstrakcijom izolira arome bez dodatka organskog otapala. Ekstrakt se pomoću mikrovalova i gravitacijske sile sakuplja u čaši koja se nalazi na dnu aparature. Ekstrakcijom se dobije oko 250 mL ekstrakta koji se prebaci u lijevak za odijeljivanje te ekstrahira s triput po 10 mL diklormetana. Donji, diklormetanski sloj odvoji se pipcem u čistu čašu i osuši bezvodnim natrijevim sulfatom. Sadržaj čaše potom se prebaci u prethodno izvaganu bočicu pa se zaostalo organsko otapalo otpari u struji dušika. Uzorak se do GC-MS analize čuva u hladnjaku.

### 3.4. Postupak

#### 3.4.1. Stanična kultura

Rad sa stanicama izvodi se u laboratoriju s kabinetom za sterilan rad uz sterilne reagense, pribor i posuđe kako bi se smanjio rizik kontaminacije. Odmrznute stanične linije raka uzgajaju se u mediju DMEM koji sadržava 4,5 g/L glukoze uz dodatak 10 % FBS-a i 1 % antibiotika (Penicillin Streptomycin, EuroClone, Milano, Italy). Kultiviraju se u inkubatoru u vlažnoj atmosferi zasićenoj 5 % ugljikovim dioksidom na 37°C.

DMEM sadrži ugljikohidrate, aminokiseline, vitamine i minerale, dakle sve nutrijente potrebne stanicama za preživljavanje. Red fenol, indikator sadržan u mediju, promjenom boje iz crvene u žutu ukazuje na potrebu za zamjenom postojećeg medija sa svježim. Nakon dodatka medija pločice sa stanicama ostave se preko noći da adheriraju na podlogu.

Nakon odsisavanja medija i ispiranja PBS-om, koji uklanja zaostali medij, dodaje se 0,25 % tripsin, enzim koji cijepanjem peptidne veze omogućava presađivanje stanica njihovim međusobnim odvajanjem i odvajanjem od podloge. Tripsin se ostavi da djeluje nekoliko minuta, a inaktivira ga dodatak svježeg medija u kojem se stanice resuspendiraju.

#### 3.4.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Za određivanje broja stanica u kulturi koristi se Bürker - Türkova komorica. U jažicu se prenese 50 µL resuspendiranih stanica i 50 µL Trypan Blue boje koja omogućava razlikovanje živih od mrtvih stanica. Mikroskopom se mogu uočiti nebojane, žive stanice i plavo obojene, mrtve stanice zbog oštećene membrane. Sadržaj jažice (10 µL) mikropipetom se nanese na Bürker - Türkovu komoricu te se pomoću binokularnog invertnog mikroskopa prebroje žive stanice u pet kvadratića. Ukupan broj živih stanica izračuna se prema formuli:

$$R = N \times 2 \times 10^4 \text{ stanica/mL};$$

gdje je:

R – ukupan broj živih stanica;

N – broj prebrojanih stanica na Bürker - Türkovoj komorici;

2 – faktor razrjeđenja.

### 3.4.3. Tretiranje stanica raka uzorcima bijelog i crnog češnjaka

Stanice se prebace na četiri pločice s 96 jažica tako da u svakoj jažici bude približno  $10^4$  stanica i ostave se preko noći da adheriraju na podlogu. Stanice raka tretiraju se prethodno pripremljenim uzorcima bijelog i crnog češnjaka u koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  i 100  $\mu\text{g/mL}$  tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Svaka koncentracija nanosi se u tri jažice, a prve tri predstavljaju kontrolu i ispunjene su medijem.

### 3.4.4. Test citotoksične aktivnosti

MTT test koristi se za određivanje citotoksične aktivnosti uzoraka bijelog i crnog češnjaka, mjerenjem metabolizma kulture stanica. Odvažuje se 0,02 g 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromida (MTT), žutog praha, i otopi u 40 mL PBS-a. Nakon tretmana stanica s uzorcima, dodaje se pripravljena otopina MTT-a pa se stanice inkubiraju na  $37^\circ\text{C}$  2 sata. Žive stanice su metabolički aktivne i prevode MTT u kristal formazan, dok u mrtvim stanicama nema ovog procesa jer su metabolički neaktivne. Potom se MTT uklanja i dodaje se 10 % DMSO te se stanice inkubiraju jedan sat na  $37^\circ\text{C}$ . Inkubacija s DMSO dovodi do otapanja kristala formazana i ljubičastog obojenja medija. Količina stvorenog formazana proporcionalna je broju živih i metaboličkih aktivnih stanica, a mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 570 nm.

Stupanj stvaranja formazana mjeri se u svakoj jažici, a najintenzivnije obojenje i najveća apsorbanacija očekuju se u kontrolnim jažicama. Podaci se računaju u odnosu na kontrolu, odnosno citotoksična aktivnost izražava se kao omjer apsorbanacije jažica s biljnim uzorcima te apsorbanacije kontrolnih jažica.

### 3.5. Statistička analiza

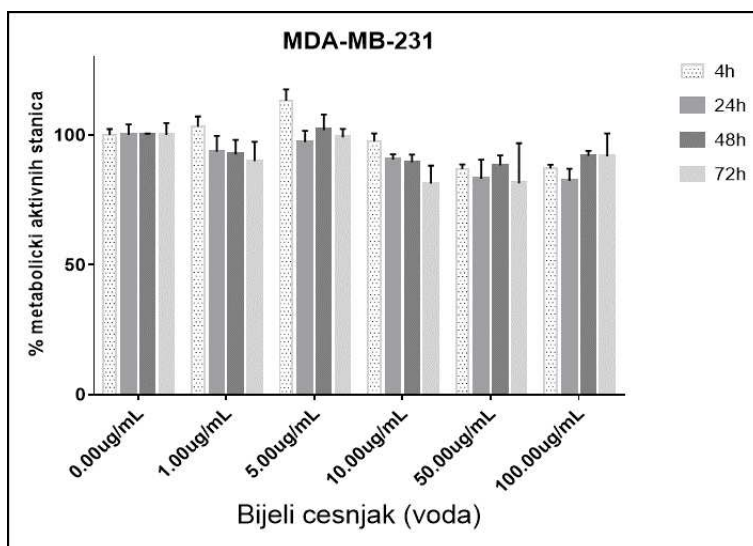
Spektrofotometrom izmjerena je apsorbanacija kontrolnih i ispitivanih skupina. Kontrolnu skupinu sačinjavaju jažice sa stanicama raka u mediju, a ispitivanu skupinu jažice sa stanicama raka tretirane različitim koncentracijama biljnih uzoraka u mediju. Srednje vrijednosti apsorbanacije izračunate su za obje skupine nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Također, izračunati su omjeri srednjih vrijednosti apsorbanacija ispitivanih i kontrolnih skupina. Rezultati su prikazani grafički i izračunati u programu GraphPad Prism, v.7.0 (San Diego, CA, SAD) sa statističkom značajnošću  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Stanična linija MDA-MB-213

##### 4.1.1. *Allium sativum* L., liofilizirani ostatak bijelog ili svježeg češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije

Liofilizirani ostatak bijelog češnjaka pokazuje neznatan citotoksični učinak na staničnu liniju MDA-MB-213 (Slika 3). Nema značajne povezanosti ispitivanih koncentracija liofiliziranog ostatka ili vremena inkubacije sa smanjenjem broja metabolički aktivnih stanica.



	4 sata	24 sata	48 sati	72 sata
IC50 <sup>a</sup> (µg/mL)	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>

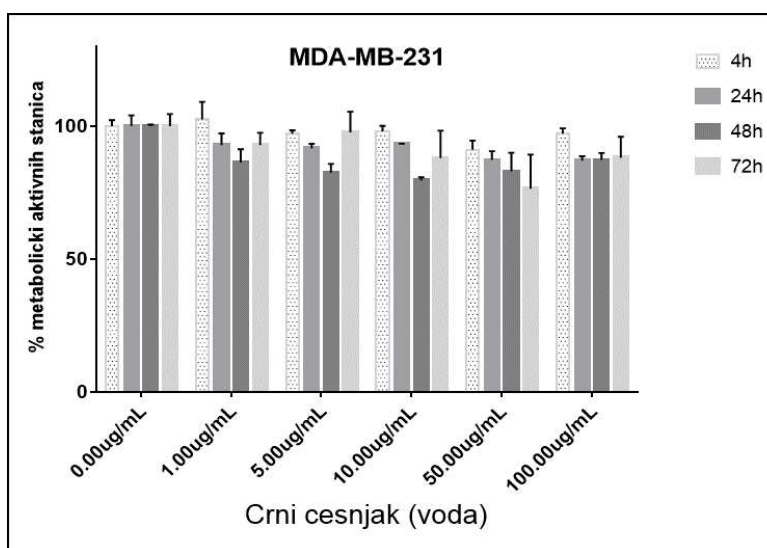
**Slika 3.** Citotoksična aktivnost liofiliziranog ostatka bijelog češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije na staničnu liniju MDA-MB-231

<sup>a</sup> koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živo

<sup>b</sup> nije moguće odrediti

4.1.2. *Allium sativum* L., liofilizirani ostatak crnog ili fermentiranog češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije

Liofilizirani ostatak crnog češnjaka u ispitivanim uvjetima ne pokazuje značajan antiproliferativni učinak na staničnu liniju MDA-MB-231 (Slika 4). Koncentracija uzorka ili vrijeme inkubacije nisu značajnije povezani s citotoksičnim djelovanjem.



	4 sata	24 sata	48 sati	72 sata
IC50 <sup>a</sup> (µg/mL)	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>

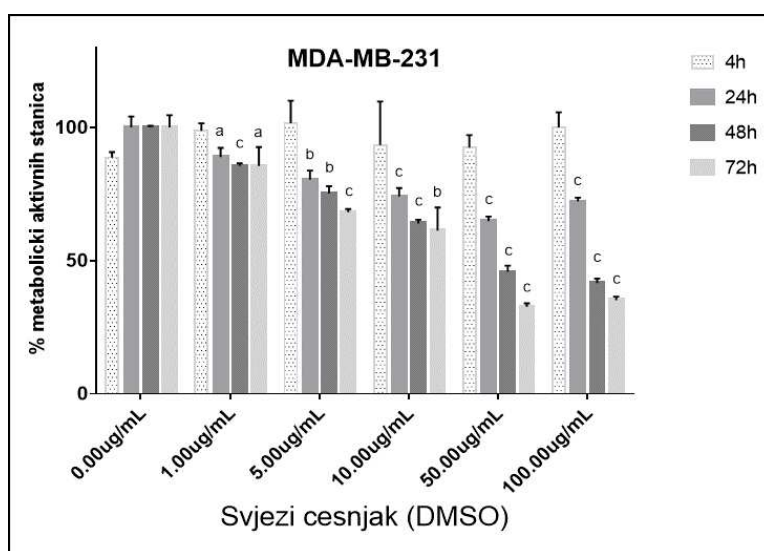
**Slika 4.** Citotoksična aktivnost liofiliziranog ostatka crnog češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije na staničnu liniju MDA-MB-231

<sup>a</sup> koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živo

<sup>b</sup> nije moguće odrediti

#### 4.1.3. *Allium sativum* L., mikrovalni ekstrakt bijelog ili svježeg češnjaka

Mikrovalni ekstrakt svježeg češnjak pokazuje citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu izloženosti (Slika 5). Broj metabolički aktivnih stanica nije se značajnije smanjio nakon 4 sata izlaganja biljnom uzorku, neovisno o njegovoj koncentraciji. Dužom inkubacijom ostvaruje se veći antiproliferativni učinak. Povećavanjem koncentracije povećava se citotoksičnost, a minimalni porast postotka živih stanica vidljiv je pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 24 i 72 sata.



	4 sata	24 sata	48 sati	72 sata
IC50 <sup>d</sup> (µg/mL)	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	35,33	19,8

**Slika 5.** Citotoksična aktivnost mikrovalnog ekstrakta svježeg češnjaka na staničnu liniju MDA-MB-231

<sup>a</sup> *P*-vrijednost < 0,05

<sup>b</sup> *P*-vrijednost < 0,01

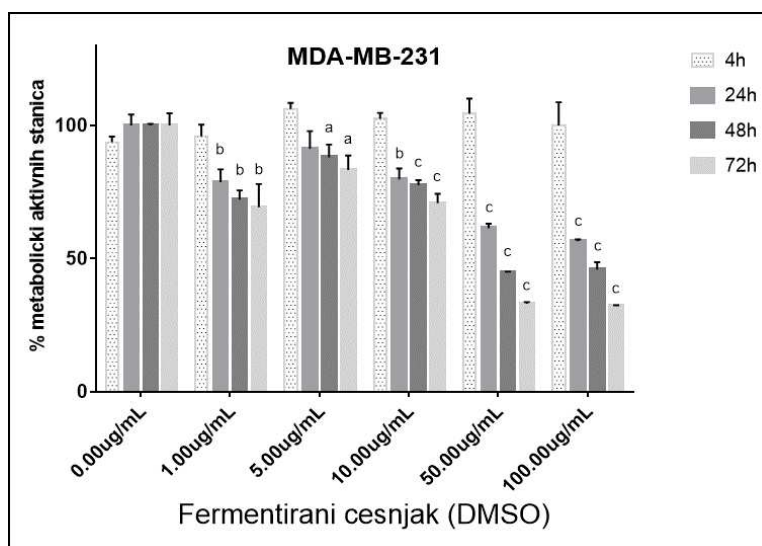
<sup>c</sup> *P*-vrijednost < 0,001

<sup>d</sup> koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živo

<sup>e</sup> nije moguće odrediti

#### 4.1.4. *Allium sativum* L., mikrovalni ekstrakt crnog ili fermentiranog češnjaka

Mikrovalni ekstrakt fermentiranog češnjaka pokazuje citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu izloženosti (Slika 6). Izlaganje ekstraktu 4 sata nije se pokazalo dovoljnim za smanjenje broja živih stanica MDA-MB-231 stanične linije. Vrijeme inkubacije obrnuto je proporcionalno broju metabolički aktivnih stanica, dakle povećanje vremena inkubacije smanjuje količinu metabolički aktivnih stanica. Za isto vrijeme inkubacije koncentracija ekstrakta od 1 µg/mL pokazuje veći citotoksični učinak od 5 µg/mL, a koncentracije od 50 i 100 µg/mL približno isti učinak.



	4 sata	24 sata	48 sati	72 sata
IC50 <sup>d</sup> (µg/mL)	ND <sup>e</sup>	92,58	49,8	26,72

**Slika 6.** Citotoksična aktivnost mikrovalnog ekstrakta fermentiranog češnjaka na staničnu liniju MDA-MB-231

<sup>a</sup> *P*-vrijednost < 0,05

<sup>b</sup> *P*-vrijednost < 0,01

<sup>c</sup> *P*-vrijednost < 0,001

<sup>d</sup> koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živo

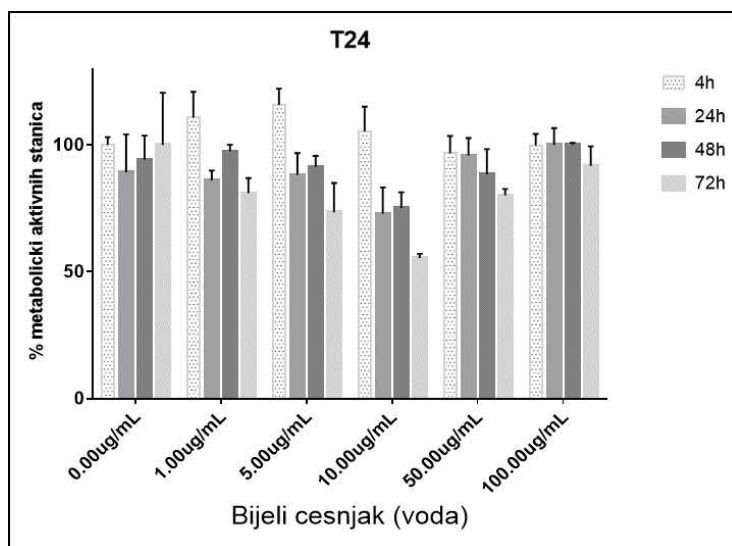
<sup>e</sup> nije moguće odrediti



## 4.2. Stanična linija T24

### 4.2.1. *Allium sativum* L., liofilizirani ostatak bijelog ili svježeg češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije

Liofilizirani ostatak bijelog češnjaka ne pokazuje značajnu citotoksičnu aktivnost na staničnu liniju T24 u ispitivanim uvjetima (Slika 7). Najizraženiji učinak vidljiv je pri koncentraciji od 10 µg/ML nakon 72 sata inkubacije.



	4 sata	24 sata	48 sati	72 sata
IC50 <sup>a</sup> (µg/mL)	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>

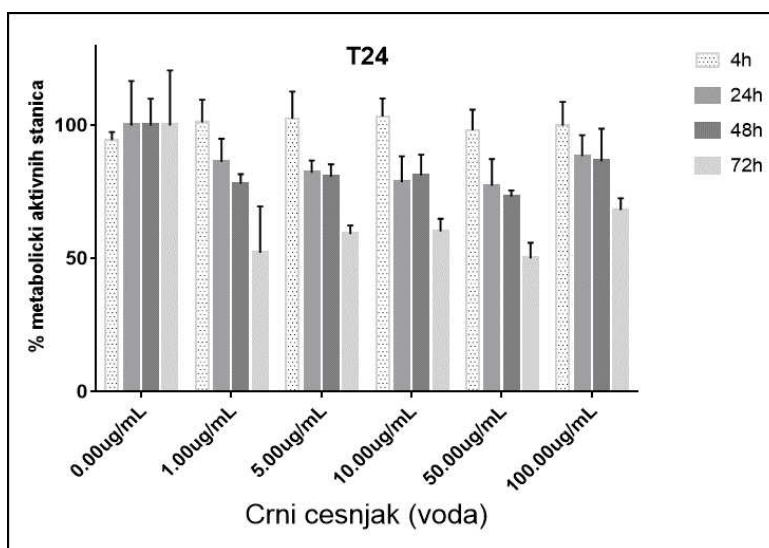
**Slika 7.** Citotoksična aktivnost liofiliziranog ostatka bijelog češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije na staničnu liniju T24

<sup>a</sup> koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živo

<sup>b</sup> nije moguće odrediti

4.2.2. *Allium sativum* L., liofilizirani ostatak crnog ili fermentiranog češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije

Citotoksični učinak liofiliziranog ostatka crnog češnjaka može se povezati s vremenom inkubacije (Slika 8). Najizraženiji učinak vidljiv je nakon izlaganja stanica liofiliziranom ostatku tijekom 72 sata i neznatno se razlikuje u ispitivanim koncentracijama od 5, 10 i 50  $\mu\text{g/mL}$ . Koncentracija od 100  $\mu\text{g/mL}$  pokazuje smanjenu učinkovitost u odnosu na nižu ispitivanu koncentraciju od 50  $\mu\text{g/mL}$  nakon 24, 48 i 72 sata. Citotoksična aktivnost približno je jednaka nakon inkubacije od 24 i 48 sata neovisno o koncentraciji uporabljenog liofiliziranog ostatka.



	4 sata	24 sata	48 sati	72 sata
IC50 <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	59,09

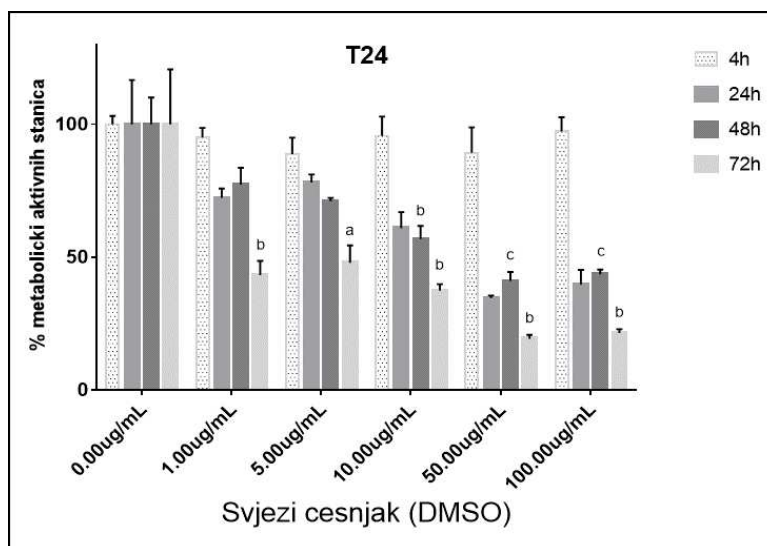
**Slika 8.** Citotoksična aktivnost liofiliziranog ostatka crnog češnjaka nakon mikrovalne ekstrakcije na staničnu liniju T24

<sup>a</sup> koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živo

<sup>b</sup> nije moguće odrediti

#### 4.2.3. *Allium sativum* L., mikrovalni ekstrakt bijelog ili svježeg češnjaka

Mikrovalni ekstrakt svježeg češnjaka pokazuje značajan antiproliferativni učinak na staničnu liniju T24 nakon 48 i 72 sata inkubacije (Slika 9). Izlaganje stanica ekstraktu tijekom 4 sata nije pokazalo značajne rezultate. Ista koncentracija ekstrakta nakon 24 i 48 sati inkubacije pokazuje sličnu aktivnost. Nakon inkubacije od 72 sata dolazi do značajnog smanjenja broja metabolički aktivnih stanica i pri nižim ispitivanim koncentracijama.



	4 sata	24 sata	48 sati	72 sata
IC50 <sup>d</sup> (µg/mL)	ND <sup>e</sup>	24,95	27,31	3,134

**Slika 9.** Citotoksična aktivnost mikrovalnog ekstrakta svježeg češnjaka na staničnu liniju T24

<sup>a</sup> *P*-vrijednost < 0,05

<sup>b</sup> *P*-vrijednost < 0,01

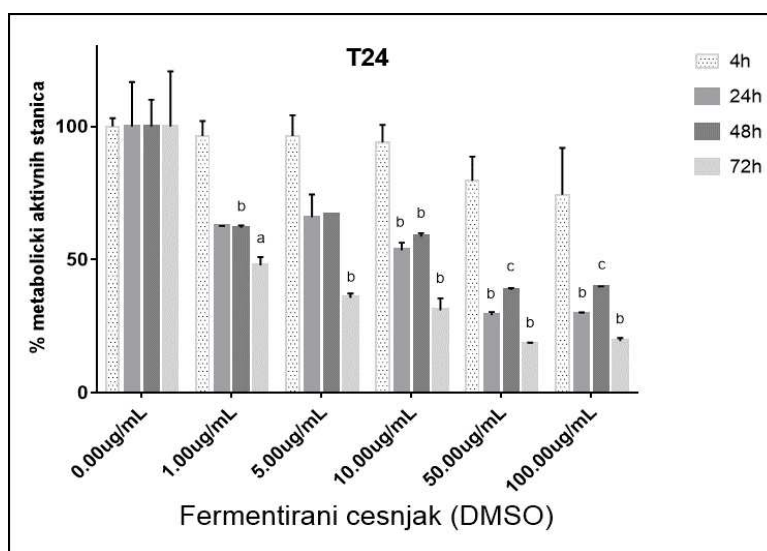
<sup>c</sup> *P*-vrijednost < 0,001

<sup>d</sup> koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živo

<sup>e</sup> nije moguće odrediti

#### 4.2.4. *Allium sativum* L., mikrovalni ekstrakt crnog ili fermentiranog češnjaka

Mikrovalni ekstrakt fermentiranog češnjaka pokazuje citotoksični učinak u svim ispitivanim koncentracijama (Slika 10). Ekstrakt koncentracije 1, 5 i 10  $\mu\text{g/mL}$  pokazuje identičan učinak nakon 24 i 48 sati inkubacije. Ekstrakt koncentracije 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$  nakon 48 sati pokazuje smanjen citotoksični učinak, odnosno broj metabolički aktivnih stanica veći je nakon 48 sati nego nakon 24 sata. Najveći učinak postignut je nakon inkubacije od 72 sata pri svim koncentracijama, a značajna citotoksičnost postiže se već i kod nižih ispitivanih koncentracija.



	4 sata	24 sata	48 sati	72 sata
IC50 <sup>d</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	ND <sup>e</sup>	11,98	23,97	2,041

**Slika 10.** Citotoksična aktivnost mikrovalnog ekstrakta fermentiranog češnjaka na staničnu liniju T24

<sup>a</sup> *P*-vrijednost < 0,05

<sup>b</sup> *P*-vrijednost < 0,01

<sup>c</sup> *P*-vrijednost < 0,001

<sup>d</sup> koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živo

<sup>e</sup> nije moguće odrediti

## **5. RASPRAVA**

Ovo istraživanje pokazuje različit citotoksični učinak uzoraka bijelog i crnog češnjaka na stanične linije MDA-MB-231 (adenokarcinom žljezdanog tkiva dojke) i T24 (karcinom prijelaznih stanica mokraćnog mjehura). Iako su svi uzorci dobiveni iz iste biljne vrste *Allium sativum* L., fermentacija bijelog češnjaka i mikrovalna ekstrakcija omogućuju dobivanje uzoraka različitog kemijskog sastava o kojem ovisi ispitivana djelotvornost uzorka.

Liofilizirani ostaci bijelog i crnog češnjaka neznajno smanjuju broj metabolički aktivnih stanica linije MDA-MB-231, a mikrovalni ekstrakti pokazuju značajno smanjenje u pojedinim uvjetima. Iako su potrebne niže koncentracije mikrovalnog ekstrakta bijelog češnjaka za smanjenje broja živih stanica linije MDA-MB-231 na 50 % nakon inkubacije od 48 i 72 sata, za mikrovalni ekstrakt crnog češnjaka IC<sub>50</sub> može se detektirati i nakon 24 sata. Smatra se da fermentacija, proces kojim nastaje crni češnjak, poboljšava biološku aktivnost (33). Marni i suradnici (44) procijenili su učinak dialil-disulfida (DADS) i dialil-trisulfida (DATS) na trostruko negativan rak dojke rezistentan na liječenje paklitakselom stanične linije MDA-MB-231. Rezultati su pokazali značajnu citotoksičnost ovih spojeva, njihovu sposobnost inhibicije proliferacije blokiranjem staničnog ciklusa i indukcije apoptoze aktivacijom kaspaze 3 i 9. Dialil-sulfid (DAS), dialil-disulfid (DADS) i dialil-trisulfid (DATS) najzastupljeniji su spojevi u eteričnom ulju češnjaka (45) pa bi navedeno moglo poslužiti kao objašnjenje za značajnije citotoksično djelovanje mikrovalnih ekstrakta.

Liofilizirani ostaci bijelog i crnog češnjaka ne pokazuju značajan citotoksični učinak na staničnu liniju T24, no mikrovalni ekstrakti značajno reduciraju broj metabolički aktivnih stanica u određenim ispitivanim uvjetima. Zanimljivo je da mikrovalni ekstrakti pokazuju nižu vrijednost IC<sub>50</sub> nakon 24 sata, nego nakon 48 sati. Koncentracija pri kojoj 50 % stanica T24 ostaje živo iznosi 3,314 µg/mL za ekstrakt bijelog češnjaka i 2,041 µg/mL za ekstrakt crnog češnjaka, kad je vrijeme inkubacije 72 sata. Dakle, povećavanje vremena inkubacije na 72 sata smanjuje IC<sub>50</sub> ispod vrijednosti dobivenih za 24 i 48 sati.

Korišteni mikrovalni ekstrakti *Allium sativum* L. pokazali su značajno smanjenje broja stanica raka pri nižim koncentracijama za staničnu liniju T24 nego za MDA-MB-231. Liofilizirani ostaci bijelog i crnog češnjaka nisu pokazali značajnije smanjenje citotoksične aktivnosti na ovim staničnim linijama humanih karcinoma.

Studije s normalnim, netumorskim stanicama iznimno su rijetke, međutim ukazuju na prilično selektivnu citotoksičnost polisulfida na stanice raka (45). Uzorci bijelog i crnog češnjaka imaju potencijal za kombiniranje s antitumorskim lijekovima i korištenje u liječenju tumora rezistentnih na postojeću terapiju. Međutim, potrebne su dodatne *in vitro* studije kojima bi se utvrdio učinak uzoraka bijelog i crnog češnjaka na tumorsko i netumorsko tkivo.

## **6. ZAKLJUČCI**



1. *In vitro* izlaganje staničnih linija humanih karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) uzorcima bijelog i crnog češnjaka dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom uzrokuje smanjeno preživljavanje stanica.
2. Citotoksični učinak uzoraka *Allium sativum* L. ovisan je o koncentraciji i vremenu inkubacije.
3. Djelovanje ispitivanih uzoraka *Allium sativum* L. nije uvijek proporcionalno promjeni koncentracije i vremena inkubacije te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica unatoč povećanju navedenih parametara.
4. Potvrđen je učinak hlapljivih spojeva *Allium sativum* L. na stanične linije humanih karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24).
5. Citotoksični učinak nehlapljivih spojeva *Allium sativum* L. nije potvrđen u ispitivanim uvjetima.

## **7. LITERATURA**

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 149-89.
2. Cooper MG, Hausman RE. Rak. U: Gordan Lauc, ur. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. 728 str.
3. Cooper MG, Hausman RE. Rak. U: Gordan Lauc, ur. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 741-58.
4. National Cancer Institute [Internet]. Large Study Verifies Cancer Risk for Women Carrying BRCA1 or BRCA2 Mutations. [pristupljeno: 1. listopada 2022.]; Dostupno na: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/brca-mutation-cancer-risk>.
5. World Cancer Day [Internet]. What is Cancer?. [pristupljeno 3. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://www.worldcancerday.org/what-cancer#whaticancert>.
6. WHO. International Agency for Research on Cancer [Internet]. CANCER TODAY. [pristupljeno 3. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>.
7. European Commission [Internet]. A cancer plan for Europe. [pristupljeno 3. rujna 2022.]; Dostupno na: [https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/promoting-our-european-way-life/european-health-union/cancer-plan-europe\\_en](https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/promoting-our-european-way-life/european-health-union/cancer-plan-europe_en).
8. Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Lončar J, Čukelj P, Glibo M, i sur. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., Bilten 44, Zagreb, 2021.
9. European Cancer Information System [Internet]. Incidence and mortality estimates 2020. [pristupljeno 3. Rujna 2022.] Dostupno na: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/index.php>.
10. Drury A, Dowling M, Diez de Los Rios de la Serna C, Erdem S, Aroyo V, Wiseman T, i sur. Advanced breast cancer education for cancer nurses: A systematic review. Nurse Educ Today. 2022;117:105477.
11. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, I sur. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2019;30(8):1194-1220.

12. McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified?. *Oncologist*. 2003;8(4):326-334.
13. Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):3789-96.
14. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti dojke: Tumori dojke. U: Raič A, ur. *Patologija*. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 645-56.
15. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*. 2010 Jun 1;81(11):1339-46.
16. Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. *Radiologia*. 2017 Sep-Oct;59(5):368-379.
17. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, McPhail S, Rubin GP, Lyratzopoulos G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol*. 2017 Jun;48:140-146.
18. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Bianchini F, i sur. Breast-cancer screening--viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2015;372(24):2353-2358.
19. Tabár L, Dean PB. A new era in the diagnosis and treatment of breast cancer. *Breast J*. 2010 Sep-Oct;16 Suppl 1:S2-4.
20. Rakha EA, Ellis IO. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. *Adv Anat Pathol*. 2011 Jul;18(4):255-67.
21. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, André F, i sur. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Ann Oncol*. 2020;31(12):1623-1649.
22. Kenn M, Cacsire Castillo-Tong D, Singer CF, Karch R, Cibena M, Koelbl H, i sur. Decision theory for precision therapy of breast cancer. *Sci Rep*. 2021 Feb 19;11(1):4233.

23. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, i sur. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63(2):234-241.
24. Tang H, Shi W, Fu S, Wang T, Zhai S, Song Y, i sur. Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med*. 2018;7(4):1070-1080.
25. National Cancer Institute [Internet]. Bladder Cancer Treatment – Health Professional Version. [pristupljeno 18. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://www.cancer.gov/types/bladder/hp/bladder-treatment-pdq>.
26. American Cancer Society [Internet]. What Is Bladder Cancer?. [pristupljeno 18. rujna 2022.] Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/what-is-bladder-cancer.html>.
27. Ng K, Stenzl A, Sharma A, Vasdev N. Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions. *Urol Oncol*. 2021 Jan;39(1):41-51.
28. Hrvatska enciklopedija [Internet]. Sunovrati. [pristupljeno 18. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=58806>.
29. Britannica [Internet]. Amaryllidaceae. [pristupljeno 19. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://www.britannica.com/plant/Amaryllidaceae>.
30. El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, G Wasef L, Elewa YHA, A Al-Sagan A, Abd El-Hack ME, i sur. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): a review. *Nutrients*. 2020;12(3):872.
31. Britannica [Internet]. garlic. [pristupljeno 19. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://www.britannica.com/plant/garlic>.
32. De Greef D, Barton EM, Sandberg EN, Croley CR, Pumarol J, Wong TL, i sur. Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: A systematic and comprehensive review. *Semin Cancer Biol*. 2021;73:219-264.
33. Ahmed T, Wang CK. Black garlic and its bioactive compounds on human health diseases: a review. *Molecules*. 2021 Aug 19;26(16):5028.

34. Elostá A, Slevin M, Rahman K, Ahmed N. Aged garlic has more potent antiglycation and antioxidant properties compared to fresh garlic extract in vitro. *Sci Rep*. 2017 Jan 4;7:39613.
35. Lawson LD, Hunsaker SM. Allicin bioavailability and bioequivalence from garlic supplements and garlic foods. *Nutrients*. 2018 Jun 24;10(7):812.
36. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr*. 2001 Mar;131(3s):955S-62S.
37. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr*. 2001 Mar;131(3s):1010S-5S.
38. Miraghajani M, Rafie N, Hajianfar H, Larijani B, Azadbakht L. Aged garlic and cancer: a systematic review. *Int J Prev Med*. 2018 Sep 17;9:84.
39. Xiong XJ, Wang PQ, Li SJ, Li XK, Zhang YQ, Wang J. Garlic for hypertension: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytomedicine*. 2015 Mar 15;22(3):352-61.
40. Stabler SN, Tejani AM, Huynh F, Fowkes C. Garlic for the prevention of cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Aug 15;2012(8):CD007653.
41. Koushki M, Amiri-Dashatan N, Pourfarjam Y, Doustimotlagh AH. Effect of garlic intake on inflammatory mediators: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Postgrad Med J*. 2021 Mar;97(1145):156-163.
42. ATCC [Internet]. MDA-MB-231. [pristupljeno: 21. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/htb-26>.
43. ATCC [Internet]. T24. [pristupljeno: 21. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/htb-4?nt=wobj-20-q>.
44. Marni R, Kundrapu DB, Chakraborti A, Malla R. Insight into drug sensitizing effect of diallyl disulfide and diallyl trisulfide from *Allium sativum* L. on paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *J Ethnopharmacol*. 2022 Oct 5;296:115452.

45. Saidu NE, Abu Asali I, Czepukojc B, Seitz B, Jacob C, Montenarh M. Comparison between the effects of diallyl tetrasulfide on human retina pigment epithelial cells (ARPE-19) and HCT116 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Nov;1830(11):5267-76.

## **8. SAŽETAK**



**Ciljevi:** Cilj ovog istraživanja je ispitati citotoksično djelovanje uzoraka bijelog i crnog češnjaka (*Allium sativum* L.) dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom na stanične linije humanog adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i humanog karcinoma mokraćnog mjehura T24. Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica, uspoređujući s kontrolom, smanjiti nakon izlaganja biljnim uzorcima.

**Materijali i metode:** Stanice su tretirane s uzorcima *A. sativum* L. dobivenim mikrovalnom ekstrakcijom (liofilizirani ostaci i mikrovalni ekstrakti bijelog i crnog češnjaka) u koncentraciji od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksična aktivnost odredila se MTT testom nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. Spektrofotometrom je dobivena apsorbancija na 570 nm koja je korištena za određivanje djelotvornosti uzoraka češnjaka.

**Rezultati:** Rezultati su prikazani grafički u odnosu koncentracije uzorka, vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica.

Kod stanične linije MDA-MB-231, liofilizirani ostaci bijelog i crnog češnjaka pokazuju neznatan citotoksični učinak. Mikrovalni ekstrakti bijelog i crnog češnjaka pokazuju učinak ovisan o koncentraciji i vremenu izloženosti. Duljom inkubacijom ostvaruje se veće smanjenje broja metabolički aktivnih stanica, a najizraženiji učinak je pri koncentracijama od 50 i 100 µg/mL.

Kod stanične linije T24, liofilizirani ostaci bijelog i crnog češnjaka pokazuju neznatan citotoksični učinak. Mikrovalni ekstrakti bijelog i crnog češnjaka pokazuju učinak u svim ispitivanim koncentracijama, ali najizraženiji je pri 50 i 100 µg/mL. Značajna citotoksičnost postiže se nakon inkubacije od 72 sata.

**Zaključci:** *In vitro* izlaganje staničnih linija humanih karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) uzorcima bijelog i crnog češnjaka uzrokuje smanjeno preživljavanje stanica. Citotoksični učinak ovisan je o koncentraciji i vremenu inkubacije. Učinkovitost je potvrđena za hlapljive spojeve sadržane u mikrovalnim ekstraktima, ali ne i za liofilizirane ostatke koji sadrže nehlapljive spojeve.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Antiproliferative effect of black and fresh garlic isolates

**Objectives:** The aims of this diploma thesis were to investigate the cytotoxic effects of black and white garlic isolates from microwave extraction on breast cancer cell line MDA-MB-231 and bladder cancer cell line T24.

**Materials and methods:** The cells were treated with samples of *A. sativum* L. obtained by microwave extraction (lyophilized residues and microwave extracts of white and black garlic) at concentrations of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL. ml. Cytotoxic activity was determined by the MTT test after 4, 24, 48 and 72 hours of incubation. Absorbance at 570 nm was measured with a spectrophotometer, which was used to determine the effectiveness of garlic samples.

**Results:** The results are presented graphically in relation to sample concentration, incubation time and percentage of metabolically active cells.

In the MDA-MB-231 cell line, lyophilized residues of white and black garlic show a slight cytotoxic effect. Microwave extracts of white and black garlic show an effect dependent on concentration and exposure time. Longer incubation results in a greater reduction in the number of metabolically active cells, and the most pronounced effect is at concentrations of 50 and 100 µg/mL.

In the T24 cell line, lyophilized residues of white and black garlic show a slight cytotoxic effect. Microwave extracts of white and black garlic show an effect in all tested concentrations, but it is most pronounced at 50 and 100 µg/mL. Significant cytotoxicity is achieved after 72 hours of incubation.

**Conclusions:** In vitro exposure of human breast (MDA-MB-231) and bladder (T24) carcinoma cell lines to samples of white and black garlic causes decreased cell survival. The cytotoxic effect depends on the concentration and incubation time. Efficacy has been confirmed for volatile compounds contained in microwave extracts, but not for lyophilized residues containing non-volatile compounds.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OSOBNI PODACI:**

Ime i prezime: Petra Prkić

Datum i mjesto rođenja: 15. listopada 1998., Split

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Kneza Domagoja 40, Solin 21210

Elektronička pošta: [petraprkic@gmail.com](mailto:petraprkic@gmail.com)

**OBRAZOVANJE:**

2005. – 2013. Osnovna škola don Lovre Katića, Solin, Republika Hrvatska

2013. – 2017. III. gimnazija, Split, Republika Hrvatska

2017. – 2022. Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija, Medicinski fakultet i  
Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu

Stručno osposobljavanje: Ljekarne Splitsko-Dalmatinske županije, Bolnička ljekarna Kliničkog  
bolničkog centra Split, položen stručni ispit Hrvatske ljekarničke komore za stjecanje odobrenja  
za samostalan rad

**AKTIVNOSTI:**

- Član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA) (2017. - 2021.)
- Natjecanje u izradi magistralnih pripravaka – compoundig event (Split, 2019.)
- 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures  
in Individualized Medicine (Split, 2019.)

**VJEŠTINE:**

Strani jezici: engleski jezik, talijanski jezik

Vozačka dozvola: B kategorija

**NAGRADE:**

16.3.2019. Dekanova nagrada, Medicinski fakultet Split