

Citotoksično djelovanje odabranih biljaka iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

Rajčić, Lucia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:171:964467>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-21**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



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

Lucia Rajčić

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE ODABRANIH BILJAKA IZ
PORODICE KUPUSNJAČA NA RAZLIČITE STANIČNE LINIJE
HUMANIH KARCINOMA MJERENO MTT METODOM**

Diplomski rad

Akademska godina 2018./2019.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, rujan, 2019. godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska kemija i biokemija
Tema rada: je prihvaćena i potvrđena na 60. sjednici Vijeća studija Farmacije, Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić,

Citotoksično djelovanje odabranih biljaka iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom
Lucia Rajčić, broj indeksa: 126

Sažetak:

Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksični učinak određenih biljaka iz porodice kupusnjača na dvije stanične linije humanih karcinoma: T24 i A549. Korišteni su mikrovalni destilati i mikrovalni ekstrakti biljnih vrsta *Armoracia rusticana*; korijena i lista, te *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, te hidrodestilati biljne vrste *Armoracia rusticana*, korijena i lista. Stanice karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i karcinoma pluća nemalih stanica (A549) tretirane su uzorcima različitih dijelova biljaka u koncentraciji od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama ekstrakata te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih ekstrakata. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24 ostvario je hidrodestilat korijena vrste *Armoracia rusticana*. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju raka pluća nemalih stanica A549 ostvario je mikrovalni destilat korijena vrste *Armoracia rusticana*. Djelovanje ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te ponekad dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak odabranih biljaka iz porodice kupusnjača je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka u *in vivo* istraživanju na modelima karcinoma mokraćnog mjehura i raka pluća nemalih stanica kod životinja.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom „**Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala**“ (IP-2016-06-1316).

Ključne riječi: biljke, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda

Rad sadrži: 67 stranica, 36 slika, 7 tablica i 24 reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Maja Valić
2. Dr. sc. Shelly Pranić
3. Izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 30.09. 2019

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Medical Chemistry and Biochemistry
Thesis subject: was approved and confirmed at 60. meeting of Council of Integrated Undergraduate and Graduate Faculty of Pharmacy as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine.
Mentor: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD
Technical assistance: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

**The cytotoxic effect of the plants from the *Brassicaceae* family on various cell lines of human cancers
measured by the MTT assay**

Lucia Rajčić index number: 126

Summary:

The main goal of this research is to examine the cytotoxic effects of the plants from the *Brassicaceae* family on two cell lines of human carcinomas: T24 and A549. We used hydrodistillates and microwave extracts of the plants *Armoracia rusticana*, both root and leaf, and *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, as well as hydrodistillates of *Armoracia rusticana*, both root and leaf. Bladder carcinoma (T24) and non small lung carcinoma (A549) cells were treated with extracts from different parts of plants at a concentration of 1, 5, 10, 50 and 100 µg/mL. Cytotoxicity has been determined after 4, 24, 48 and 72 h by using the MTT method. The ratio between the absorbance of the cells treated with aqueous solutions of the extracts and the absorbance of those which were not, is the index of cytotoxic activity of the extracts. The best cytotoxic effect on cell line T24 was achieved by *Armoracia rusticana* root hydrodistillat. The best cytotoxic effect on cell line A549 was achieved by *Armoracia rusticana* root hydrodistillat. The activity of extracts is not always proportional to concentration and time of incubation, and in some cases cells may recover. The cytotoxic effect of these *Brassicaceae* plants was confirmed, and the next step regards the confirmation of these effects by *in vivo* testing, using animal bladder carcinoma, as well as non-small lung cancer model.

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: 67 pages, 36 figures, 7 tables, 24 references

Original in: Croatian

Defence committee:

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

Defence date: September 30, 2019

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. RAK	2
1.1.1. ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI	2
1.1.2. GENOMSKA NESTABILNOST	3
1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA	3
1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	3
1.2.2. PATOHISTOLOGIJA	4
1.2.3. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA	4
1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA	5
1.2.5. LIJEČENJE RAKA PRIJELAZNOG EPITELA	11
1.3. RAK PLUĆA	12
1.3.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA	12
1.3.2. KLINIČKA SLIKA	12
1.3.3. DIJAGNOSTIKA I KLASIFIKACIJA	13
1.3.4. LIJEČENJE	21
1.4. KUPUSNJAČE	23
1.4.1. ARMORACIA RUSTICANA	24
1.4.2. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA	25
2. MATERIJALI I METODE	29
2.1. STANIČNE LINIJE	30
2.2. BILJNI MATERIJALI	32
2.2.1. ARMORACIA RUSTICANA	32
2.2.2. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA	32
2.3. POSTUPAK	33
2.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI	34
3. REZULTATI	35
3.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA- STANIČNA LINIJA T24	36
3.1.1. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - MIKROVALNI DESTILAT	36
3.1.2. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - MIKROVALNI EKSTRAKT	37
3.1.3. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - HIDRODESTILAT	38

<i>3.1.4. ARMORACIA RUSTICANA LIST - MIKROVALNI EKSTRAKT</i>	<i>39</i>
<i>3.1.5. ARMORACIA RUSTICANA LIST - MIKROVALNI DESTILAT.....</i>	<i>40</i>
<i>3.1.6. ARMORACIA RUSTICANA LIST - HIDRODESTILAT</i>	<i>41</i>
<i>3.1.7. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA - MIKROVALNI EKSTRAKT ..</i>	<i>42</i>
<i>3.1.8. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA - MIKROVALNI DESTILAT ...</i>	<i>43</i>
3.2. KARCINOM PLUĆA NEMALIH STANICA - STANIČNA LINIJA A549.....	44
<i>3.2.1. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - MIKROVALNI DESTILAT.....</i>	<i>44</i>
<i>3.2.2. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - MIKROVALNI EKSTRAKT.....</i>	<i>45</i>
<i>3.2.3. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - HIDRODESTILAT</i>	<i>46</i>
<i>3.2.4. ARMORACIA RUSTICANA LIST - MIKROVALNI EKSTRAKT</i>	<i>47</i>
<i>3.2.5. ARMORACIA RUSTICANA LIST - MIKROVALNI DESTILAT.....</i>	<i>48</i>
<i>3.2.6. ARMORACIA RUSTICANA LIST - HIDRODESTILAT</i>	<i>49</i>
<i>3.2.7. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA - MIKROVALNI EKSTRAKT ..</i>	<i>50</i>
<i>3.2.8. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA - MIKROVALNI DESTILAT ...</i>	<i>51</i>
4. RASPRAVA	52
5. ZAKLJUČAK	57
6. LITERATURA.....	59
7. SAŽETAK	62
8. SUMMARY	64
9. ŽIVOTOPIS	66

1. UVOD

1.1. RAK

Rak predstavlja spektar bolesti koje se mogu klasificirati s obzirom na etiologiju, biologiju i kliničku sliku, kao i po načinu liječenja. Osnova svih vrsta raka je da nastaju od zdravih stanica organizma u procesu zloćudne preobrazbe (1). Zloćudna preobrazba očituje se pretjeranim umnožavanjem stanica koje stvaraju tumore i metastaziraju. Zloćudno preobražene stanice su, zbog različitih utjecaja, postale neosjetljive na signale kojima se njihovo ponašanje usklađuje s potrebama organizma (2). Različiti dokazi upućuju da rak nastaje zloćudnom preobrazbom samo jedne zdrave stanice, dakle monoklalnog je podrijetla. U podlozi procesa je mutacija gena koji nadziru stanični ciklus s posljedičnim gubitkom kontrole staničnog umnožavanja. Takve mutacije mogu biti nasljedne, u manjem broju slučajeva, ili somatske kao posljedica djelovanja mutagena ili nasumično uslijed grešaka u umnožavanju DNA (1). No, zloćudne novotvorine u ljudi su redovito posljedica međudjelovanja naslijeđa i brojnih endogenih i egzogenih čimbenika (2). Dugotrajan i složen proces kojim iz zdravog tkiva u više koraka nastaje rak, nazivamo tumorskom progresijom (1).

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

1.1.1. ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI

Onkogeni su geni čija je aktivnost povezana sa zloćudnom preobrazbom stanica. Nastaju promjenom normalnih staničnih gena koje nazivamo protoonkogenima, a koji sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije, kao i za prilagodbu povećanom radnom opterećenju (1,4). Stoga se ti geni nazivaju i mitogenim (4). Njihova visoka evolucijska očuvanost govori o njihovoj važnosti u staničnim procesima (1).

Onkogeni nastaju kada se protoonkogeni izmijene na način da oni sami ili njihovi proteinski produkti postanu aktivniji. Kao posljedica aktivacije onkogeni dolazi do nekontroliranog rasta i diobe stanice, što dovodi do nastanka raka. Dovoljna je promjena u samo jednom alelu da bi se očitovao učinak onkogeni, što znači da takve promjene imaju dominantan učinak. Proteinski produkti onkogeni nazivaju se onkoproteinima. Do aktivacije onkogeni može doći na nekoliko načina; kao posljedica mutacije u samom genu, kao posljedica genske amplifikacije, te translokacije (1).

Funkciju protoonkogeni neposredno ili posredno nadziru tumor supresorski geni. Za razliku od onkogeni čija pojačana aktivnost dovodi do nastanka raka, tumor supresorski geni su geni čiji gubitak ili inaktivacija, njih samih ili proteinskih produkata, dovodi do nastanka raka. Mutacije tumor supresorskih gena imaju recesivan učinak, što znači da je nužna inaktivacija oba alela da bi se očitovao učinak (1,4).

1.1.2. GENOMSKA NESTABILNOST

Istraživanja aktivacije onkogeni i inaktivacije tumor supresorskih gena u različitim premalignim stanjima i zloćudnim tumorima pokazuju da su za zloćudnu preobrazbu stanice nužne susljedne promjene nekoliko protoonkogeni i tumor supresorskih gena. Nakupljanje takvih promjena postupno mijenja fenotipska svojstva normalnih stanica iz kojih se razvijaju različite premaligne tvorbe, iz kojih konačno nastaju zloćudne novotvorine. Mnogostruke somatske mutacije u stanicama raka tumače se genomskom nestabilnošću tih stanica (4).

Genomska nestabilnost nastaje kao posljedica poremećaja u različitim mehanizmima kojima se osigurava niska razina mutacija u genomu stanica. Među tim mehanizmima posebno su važni različiti mehanizmi popravka oštećene DNA, kojima se popravljaju pogreške i oštećenja koja nastaju zbog grešaka u replikaciji DNA ili zbog djelovanja mutageni (1).

1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom mokraćnog mjehura među najčešćim je neoplazmama mokraćnog sustava (5).

U Republici Hrvatskoj, prema podacima za 2016. godinu, posljednji je od pet najčešćih sijela raka u muškarca; uz rak pluća i bronha, prostate, kolona, rektuma, rektosigme i anusa, te predstavlja 5% svih sijela raka u muškaraca. Kod žena predstavlja 2% svih sijela, te je incidencija u žena otprilike 2,5 puta manja nego kod muškaraca (3).

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

1.2.2. PATOHISTOLOGIJA

Karcinom mokraćnog mjehura najčešće potječe iz prijelaznog (urotelnog) epitela (90%). Ostali patohistološki oblici su rak pločastih stanica (3%), adenokarcinom (2%) i rak malih stanica (1%). Tumori urotela su 50-100 puta češći u mokraćnom mjehuru nego na ostalim dijelovima urotrakta (5).

1.2.3. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA

Glavni simptom, koji se očituje u 90% bolesnika, je bezbolna hematurija, mikroskopska ili makroskopska. Također, pojavljuje se učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mokraćnog mjehura ili, rjeđe, simptoma urinarne infekcije. Znakovi lokalnog širenja su hidronefroza, opstipacija, limfedem te palpabilna masa u maloj zdjelici. Kod uznapredovale bolesti pojavljuju se simptomi vezani uz sijela presadnica. Urotelni karcinom najčešće metastazira u trbušne limfne čvorove, jetru, pluća i u kosti (5).

Prilikom fizikalnog pregleda bolest najčešće ostane nezamijećena, osim ako se ne radi o uznapredovanoj ili metastatskoj bolesti, pri čemu se može osjetiti opipljiva masa na mjehuru ili bubregu. Početna evaluacija bolesnika sa sumnjom na rak mjehura podrazumijeva cistoskopiju, procjenu funkcije bubrega i snimanje gornjeg urinarnog trakta, po mogućnosti (CT) urografijom. Za procjenu oštećenja bubrega, potrebno je mjeriti serumsku razinu dušika i kreatinin za sve bolesnike kod kojih postoji sumnja na rak mjehura. Ako se sumnja na metastatsku bolest, prikladna je potpuna krvna slika i potpuni metabolički profil, uključujući razinu alkalne fosfataze i procjenu funkcije jetre. Cistoskopiju treba provesti kod svih bolesnika s makroskopskom hematurijom, te u starijih od 35 godina s mikroskopskom hematurijom, a može se razmotriti i kod mlađih bolesnika s mikroskopskom hematurijom. Bolesnike s hematurijom i rizičnim čimbenicima za rak mokraćnog mjehura (npr. uporaba duhana, iritativni simptomi, izlaganje kemikalijama) treba ispitati cistoskopijom bez obzira na dob. Bolesnici s abnormalnim nalazima citološkog pregleda mokraće ili patologije tkiva trebali bi proći transuretralnu resekciju tumora mjehura (TURBT). Ovaj postupak osigurava bitne histopatološke informacije potrebne za definitivnu dijagnozu i ocjenu, te omogućuje uklanjanje vidljivog tumora i uzorkovanje okolnog mišića za procjenu dubine (6).

Za potvrdu dijagnoze tumora gornjeg dijela urotrakta izvode se retrogradna pijelografija te ureterskopija. Za procjenu proširenosti bolesti koristi se MSCT ili MR abdomena i male zdjelice te RTG prikazom pluća. U slučaju povišene vrijednosti alkalne fosfataze ili prisutnih simptoma vezanih uz koštani sustav, potrebno je učiniti scintigrafiju kostiju (5).

1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

U svrhu izbora odgovarajuće terapije i uspostavljanja adekvatne prognoze bolesti, potrebna je što točnija procjena proširenosti bolesti. Procjena se najčešće izražava TNM klasifikacijom Američkog združenog komiteta za rak (American Joint Committee on Cancer, AJCC) (5).

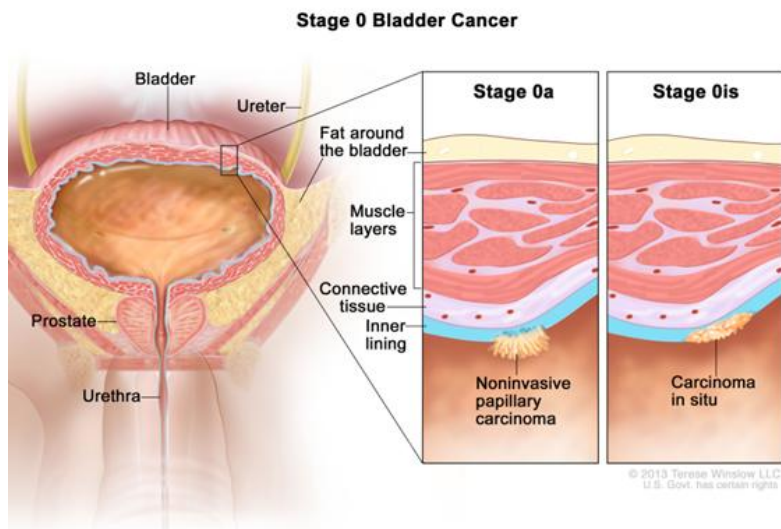
Tablica 1. TNM-klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura

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

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

	<p>T3a, T3b ili T4a</p> <p>N0</p> <p>M0</p>	<p>Karcinom je narastao kroz mišićni sloj mokraćnog mjehura i u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur (T3a ili T3b).</p> <p>Možda se proširio u prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a).</p> <p>Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).</p>
	ILI	
IIIA	<p>T1-4a</p> <p>N1</p> <p>M0</p>	<p>Karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura (T1), ili</p> <p>u mišićni sloj zida mokraćnog mjehura (T2), ili</p> <p>u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur, (T3a ili T3b) ili</p> <p>se možda proširio na prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a)</p> <p>i karcinom se proširio na obližnji limfni čvor u zdjelici (N1).</p> <p>Karcinom se nije proširio na udaljena mjesta (M0).</p>
IIIB	<p>T1-T4a</p> <p>N2 ili N3</p> <p>M0</p>	<p>karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura (T1), ili</p> <p>u mišićni sloj zida mokraćnog mjehura (T2), ili</p> <p>u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur, (T3a ili T3b) ili</p> <p>se možda proširio na prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a)</p> <p>i karcinom se proširio na 2 ili više limfnih čvorova u zdjelici (N2) ili u limfne čvorove duž zajedničke ilijačne arterije (N3).</p> <p>Karcinom se nije proširio na udaljena mjesta (M0).</p>

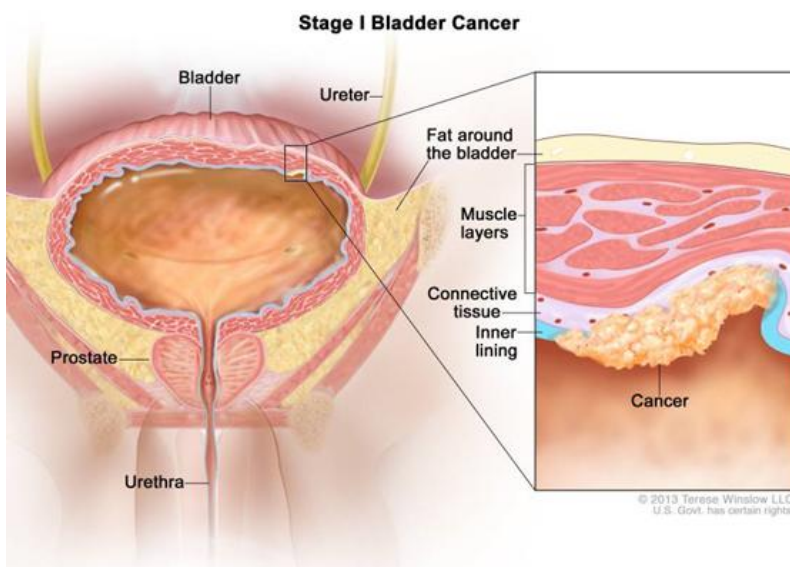
IVA	T4b	Karcinom je izrastao kroz zid mokraćnog mjehura u zdjelicu zdjelice ili trbušne zidove (T4b).
	N0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (NE) ili na udaljena mjesta (M0).
	M0	
ILI		
	Bilo koji T	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T).
	Bilo koji N	Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N).
	M1a	Proširio se na udaljeni skup limfnih čvorova (M1a).
IVB	Bilo koji T	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T).
	Bilo koji N	Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N).
	M1b	Proširio se na 1 ili više udaljenih organa (kosti, jetra ili pluća) (M1b).



Slika 1. Stadij 0 (neinvazivni papilarni karcinom i karcinom in situ)

(Preuzeto: s

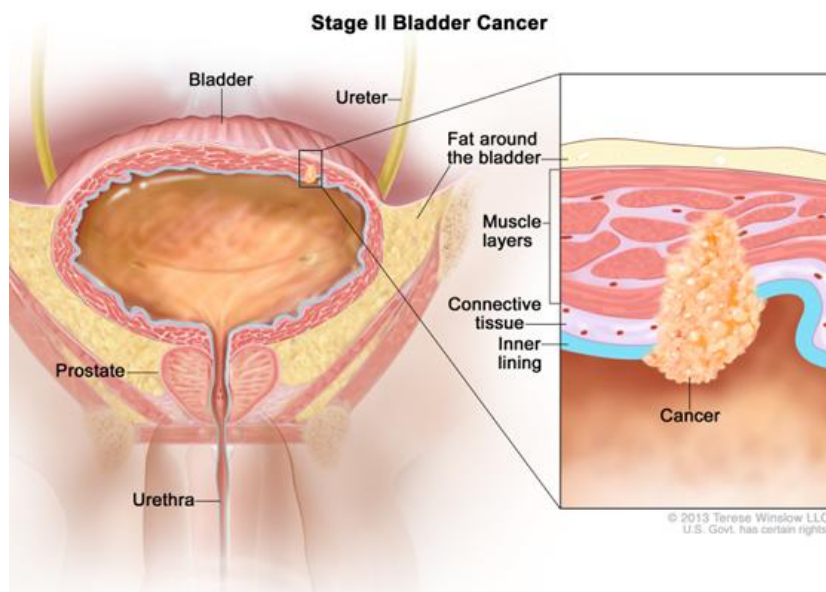
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)



Slika 2. Stadij 1 karcinoma mokraćnog mjehura

(Preuzeto: s

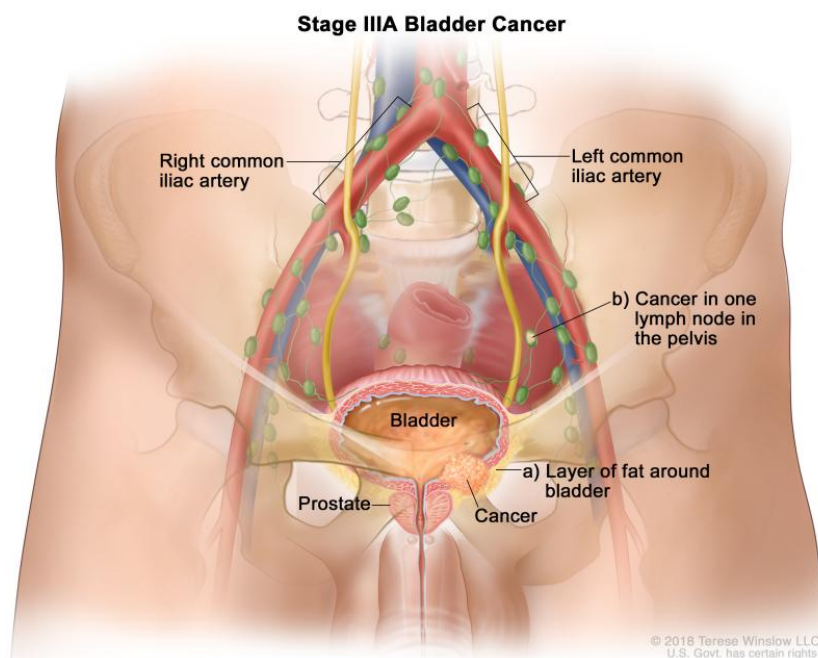
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)



Slika 3. Stadij 2 karcinom mokraćnog mjehura

(Preuzeto: s

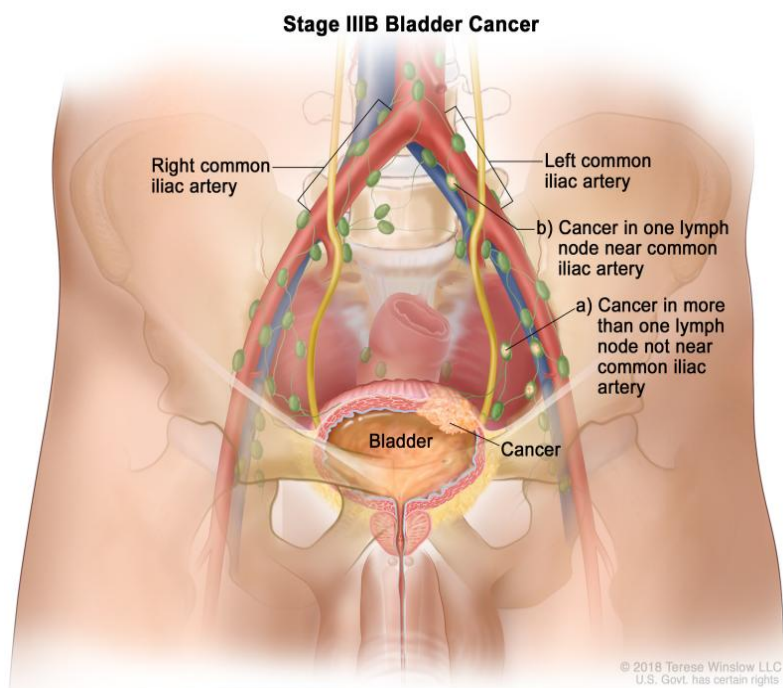
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)



Slika 4. Stadij 3A karcinoma mokraćnog mjehura

(Preuzeto: s

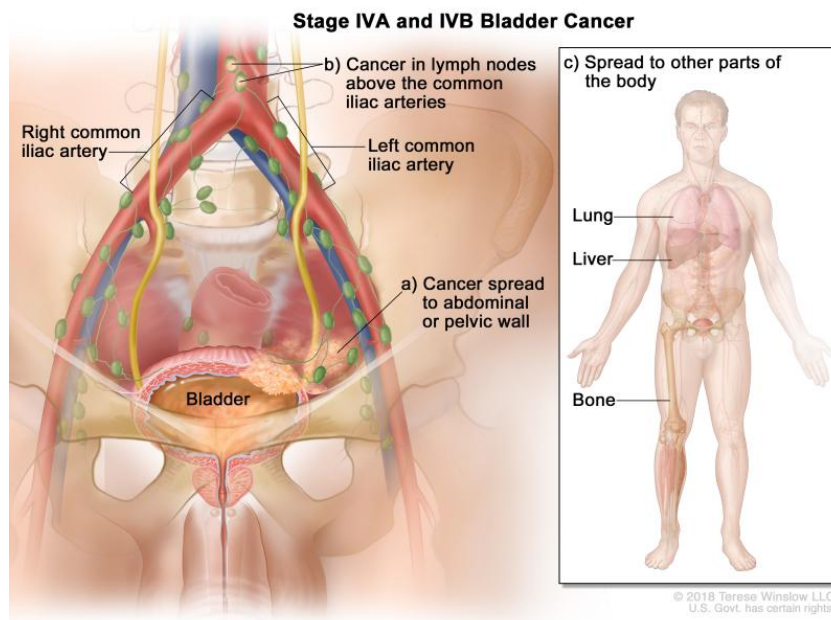
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)



Slika 5. Stadij 3B karcinoma mokraćnog mjehura

(Preuzeto: s

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)



Slika 6. Stadiji 4A i 4B karcinoma mokraćnog mjehura

(Preuzeto: s

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116)

1.2.5. LIJEČENJE RAKA PRIJELAZNOG EPITELA

Liječenje se temelji na stupnju raširenosti bolesti. Stoga se razlikuje pristup neinvazivnom (površinskom) i mišićno-invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti (5).

Primarni oblik liječenja površinskog raka mokraćnog mjehura je transuretralna endoskopska resekcija (TUR). S obzirom na visoku stopu lokalnog povratka bolesti, nakon resekcije, potrebno je u tromjesečnim intervalima ponavljati cistoskopiju. Adjuvantno se intravezikalno aplicira imunoterapija ili kemoterapija. U imunoterapiji površinskog karcinoma mokraćnog mjehura primjenjuje se BCG (Bacillus Calmette-Guérin), dok se od citostatika najčešće primjenjuje mitomicin C (mora se aplicirati unutar 24 h nakon transureteralne resekcije te po potrebi ponoviti primjenu). Doksorubicin se primjenjuje rjeđe. Nakon aplikacije citostatika bolesnik ne smije mokriti jedan sat te mora hodati, kako bi se zadržao kontakt lijeka s endotelom. Intravezikalna imunoterapija i kemoterapija produljuju preživljenje bez znakova bolesti te smanjuju broj recidiva (5).

Svi invazivni karcinomi mokraćnog mjehura visokog su stupnja zloćudnosti. Osnovni oblik liječenja invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura jest radikalna cistektomija, s neoadjuvantnom kemoterapijom temeljenoj na cisplatinu. Primjena adjuvantne kemoterapije ovisna je o patohistološkoj slici tumora, statusu regionalnih limfnih čvorova i stadiju bolesti. Rjeđe se primjenjuje parcijalna cistektomija. U određenih se bolesnika može provesti konkomitantna kemoiradijacija (usporedna aplikacija radioterapije i kemoterapije temeljene na cisplatinu) u svrhu očuvanja mokraćnog mjehura. Bolesnici koji zbog općeg stanja ili znatnog komorbiditeta ne mogu tolerirati kemoradioterapiju, izlažu se samo zračenju. Metastatska bolest može se tretirati kemoterapijom i imunoterapijom. Od citostatika rabe se cisplatin, metotreksat, doksorubicin, vinblastin, gemcitabin i paklitaksel. Danas je standardna prvolinijska terapija kombinacija cisplatine i gemcitabina. Za pacijente koji ne podnose tretman cisplatinom u 1. liniju liječenja može se primijeniti imunoterapija atezolizumabom ili pembrolizumabom. U 2. liniji liječenja anti-PD1 ili anti-PDL1 imunoterapija je preferirana terapijska opcija pred citostatskom terapijom (vinflunin, taksani) (5).

1.3. RAK PLUĆA

1.3.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA

Rak pluća najčešći je rak u muškaraca i treći najčešći rak u žena. U 2018. bilo je 2 milijuna novih slučajeva (7). Prema podacima za 2016. godinu za Republiku Hrvatsku, rak pluća čini 17% novih slučajeva raka u muškaraca, te 8% u žena (3). Rak pluća je vodeći uzrok smrti kod muškaraca, te vodeći uzrok smrti od raka kod žena u 28 zemalja. Najviše stope incidencije kod žena vidljive su u Sjevernoj Americi, Sjevernoj i Zapadnoj Europi (osobito u Danskoj i Nizozemskoj), Kini, Australiji i Novom Zelandu, sa Mađarskom na vrhu popisa (8). Vrh incidencije pojavljuje se u osmom desetljeću života (9).

Najvažniji čimbenik rizika za obolijevanje od raka pluća jest aktivno pušenje cigareta, cigara ili lula. U cigareti postoji više od 3000 spojeva, od kojih je preko 50 kancerogeno. Izravna je veza između vjerojatnosti razvoja raka pluća i broja popušanih cigareta. Pasivno pušenje također povećava rizik od razvoja raka pluća. U onih koji su prestali pušiti primjećuje se znatno smanjenje incidencije raka pluća 5 godina nakon prestanka pušenja. Učestalost raka pluća veća je u ljudi nižeg socioekonomskog statusa i obrazovanja, što se povezuje s njihovom češćom navikom pušenja, kao i većom izloženošću ostalim čimbenicima rizika. Učestalost raka pluća veća je u područjima većeg stupnja onečišćenosti zraka, poput urbanih sredina, što potvrđuje važnu ulogu inhalacijskih karcinogena u razvoju raka pluća. Od inhalacijskih karcinogena od važnosti je istaknuti benzpiren, azbest (povezan s 3-4% svih karcinoma pluća), radioaktivne materijale (prvenstveno radon), nikel, krom te arsen (9).

Rak pluća nastaje kao rezultat niza mutacija koje mogu biti stečene tijekom života ili naslijeđene. Među njima vrijedi istaknuti:

EGFR (*epidermal growth factor receptor*) mutacija- oko 10% bijelaca s rakom pluća nemalih stanica i 40% Azijaca s istom bolešću

ALK (*anaplastic lymphoma kinase*)- EML 4 fuzija- 20-30% bolesnika s adenokarcinomom pluća

KRAS mutacija- 20-30% bolesnika s adenokarcinomom pluća

Pozitivna obiteljska anamneza važan je čimbenik rizika, pa tako osoba čiji je bar jedan roditelj imao rak pluća ima pet puta veći rizik za nastanak ove bolesti (9).

1.3.2. KLINIČKA SLIKA

Najčešći početni simptomi raka pluća jesu kašalj (primarno u 75% bolesnika), hemoptiza (57% bolesnika, u 5% prvi simptom), zaduha, bol u prsištu, te recidivirajuće ili

perzistirajuće infekcije respiratornog trakta. U 10-15% bolesnika javljaju se nespecifični inicijalni simptomi poput gubitka na tjelesnoj masi, slabosti i anoreksije (9).

Činjenica koja otežava dijagnozu bolesti jest što pušači često takve simptome imaju i otprije, posebno tzv. „pušački kašalj“, zaduhu zbog razvoj emfizema ili epizode akutizacije kroničnog bronhitisa (9).

U uznapredovaloj fazi bolesti ističu se simptomi koji su posljedica invazije okolnih struktura. Pri opstrukciji gornje šuplje vene bolesnik je pletoričan, nabreklih vratnih vena, s oteklinama lica, vrata i ruku, guši se, posebno u ležećem položaju. Zahvaćeni limfni čvorovi ispod karine i u donjem sredoprsju mogu pritiskati jednjak uzrokujući otežano gutanje i ponekad posljedičnu aspiracijsku pneumoniju. Kao posljedica zahvaćanja rekurentnog laringealnog živca pojavljuje se promuklost. Kod 2% oboljelih od raka pluća razvija se paraneoplastični sindrom. Simptomi raka pluća mogu bit i rezultat širenja bolesti krvlju, najčešće u jetru, nadbubrežnu žlijezdu, kosti, mozak i pluća (9).

1.3.3. DIJAGNOSTIKA I KLASIFIKACIJA

Ako se na temelju anamneze i/ili kliničkog pregleda pokaže sumnja na postojanje raka pluća, obvezno napraviti RTG pregled pluća koji će, ukoliko tumor postoji, a ovisno o lokalizaciji, pokazati centralno ili periferno smještenu sjenu, odnosno pleuralni izljev, atelektazu, promjene u medijastinumu koje upućuju na limfadenopatiju. CT toraksa nadmoćna je pretraga u usporedbi s RTG-om, pogotovo u slučaju procjene ekstenzije tumora te u detekciji povećanih medijastinalnih limfnih čvorova. Dijagnoza raka pluća uspostavlja se na osnovi patohistološke (poželjnije)/citološke potvrde bolesti (9).

Najvažnije su 4 vrste raka pluća: adenokarcinom (40-45%), rak pločastih stanica (30%), rak velikih stanica (10-15%), rak malih stanica (15%). Zbog razlika u kliničkoj prezentaciji, prognozi i terapijskom pristupu dijelimo ih u dvije skupine; prve tri vrste zajedno tvore skupinu raka pluća nemalih stanica (*non small cell lung cancer*, NSCLC) prema raku pluća malih stanica (*small lung cancer*, SCLC) (9).

Nakon uspostavljanja citološke/patohistološke dijagnoze i utvrđivanja lokoregionalnog statusa bolesti, dodatnim pretragama treba utvrditi postoji li udaljena diseminacija. Presadnice u jetri i nadbubrežnim žlijezdama otkrivaju se CT-om gornjeg abdomena, a presadnice u mozak MR-om (ili CT-om) mozga. Ako se u ovoj fazi obrade bolesnika s rakom malih stanica

ne nađe postojanje ekstenzivne bolesti, indicirana je scintigrafija skeleta, a biopsija koštane srži dolazi u obzir samo kod bolesnika s patološkim laboratorijskim nalazima (neutropenija, trombocitopenija). S druge strane, u bolesnika s rakom nemalih stanica nije indicirana rutinska primjena scintigrafije skeleta za otkrivanje asimptomatskih presadnica kosti, dok je MR ili CT mozga opravdan u bolesnika sa stadijem II. ili većim (9).

Za određivanje stadija bolesti primjenjuje se TNM klasifikacija(AJCC-*American Joint Comittee on Cancer*).

Tablica 2. Stadiji bolesti, petogodišnje preživljenje (9)

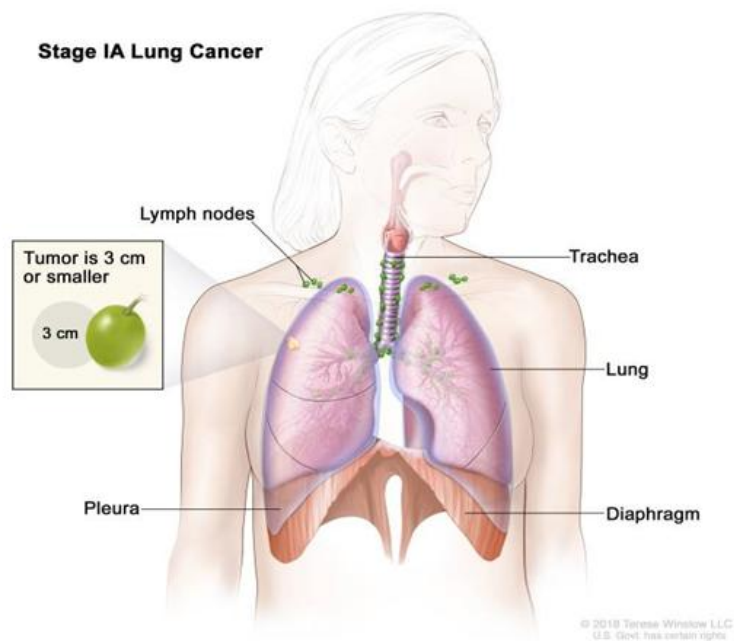
Stadij 0	Tis	N0	M0	
Stadij IA1	T1a (mi)	N0	M0	49%
	T1a	N0	M0	
	Stadij IA2	T1b	N0	
Stadij IA3	T1c	N0	M0	
Stadij IB	T2a	N0	M0	45%
Stadij IIA	T2b	N0	M0	30%
Stadij IIB	T1a-c	N1	M0	31%
	T2a	N1	M0	
	T2b	N1	M0	
	T3	N0	M0	
Stadij IIIA	T1a-c	N2	M0	14%
	T2a-b	N2	M0	
	T3	N1	M0	
	T4	N0	M0	
	T4	N1	M0	
Stadij IIIB	T1a-c	N3	M0	5%
	T2a-b	N3	M0	
	T3	N2	M0	
	T4	N2	M0	
Stadij IIIC	T3	N3	M0	
	T4	N3	M0	

Stadij IV A	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a	1%
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b	
Stadij IV B	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c	

Tablica 3. TNM klasifikacija karcinoma pluća (9)

Primarni tumor (T)	
TX	Primarni se tumor ne može procijeniti ili je tumor dokazan prisutnošću zloćudnih stanica u sputumu ili bronhalnom ispirku, ali se ne može vizualizirati slikovnim metodama ili bronhoskopijom
T0	Nema dokaza o postojanju tumora
Tis	karcinom in situ
T1	tumor ≤ 3 cm u najvećem promjeru, okružen plućima ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopskog dokaza invazije proksimalno od lobarnog bronha (npr. tumor nije vidljiv u glavnom bronhu)
T1a(mi)	minimalno invazivan karcinom
T1a	tumor ≤ 1 cm u najvećem promjeru
T1b	tumor > 1 cm, ali ≤ 2 cm u najvećem promjeru
T1c	tumor > 2 cm, ali ≤ 3 cm u najvećem promjeru
T2	tumor > 3 cm, ali ≤ 5 cm ili tumor sa bilo kojom od navedenih značajki: zahvaća glavni bronh neovisno o udaljenosti od karine ali ne zahvaća karinu, invadira visceralnu pleuru, povezan je s atelektazom ili opstruktivnim pnmeumonitisom koji se širi u hilarnu regiju te zahvaća dio ili cijela pluća
T2a	tumor > 3 cm, ali ≤ 4 cm u najvećem promjeru
T2b	tumor > 4 cm, ali ≤ 5 cm u najvećem promjeru
T3	tumor > 5 cm, ali ≤ 7 cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u istom režnju kao i primarni tumor ili tumor koji direktno zahvaća bilo koju od sljedećih struktura: stijenku prsnog koša

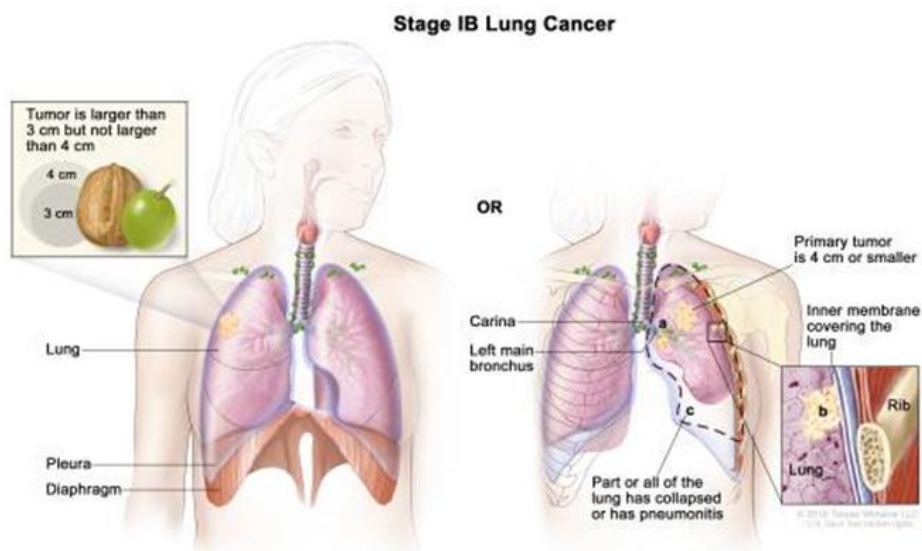
	(uključujući parijetalnu pleuru i tumore gornjeg sulkusa), frenički živac, parijetalni perikard
T4	Tumor > 7cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u različitom režnju ipsilateralnog pluća kao i primarni tumor ili tumor bilo koje veličine koji direktno zahvaća bilo koju od sljedećih struktura: ošit, medijastinum, srce, velike krvne žile, traheju, nervus laryngeus recurrens, jednjak, kralježnicu i karinu
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Nx	Ne može se procijeniti zahvaćenost limfnih čvorova
N0	Bez presadnica u regionalne limfne čvorove
N1	Presadnice u ipsilateralne peribronhalne i/ili ipsilateralne hilarne limfne čvorove i intrapulmonalne čvorove, uključujući i direktnu zahvaćenost
N2	Presadnice u ipsilateralne medijastinalne i/ili supkarinalne limfne čvorove
N3	Presadnice u kontralateralne medijastinalne, kontralateralne hilarne, ipsilateralne ili kontralateralne skalenske ili supraklavikularne limfne čvorove
Udaljene presadnice (M)	
Mx	Nepoznato
M0	Bez udaljenih presadnica
M1	Prisutne udaljene presadnice
M1a	Odvojeni tumorski čvorovi u kontralateralno pluće; tumor sa pleuralnim ili perikardijalnim čvorovima ili maligni pleuralni ili perikardijalni izljev
M1b	Jedna ekstratorakalna presadnica
M1c	Multiple ekstratorakalne presadnice u jedan ili više organa



Slika 7. Stadij IA rak pluća

(Preuzeto s :

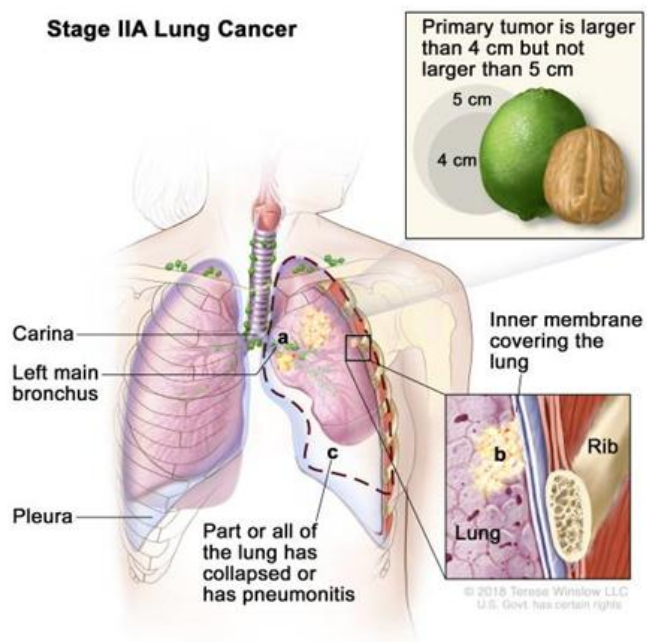
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ151oK-kynjs9E>)



Slika 8. Stadij IB raka pluća

(Preuzeto s:

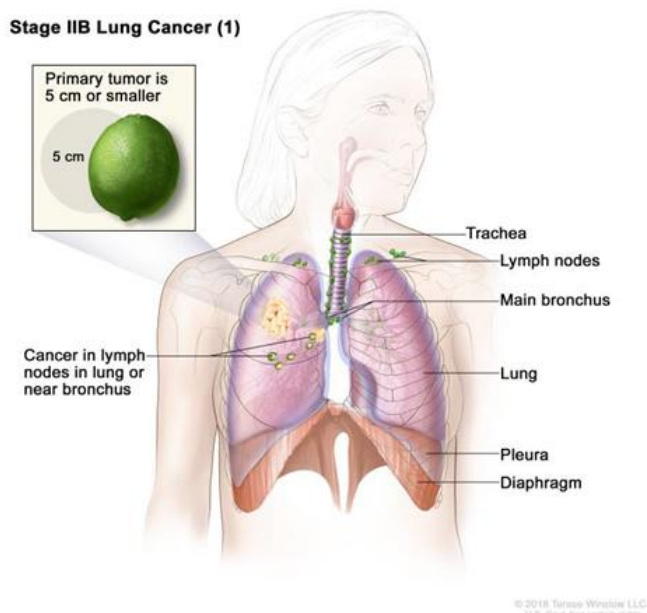
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ151oK-kynjs9E>)



Slika 9. Stadij IIA raka pluća

(Preuzeto s:

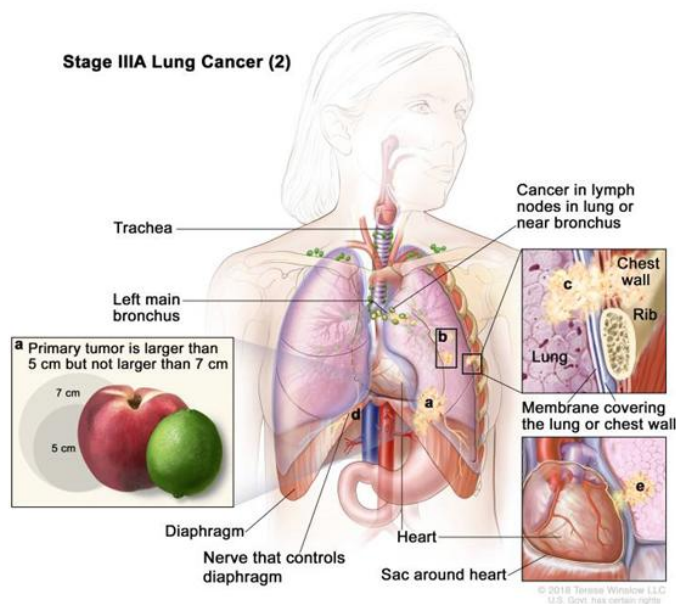
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ151oK-kynjs9E\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ151oK-kynjs9E)



Slika 10. Stadij IIB raka pluća

(Preuzeto s:

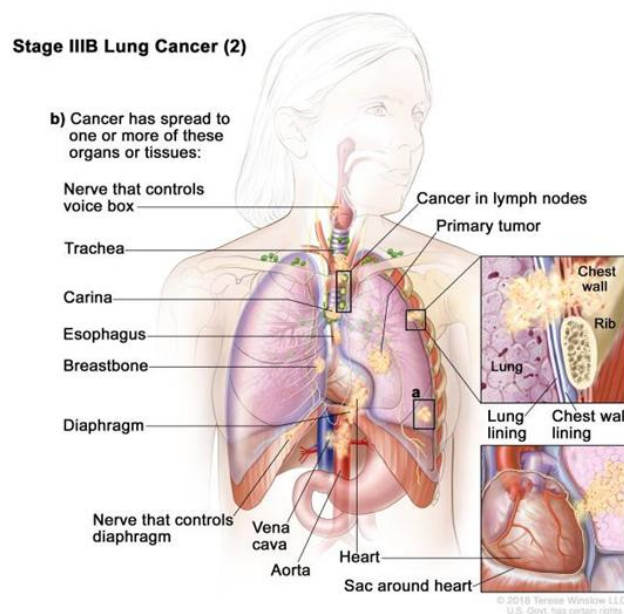
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ151oK-kynjs9E\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ151oK-kynjs9E)



Slika 11. Stadij IIIA raka pluća

(Preuzeto s:

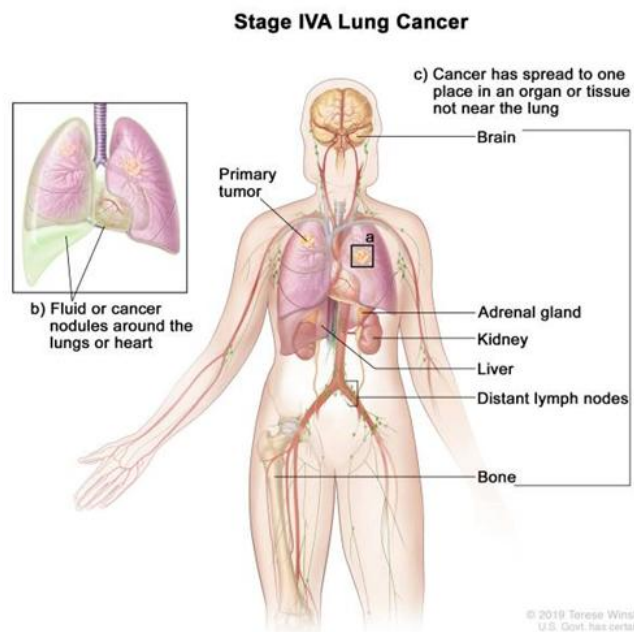
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ15loK-kynjs9E>)



Slika 12. Stadij IIIB raka pluća

(Preuzeto s:

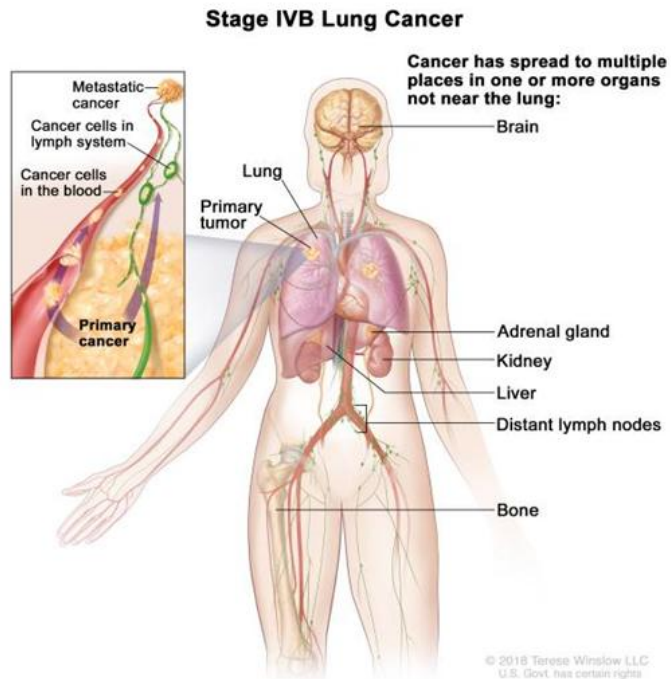
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3G1kIuQ15loK-kynjs9E>)



Slika 13. Stadij IVA raka pluća

(Preuzeto s:

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



Slika 14. Stadij IVB raka pluća

(Preuzeto s:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/?fbclid=IwAR0zf31nndGgmYAjUsTnzC4XTVFLIBRjxolfg1c3GlkIuQ15loK-kynjs9E>)

Budući da većina bolesnika sa rakom malih stanica pri postavljanju dijagnoze ima proširenu bolest (dijagnosticiranu ili okultnu), preživljenje obično nije u vezi s preciznom definiranošću lokoregionalne uznapredovalosti bolesti. Zato se u bolesnika sa rakom malih stanica i dalje često rabi jednostavna podjela (*Veterans Administration Lung Cancer Study Group*) na dvije skupine; ograničena bolest (unutar ipsilateralnog hemitoraksa te se može obuhvatiti jednim radioterapijskim poljem), ili proširena bolest (širi se izvan hemitoraksa ili postoji zloćudni pleuralni izljev, odnosno udaljena diseminacija) (9).

1.3.4. LIJEČENJE

Optimalan način liječenja ovisi o stadiju bolesti pri dijagnozi, vrsti raka te bolesnikovu općem stanju.

RAK PLUĆA NEMALIH STANICA:

Kirurški zahvat (lobektomija, pneumektomija, rjeđe segmektomija) provodi se u bolesnika zadovoljavajućeg općeg stanja i kardiorespiracijskog statusa sa stadijima bolesti I. ili II., te u manjeg broja bolesnika u stadiju III (bez zahvaćenosti ili s minimalnom

zahvaćenosti medijastinalnih limfnih čvorova). Ako se bolesnik stadija bolesti I. i II. proglasi inoperabilnim u obzir dolazi radikalna iradijacija tumora. U bolesnika s potvrđenim/suspektnim širenjem bolesti u medijastinum prije eventualnog kirurškog zahvata provodi se liječenje neoadjuvantnom kemo(radio)terapijom. U onih s lokoregionalno uznapredovalom bolešću koji nisu kandidati za kirurški zahvat, a dobrog su općeg stanja, preporučuje se primarna konkomitantna kemoradioterapija. Bolesnici lošijeg općega stanja liječe se sekvencijski radioterapijom i kemoterapijom ili samo jednim, odnosno samo potpornom simptomatskom terapijom (9).

Osnovu liječenja bolesnika s diseminiranom bolešću čini kemoterapija. Bolesnicima dobrog općeg stanja ordinira se kemoterapija koja se temelji na kombinacijama spojeva platine (prvenstveno cisplatina, rjeđe karboplatina) s drugim citostaticima, poglavito gemcitabinom, paklitakselom, docetakselom, pemetreksedom, vinorelbinom, etopozidom. Navedenom se terapijom postiže stopa odgovora 20 do 35%, a preživljenje se produljuje za nekoliko mjeseci u usporedbi sa simptomatskom potpornom terapijom. Bolesnicima lošijeg općeg stanja i/ili onima starije životne dobi prikladno je ordinirati monokemoterapiju. Novija klinička istraživanja pokazala su da odgovor na pojedine citostatike ovisi i o histološkom tipu tumora. Posljednjih godina u svakodnevnu kliničku praksu implementirana je tzv. ciljane terapija koja svoj učinak ostvaruje inhibicijom pojedinih staničnih signalnih puteva koji inače omogućuju staničnu proliferaciju. Najveći iskorak u ciljanoj terapiji bolesnika s rakom nemalih stanica postignut je primjenom erlotiniba, gefitiniba i afatiniba, tirozin-kinaznih inhibitora EGFR-a, odnosno krizotiniba, ceritiniba i alektiniba, tirozin-kinaznih inhibitora rearaziranog ALK-a (9).

Imunoterapija tzv. inhibitorima kontrolne točke (*check-point inhibitors*), tj. protutijelima usmjerenim na ključne molekule odgovorne za imunosni odgovor, predstavlja najveću novinu u liječenju velikog broja karcinoma, pa tako i raka pluća. Anti PD-1 (*programmed death*) protutijela, kao što su nivolumab, pembrolizumab i anti PD-L1 protutijela (atezolizumab) pokazala su se učinkovitijima u drugoj liniji liječenja od standardne kemoterapije. Kod bolesnika s visokom ekspresijom PD-L1 (>50%) u tumoru, pembrolizumab je postigao dulje ukupno preživljenje od 1.-linijske kemoterapije. Bolesnicima s diseminiranom bolešću se često ordinira i palijativna terapija (presadnice u kosti, mozak, hemoptiza, bolovi) (9).

RAK PLUĆA MALIH STANICA:

A) Ograničena bolest:

Kirurško je liječenje indicirano samo u vrlo male podskupine bolesnika (2-5%), onih u stadiju I. bolesti, nakon čega im se ordinira adjuvantna kemoterapija i profilaktička radioterapija mozga, a u slučaju pozitivnih limfnih čvorova i radioterapija (9). S obzirom na izrazitu kemosenzitivnost raka malih stanica i činjenicu da većina tih bolesnika ima okultne presadnice, osnovu liječenja čini kemoterapija kojom se prosječno preživljenje bolesnika povećava za oko 5 puta. Polikemoterapija daje bolji rezultat od monokemoterapije. Ordiniranjem konkomitantne kemoradioterapije u usporedbi s liječenjem samo kemoterapijom postiže se umjereno, ali statistički značajno produljenje preživljenja. Stoga se standardno liječenje tih bolesnika sastoji od konkomitantne polikemoterapije (kombinacija cisplatina i etopozida) i radioterapije uz stupanj odgovora 70 do 90%. S obzirom da više od 50% bolesnika s rakom malih stanica razvije moždane presadnice, u bolesnika zadovoljavajućeg općeg stanja, koji odgovore na kemo(radio)terapiju indicirano je provođenje profilaktičke iradijacije mozga, čime se statistički značajno poboljšava preživljenje (9).

B) Proširena bolest:

Osnovu liječenja čini kemoterapija (kombinacija cisplatina i etopozida) uz stupanj odgovora 60 do 70%. Radioterapija u ovih bolesnika se može primijeniti u vidu konsolidacijske torakalne radioterapije kod jako dobrog odgovora na primarnu kemoterapiju s ciljem poboljšanja kontrole lokalne bolesti u toraksu. Ipak, češće se primjenjuje palijativna radioterapija kod presadnica u mozgu, kostima, te kod bolesnika sa sindromom gornje šuplje vene. I u ovoj podskupini bolesnika, u slučaju postizanja odgovora na terapiju, indicirana je profilaktička iradijacija mozga. Imunoterapija inhibitorima kontrolne točke pokazuje terapijsku učinkovitost i jedna je od opcija liječenja bolesnika čija je bolest progredirala nakon standardne kemoterapije. Nivolumab sam ili u kombinaciji s ipiliumamabom, postiže stopu objektivnog odgovora 10 do 23% (9).

1.4. KUPUSNJAČE

Kupusnjače, odnosno, *Brassicaceae*, nekada *Cruciferae*, porodica su cvjetnica, te im pripada 338 rodova i oko 3.700 vrsta. Obitelj uključuje mnoge biljke od ekonomskog značaja koje su ljudi u velikoj mjeri izmijenili i udomaćili, osobito one iz roda *Brassica*, koji uključuju kupus, brokulu, prokulicu, kelj, korabu, kinesko zelje, repu i hibridnu repu. Ostale važne poljoprivredne kulture u obitelji su hren, rotkvica i bijeli senf. Brojne vrste uzgajaju se

kao ukrasne biljke, a neki članovi obitelji smatraju se invazivnim vrstama u područjima izvan njihovog izvornog područja (10).

Biljke iz ove obitelji obično su zeljaste i mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili trajnice. Listovi su uglavnom jednostavni i naizmjenično raspoređeni, a mnogi su papreni. Cvjetovi su križasti s četiri latice i četiri čašice; zbog toga se biljke obično nazivaju krstašice. Cvjetovi su obično bijele, žute ili boje lavande i karakteristično se odlikuju četiri duga i dva kratka prašnika te dvokomorni jajnik smješten iznad ostalih dijelova cvijeća. Sjemenke se proizvode u suhim plodovima sličnim lišću, često s pregradama između polovica; dugi tanki plodovi poznati su kao komuške, a kratki zaokruženi plodovi poznati su kao komuščice (10).

Glukozinolati (GLS) su glavna skupina biljnih spojeva koji se pretežito mogu naći u *Brassicaceae* porodici. Nakon staničnog oštećenja, glukozinolati se hidroliziraju djelovanjem mirozinaze na različite bioaktivne produkte (izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, epitionitrili i oksazolidini). Takva indukcija općenito traje neko vrijeme, pa, za razliku od antioksidansa, čije se djelovanje „ugasi“, zaštitni učinak se proširuje zbog prisutnosti izotiocijanata. Izotiocijanati, koji se nalaze u mnogom povrću iz ove skupine, pokazali su kemoprevencijske aktivnosti protiv brojnih kroničnih degenerativnih bolesti, uključujući rak, kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti i dijabetes. *In vivo* ispitivanja pokazala su učinak izotiocijanata protiv kardiovaskularnih bolesti. Rezultati tih studija također impliciraju da unošenje povećanih doza ovih spojeva u organizama može rezultirati štetnim, a ne blagotvornim učincima (11). Izotiocijanati pokazali su zaštitnu aktivnost na živčanom sustavu *in vitro* i *in vivo* testovima smrti neurona odnosno neurodegeneracije. Imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala ili povećanja endogene stanične antioksidativne barijere putem aktivacije Nrf2 transkripcijskog faktora (12, 13). Stalna upala igra ključnu ulogu u mnogim ljudskim bolestima, a izotiocijanati usporavaju aktivnost mnogih upalnih mehanizama, ograničavajući ciklooksigenazu 2 i trajno deaktivirajući makrofag-inhibicijski faktor migracije (11).

1.4.1. ARMORACIA RUSTICANA

Hren (*Armoracia rusticana*), izdržljiva je višegodišnja biljka koja pripada porodici kupusnjača, poznata po izrazito oporom mesnatom korijenu, koji se pretvara u začim ili stolnu delikatesu. Rodom iz mediteranskih zemalja, hren se sada uzgaja u umjerenim zonama i predstavlja problematičnu korov u mnogim hladnim i vlažnim područjima. Korijen se tradicionalno smatra ljekovitim i najčešće se koristi kao zamjena za pravi wasabi (*Eutrema*

japonicum) u japanskoj kuhinji. Veliki, grubi, sjajni zeleni bazalni listovi nastaju iz velikog bijelog korijena. Mali, bijeli cvjetovi s četiri latice nastaju u terminalnim ili aksilarnim grozdovima. Plodovi su male duguljaste mahune poznate kao komuške, nagnute kratkim upornim stilom. Kultivatori propagiraju hren u proljeće stavljanjem dijelova korijenja veličine olovke u tlo pod blagim kutom, s gornjim krajevima dubokim 1–2 cm. Svi, osim terminalnih izbojaka, uklanjaju se kako bi se spriječilo kasnije formiranje višestrukih krunica, a bočni korijeni se također protrljaju kako bi se smanjila grananja i iskrivljena formacija. Korijeni se beru nakon jedne vegetacije te se peru i skraćuju za prodaju (14).

Korijen hrena sadrži visoku razinu vitamina C i glukozinolate, kao sekundarne metabolite. Sinigrin (prop-2-enil-glukozinolat) i glukonasturtiin (2-feniletil glukozinolat) dominantni su glukozinolati koji se nalaze u korijenu hrena. Njihovi razgradni produkti su izotiocijanati: alil (iz sinigrina) i 2-feniletil izotiocijanati (iz glukonasturtiina). Oba izotiocijanata u velikoj su mjeri odgovorna za tipičnu, karakterističnu aromu i pikantnost hrena (15).



Slika 15. *Armoracia rusticana* (hren)

(Preuzeto s: http://plantillustrations.org/species.php?id_species=89564&size=0&mobile=1)

1.4.2. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA

Brassica oleracea var. *gemmifera*, odnosno kelj pupčar, dvogodišnja je zeljasta biljka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*). Stabljika je uspravna i uglavnom nerazgranata, premda se mogu stvoriti nekoliko grana. Pri osnovi je odvrenjela, visine do 100 cm. Listovi su

veliki, nalaze se na dugim peteljcima, obrnuto su jajasti, malo naborani, tamnozeleni. Stvaraju se uzduž stabljike, a u pazušcima listova s gornje strane stvaraju se mali glavičasti pupovi promjera 3-4 cm. Starije biljke odbacuju listove te su na stabljici vidljivi jedino pupovi. U drugoj godini stabljika stvaraju se cvjetovi skupljeni u razgranate grozdaste cvatove. Nalaze se na tankim i kraćim peteljcima, dvospolni su i pravilni. Sastavljeni su od čaške koju čine četiri uspravna, zelena lapa i vjenčića, kojeg čine četiri žute latice. Prašnika je šest i pri dnu se nalaze nektariji. Plod je komuška koji sadrži mnogobrojne male okruglaste crvenkaste sjemenke. Ime vrste *oleracea* epitet je koji znači da je upotrebljiv kao povrće (16).



Slika 16. *Brassica oleracea* var. *gemmifera* (kelj pupčar)

(Preuzeto s: <https://www.britannica.com/plant/Brussels-sprouts>)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja jest utvrditi citotoksično djelovanje ekstrakata određenih dijelova biljaka od odabranih biljaka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura T24 i te raka pluća nemalih stanica A549. U istraživanju su korišteni mikrovalni destilati i mikrovalni ekstrakti biljnih vrsta *Armoracia rusticana*; korijena i lista, te *Brassica oleracea* var. *Gemmifera*, te hidrodestilati biljne vrste *Armoracia rusticana*, korijena i lista.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. STANIČNE LINIJE

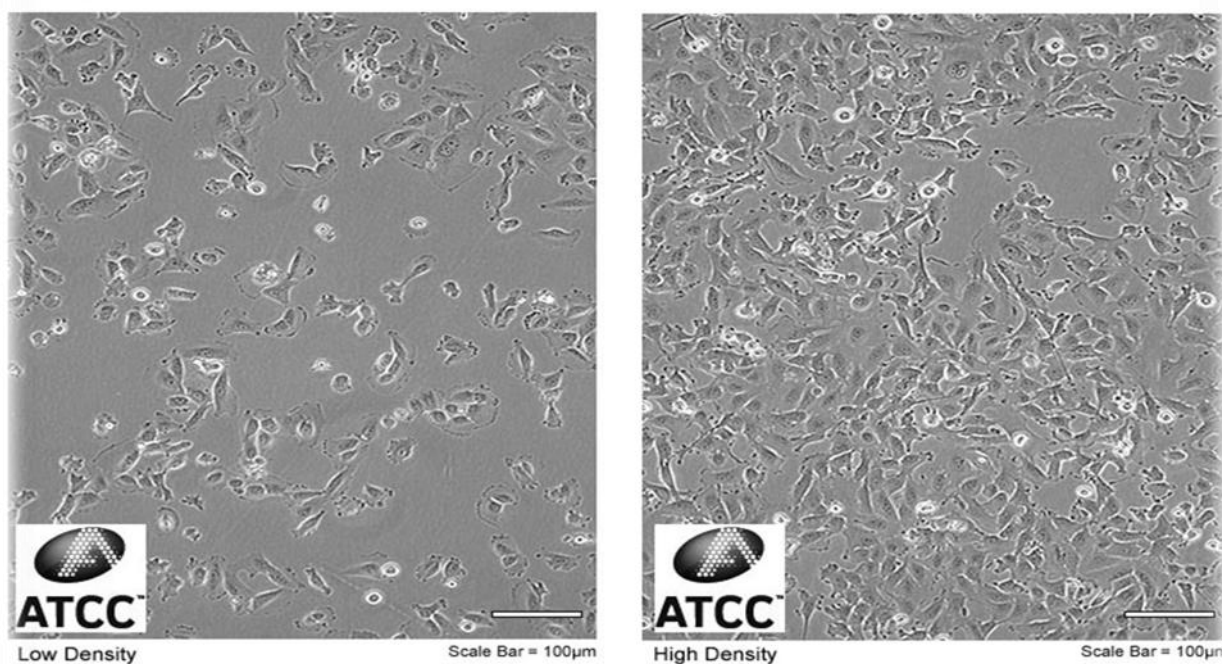
In vitro istraživanje ispitivanja djelovanja određenih biljaka iz porodice kupusnjača se provodilo na karcinomskim stanicama T24 i A549. Obilježja tih staničnih linija su prikazana u tablicama.

Tablica 4. Obilježja T24 stanične linije

(preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org>)

Organizam	<i>Homo Sapiens</i> , čovjek
Tkivo	Mokraćni mjehur
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	Karcinom prijelaznih stanica
Dob i spol	81 godina, žena

ATCC Number: **HTB-4**™
Designation: **T24**



Slika 17. Karcinomske stanice T24 stanične linije

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

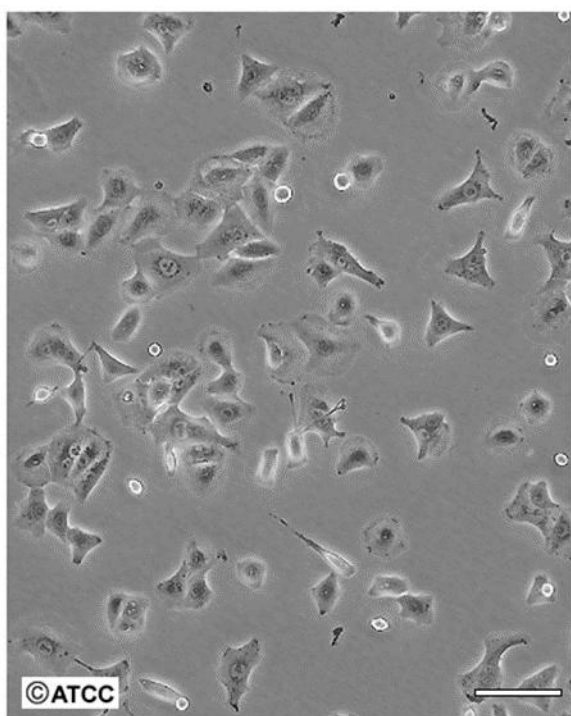
Tablica 5. Obilježja A549 stanične linije

(preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org>)

Organizam	<i>Homo Sapiens</i> , čovjek
Tkivo	plućać
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	Karcinom pluća
Dob i spol	Muškarac, 58 godina

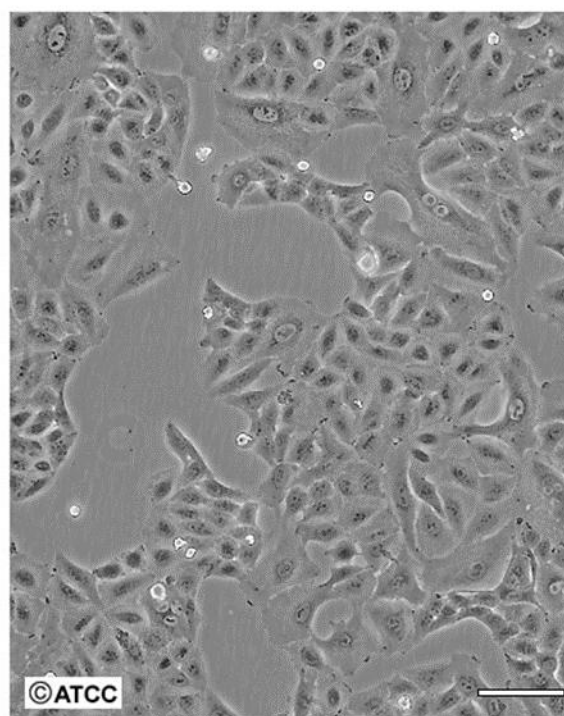
ATCC Number: **CCL-185**

Designation: **A-549**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Slika 18. Karcinomske stanice A549 stanične linije

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

2.2. BILJNI MATERIJALI

2.2.1. ARMORACIA RUSTICANA

Tablica 6. Taksonomija biljne vrste *Armoracia rusticana*

(preuzeto s: *Flora Croatica Database*

<https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=1305&taxon=Armoracia+rusticana+P.+Gaertn.+%2c+B.+Mey.+et+Scherb.>)

Red	Brassicales
Porodica	<i>Brassicaceae</i> (alt. <i>Cruciferae</i> , hr krstašice)
Rod	<i>Armoracia</i>
Vrsta	<i>Armoracia rusticana</i> P. Gaertn. , B. Mey. et Scherb.
Uobičajeni naziv	Hren, andrkva ledinja (divja), hrelj, hrin, hrinj, kren, rotkva morska, torman, hren čepasti, hren ljuti, ren

2.2.2. BRASSICA OLERACEA VAR GEMMIFERA

Tablica 7. Taksonomija biljne vrste *Brassica oleracea* var *gemmifera*

(Preuzeto s: *Flora Croatica Database*

[https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=1837&taxon=Brassica+oleracea+L.+ssp.+gemmifera+\(DC.\)+O.+Schwarz](https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=1837&taxon=Brassica+oleracea+L.+ssp.+gemmifera+(DC.)+O.+Schwarz))

Red	Brassicales
Porodica	<i>Brassicaceae</i> (alt. <i>Cruciferae</i> , hr krstašice)
Rod	<i>Brassica</i>
Vrsta	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Gemmifera</i> (DC) O. Schwarz
Uobičajeni naziv	Kelj pupčar

2.3. POSTUPAK

Nakon odmrzavanja stanične linije su uzgojene u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru na temperaturi 37°C uz 5% CO₂. DMEM medij sadrži potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline i minerali i Red fenol indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti, a dodaju mu se još FBS (goveđi serum) te antibiotici penicilin/streptomycin.

Adherirane stanice, nakon uklanjanja DMEM-a, odvajaju se od podloge enzimom tripsinom.

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

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

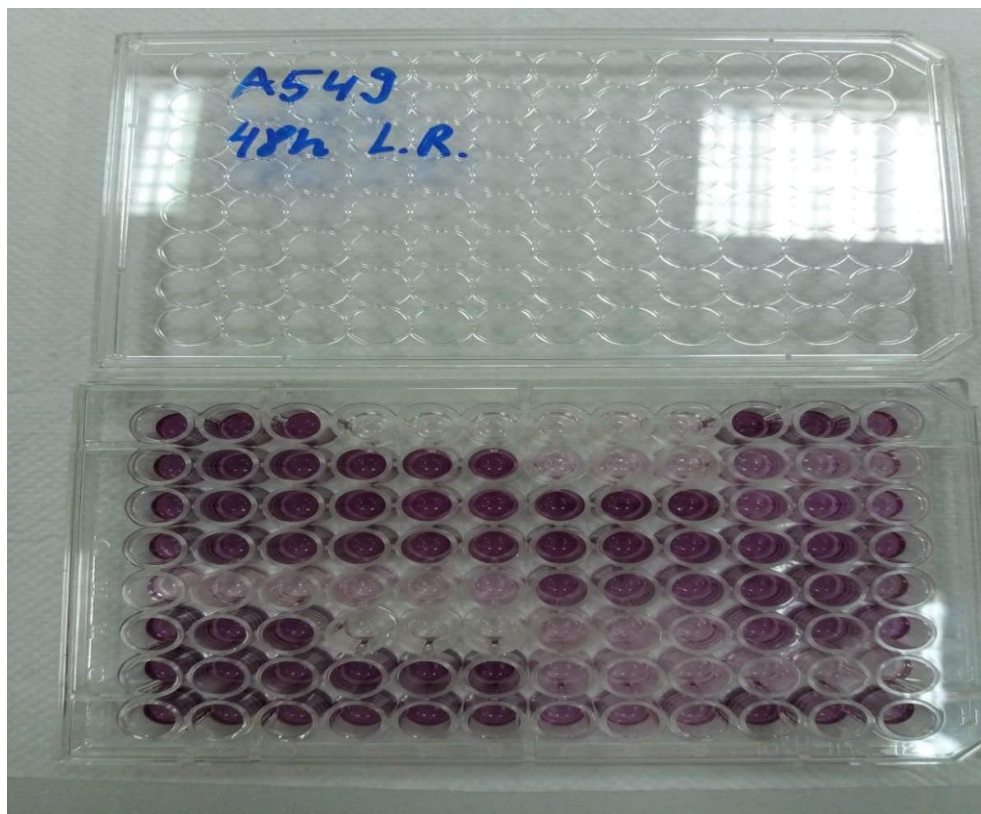


Slika 19. Vlažni inkubator za uzgoj stanica

(Preuzeto s: <http://www.nuve.com.tr/>)

2.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

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



Slika 20. Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO

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

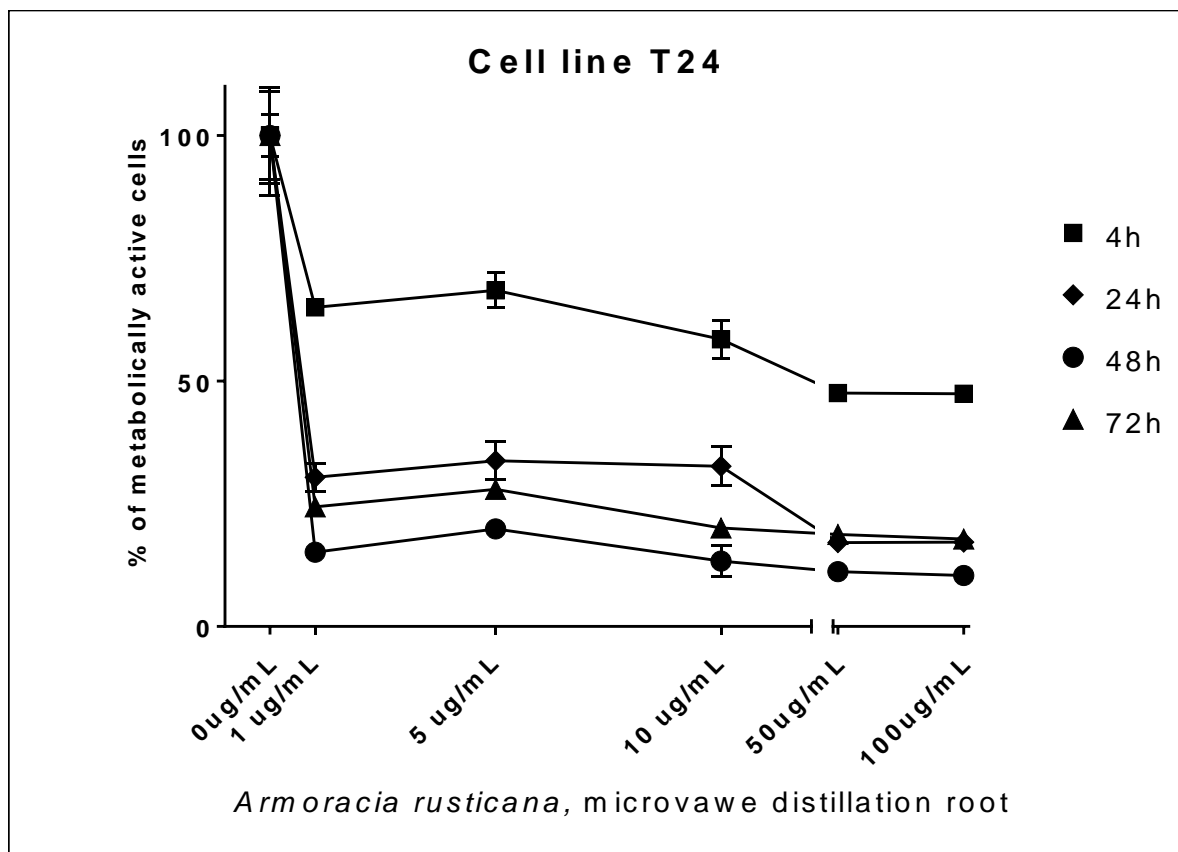
3. REZULTATI

Empirijska obrada:

Kao ograničenje uzima se premala serija podataka.

3.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA- STANIČNA LINIJA T24

3.1.1. *ARMORACIA RUSTICANA* KORIJEJEN - MIKROVALNI DESTILAT

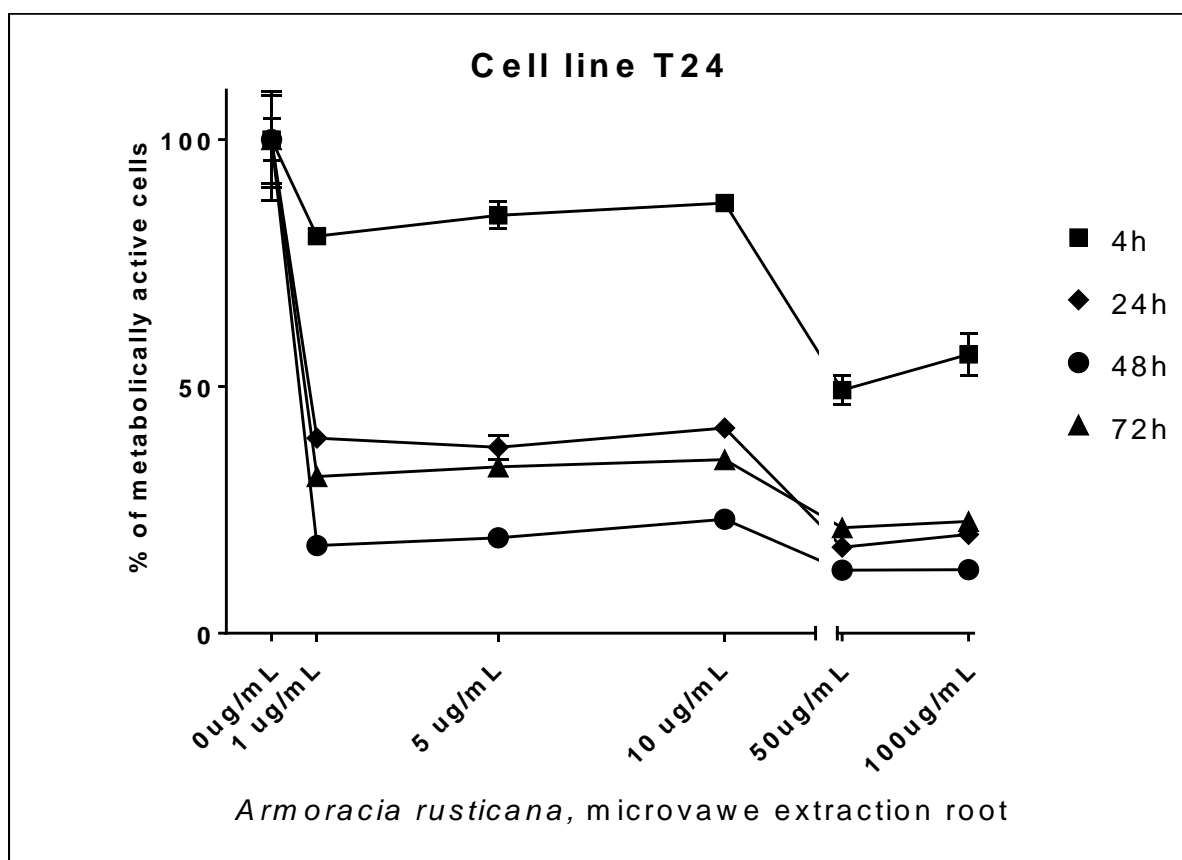


	4h	24h	48h	72h	
IC50 (ug/mL)		32.13	0.9748	0.2745	0.5599

Slika 21. Mikrovalni destilat korijena hrena

Mikrovalni destilat korijena hrena pokazuje značajan učinak pri svim koncentracijama već nakon 24 h. Daljnjom inkubacijom postotak metabolički aktivnih stanica i dalje opada do 48 h, te je najmanji za koncentraciju 100 $\mu\text{g/mL}$ nakon 48 h. Daljnjom inkubacijom, odnosno nakon 72 h, broj metabolički aktivnih stanica je neznatno veći.

3.1.2. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - MIKROVALNI EKSTRAKT

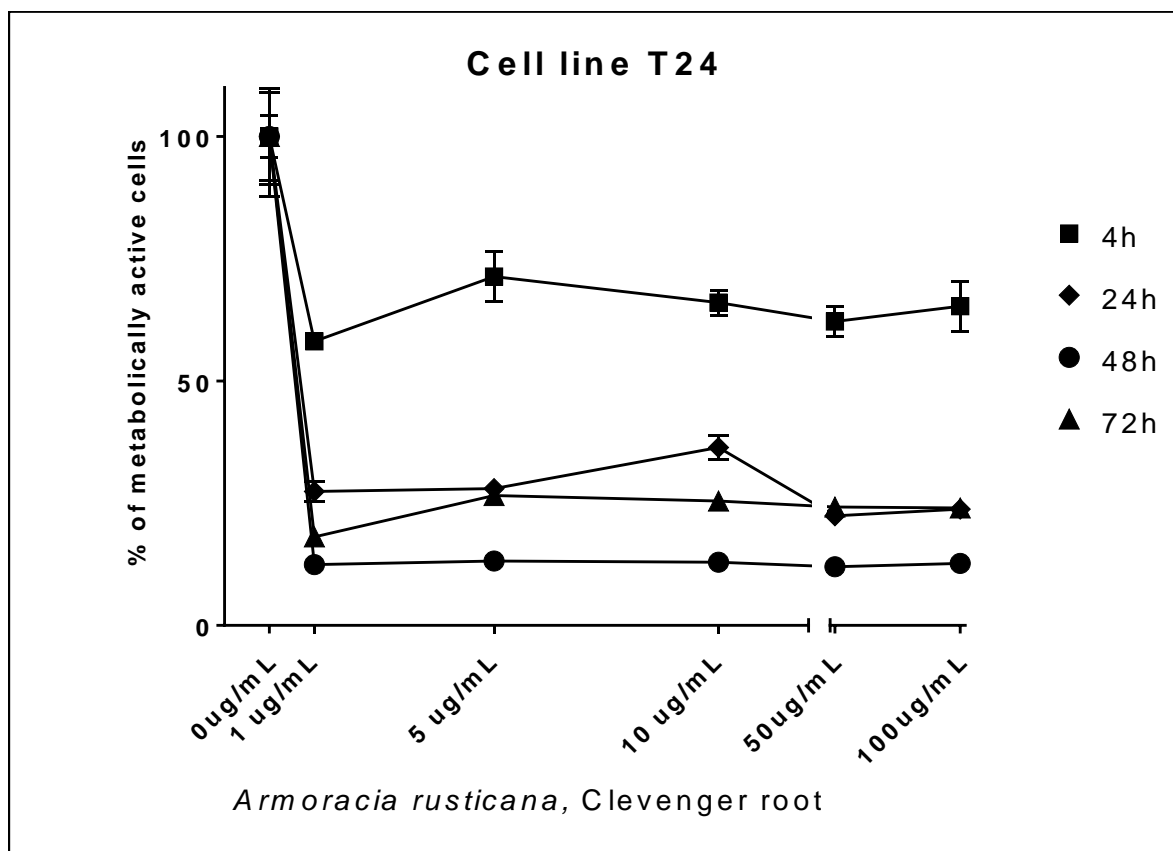


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)		74.4	2.048	0.3486
				1.115

Slika 22. Mikrovalni ekstrakt korijena hrena

Mikrovalni ekstrakt korijena hrena pokazuje značajan učinak pri svim koncentracijama već nakon 24 h. Najveći učinak se ostvaruje pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ nakon 48 h. Daljnjom inkubacijom; odnosno nakon 72 h učinak pada.

3.1.3. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - HIDRODESTILAT

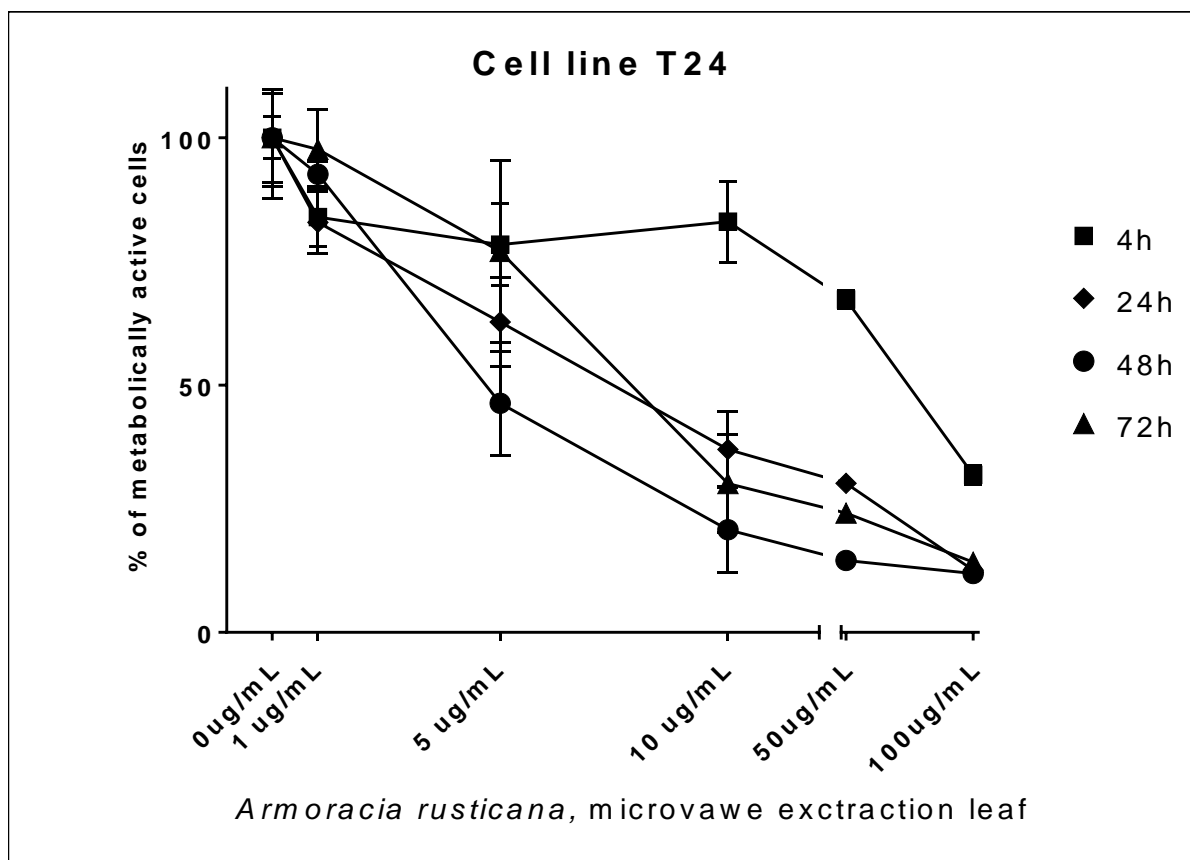


	4h	24h	48h	72h	
IC50 (ug/mL)		92.12	0.796	0.2039	0.428

Slika 23. Hidrodestilat korijena hrena

Hidrodestilat korijena hrena pokazuje značajni učinak pri svim koncentracijama već nakon 24h. Učinak raste za sve koncentracije do 48 h, te je tada približno jednak za sve koncentracije, s neznatno većim učinkom uzorka koncentracije 50 $\mu\text{g/mL}$. Daljnjom inkubacijom do 72 h učinak se smanjuje.

3.1.4. ARMORACIA RUSTICANA LIST - MIKROVALNI EKSTRAKT

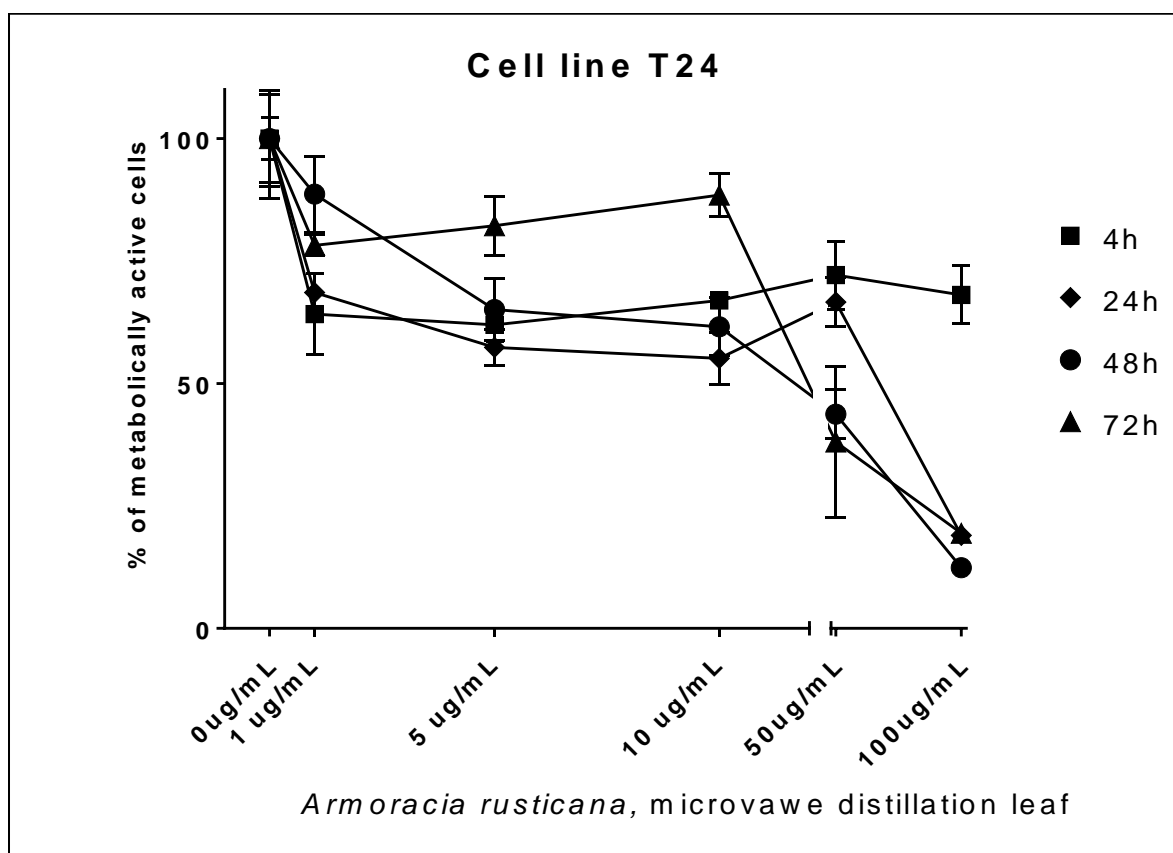


	4h	24h	48h	72h	
IC50 (ug/mL)		61.35	8.099	4.479	9.563

Slika 24. Ekstrakt lista hrena

Ekstrakt lista hrena pokazuje značajan učinak već nakon 4h za koncentraciju od 100 $\mu\text{g/mL}$, te je najveći učinak na toj koncentraciji nakon 48h, i ne mijenja se daljnjom inkubacijom. Učinak značajno raste povećanjem koncentracije.

3.1.5. ARMORACIA RUSTICANA LIST - MIKROVALNI DESTILAT

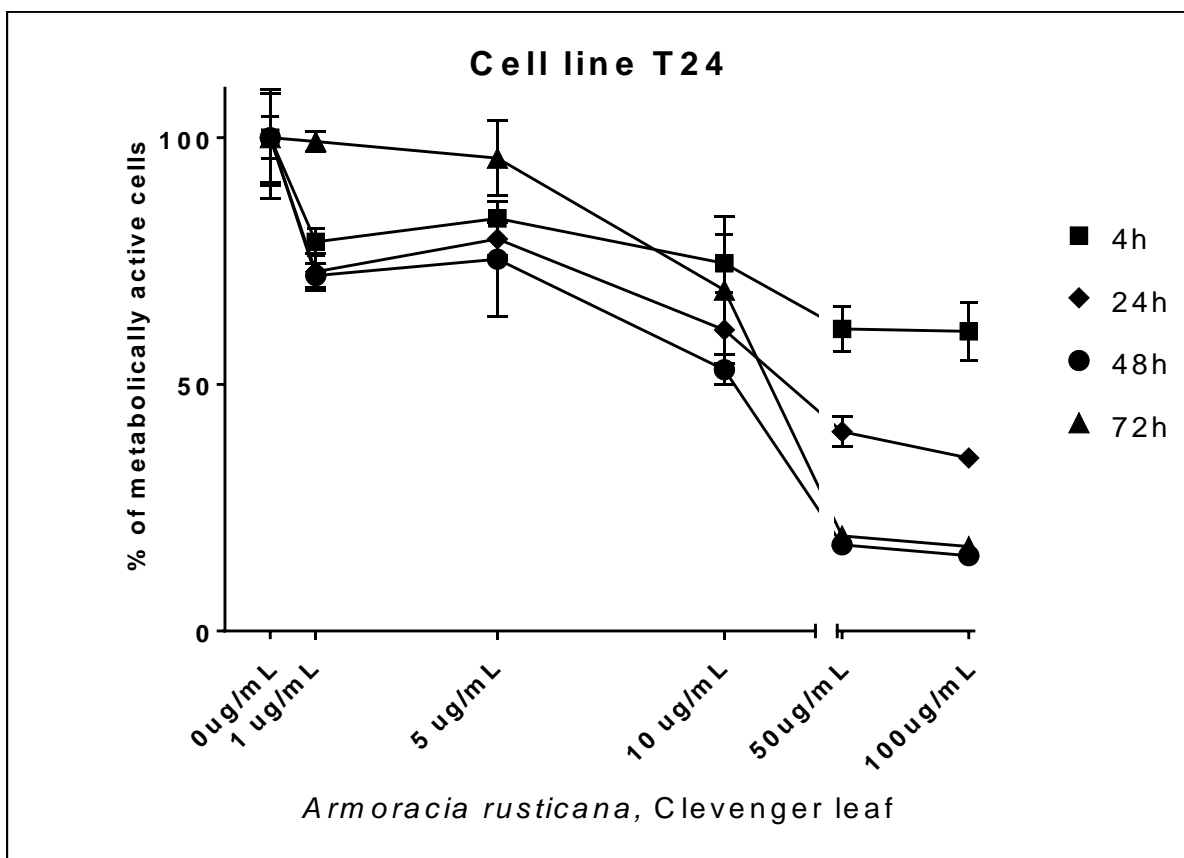


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	22.35	18.06	32.14

Slika 25. Destilat lista hrena

Destilat lista hrena pokazuje slab ucinak pri koncentracijama manjim od 50 µg/mL, dok se pri koncentraciji 50 µg/mL broj metabolički aktivnih stanica značajno smanjuje. Najveći ucinak je pri koncentraciji od 100µg/mL nakon 48 h inkubacije.

3.1.6. ARMORACIA RUSTICANA LIST - HIDRODESTILAT

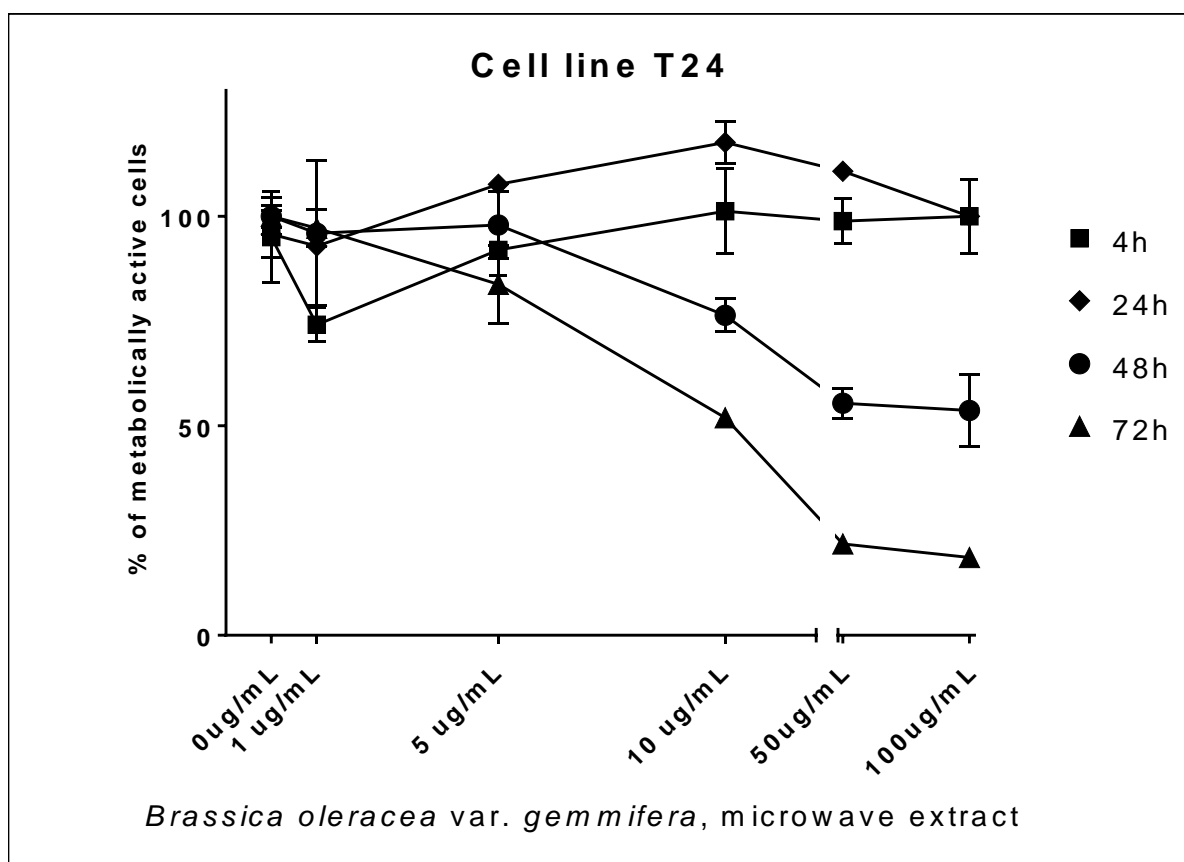


	4h	24h	48h	72h	
IC50 (ug/mL)		90.02	26.24	11.39	21.77

Slika 26. Hidrodestilat lista hrena

Hidrodestilat lista hrena pokazuje najveći učinak pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ nakon 48 h, te daljnjom inkubacijom učinak ostaje isti. Za sve koncentracije učinak je najznačajniji nakon 48 h, dok se nakon 72 h smanjuje ili ostaje nepromijenjen.

3.1.7. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA - MIKROVALNI EKSTRAKT

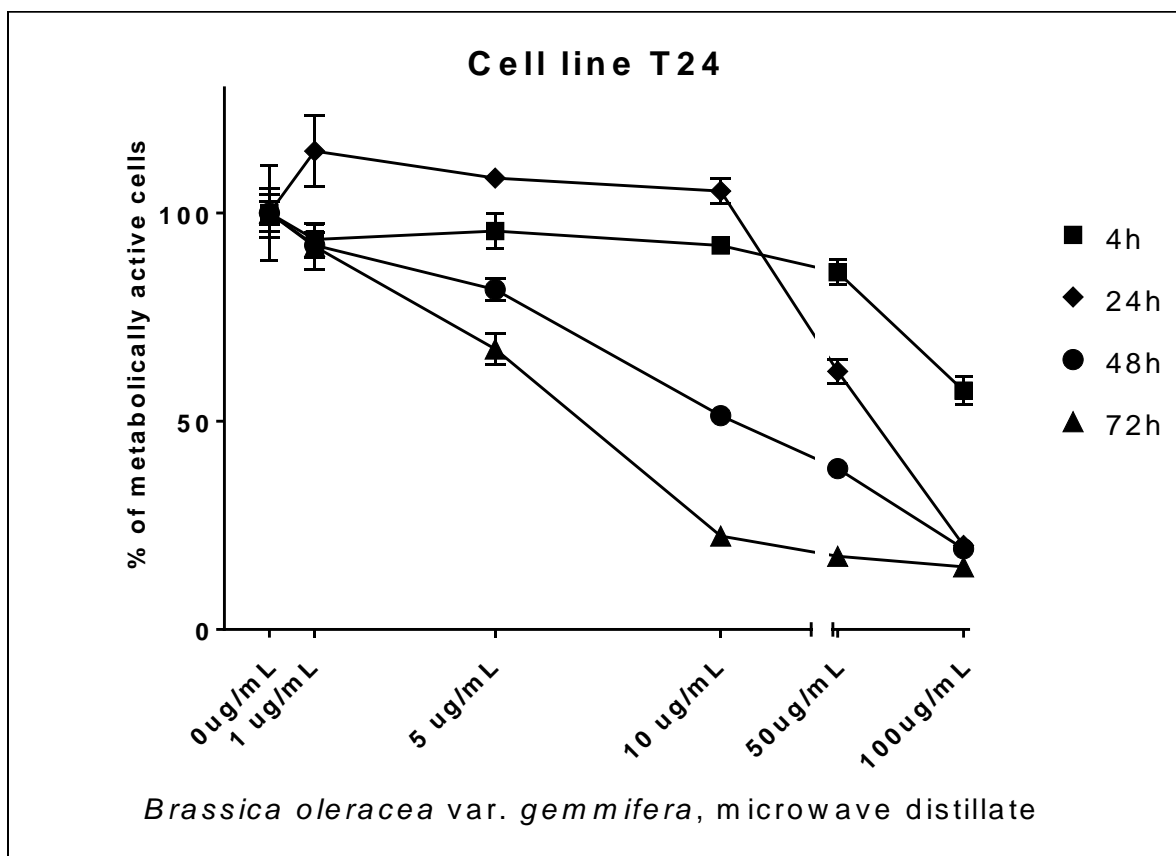


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	78.27	15.31

Slika 27. Mikrovalni ekstrakt kelja pupčara

Mikrovalni ekstrakt kelja pupčara pokazuje najveći učinak nakon 72 h inkubacije za sve koncentracije osim 1 µg/mL, kojoj je učinak najveći već nakon 4h a kasnije se smanjuje. Najmanji broj metabolički aktivnih stanica postiže se nakon 72 h pri koncentraciji od 100 µg/mL.

3.1.8. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA - MIKROVALNI DESTILAT



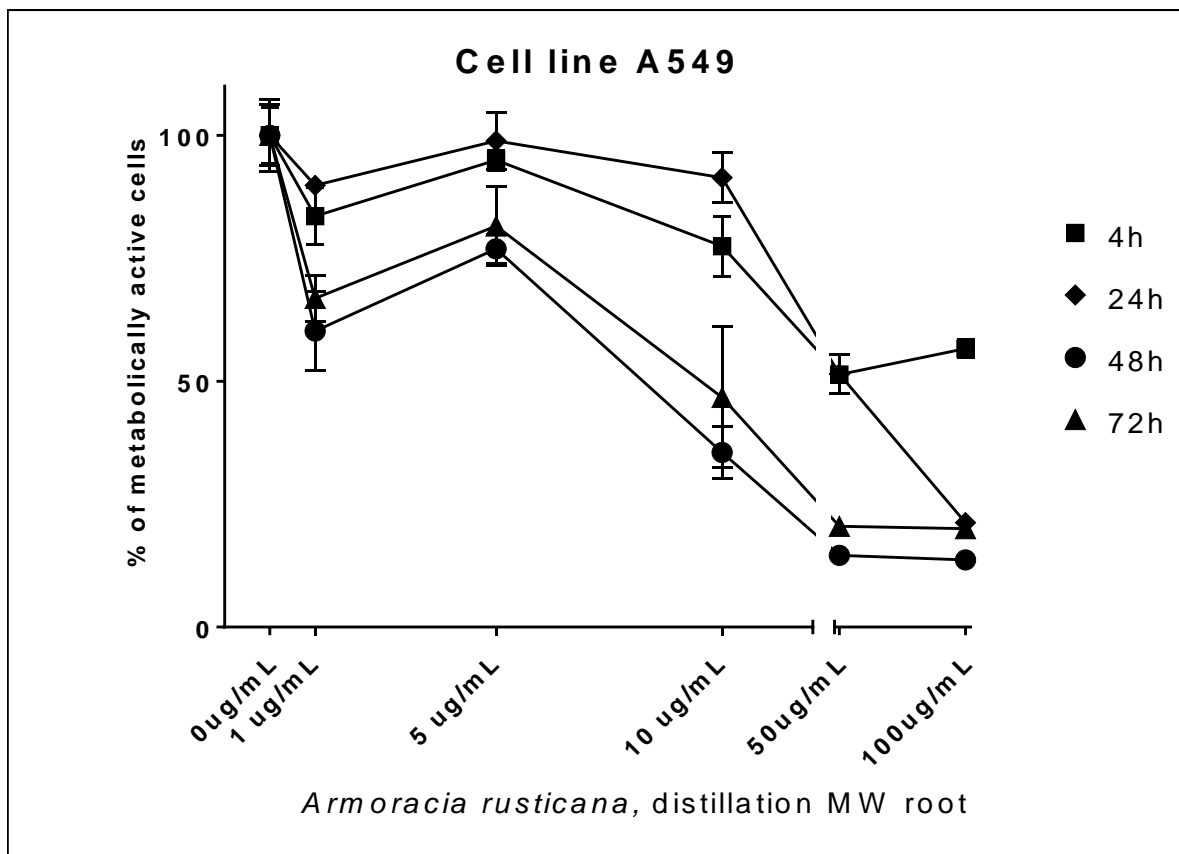
	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	65.64	18.58	6.654

Slika 28. Mikrovalni destilat kelja pupčara

Mikrovalni destilat kelja pupčara; postotak metabolički aktivnih stanica se smanjuje povećanjem koncentracije, te je maksimum učinka pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ i nakon 72 h inkubacije. Koncentracije 1, 5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ pokazuju veći učinak nakon 4 h nego nakon 24 h, a izuzev toga učinak se povećava vremenom inkubacije.

3.2. KARCINOM PLUĆA NEMALIH STANICA - STANIČNA LINIJA A549

3.2.1. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - MIKROVALNI DESTILAT

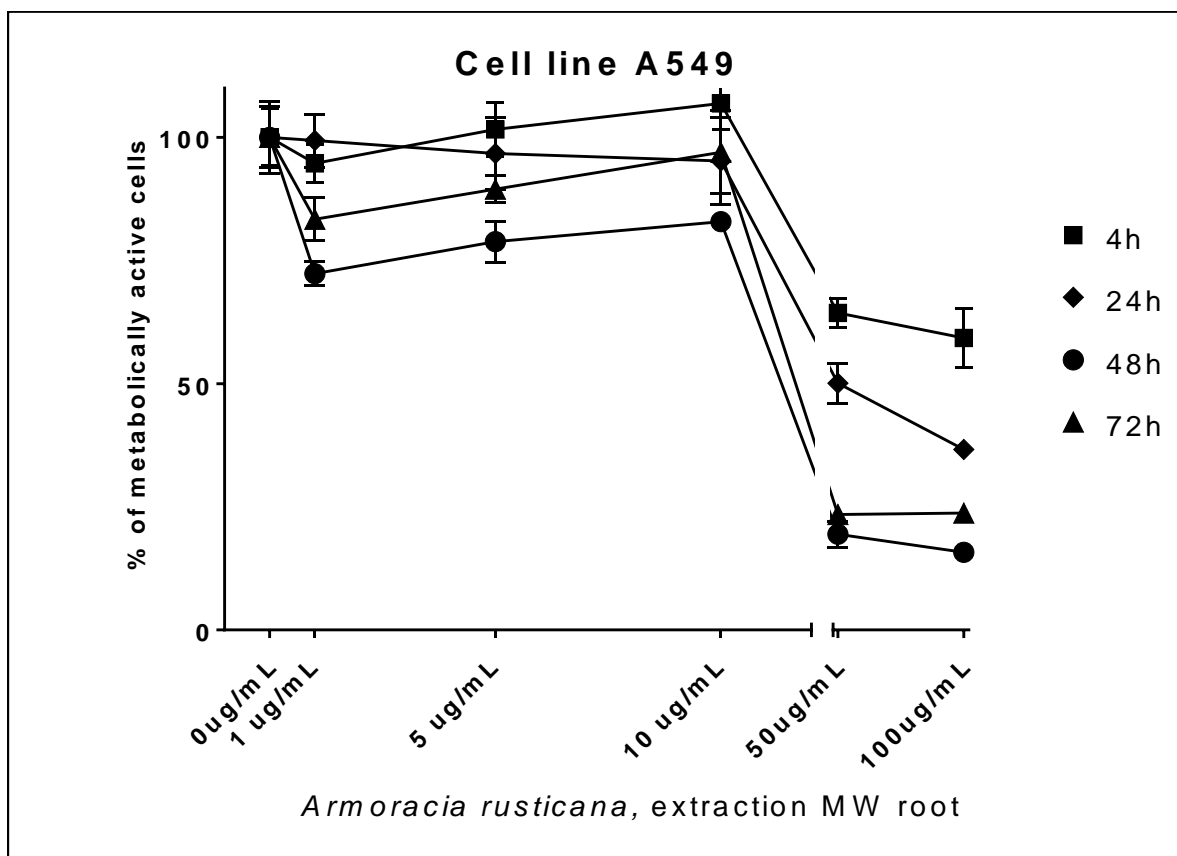


	4h	24h	48h	72h	
IC50 (µg/mL)		75.31	47.83	7.479	11.63

Slika 29. Mikrovalni destilat korijena hrena

Mikrovalni destilat korijena hrena pokazao je najbolji učinak pri koncentraciji od 100 µg/mL i 48 h inkubacije. Daljnjom inkubacijom učinak se neznatno smanjuje pri svim koncentracijama. Porast koncentracije prati porast učinka pri 10, 50 i 100 µg/mL, osim što je pri 50 µg/mL nakon 4h inkubacije učinak veći nego pri 100 µg/mL nakon 4h. Pri nižim koncentracijama porast koncentracije ne prati porast učinka pa je koncentracija od 1 µg/mL pokazala bolji učinak pri svim vremenima inkubacije od koncentracije od 5 µg/mL.

3.2.2. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEN - MIKROVALNI EKSTRAKT

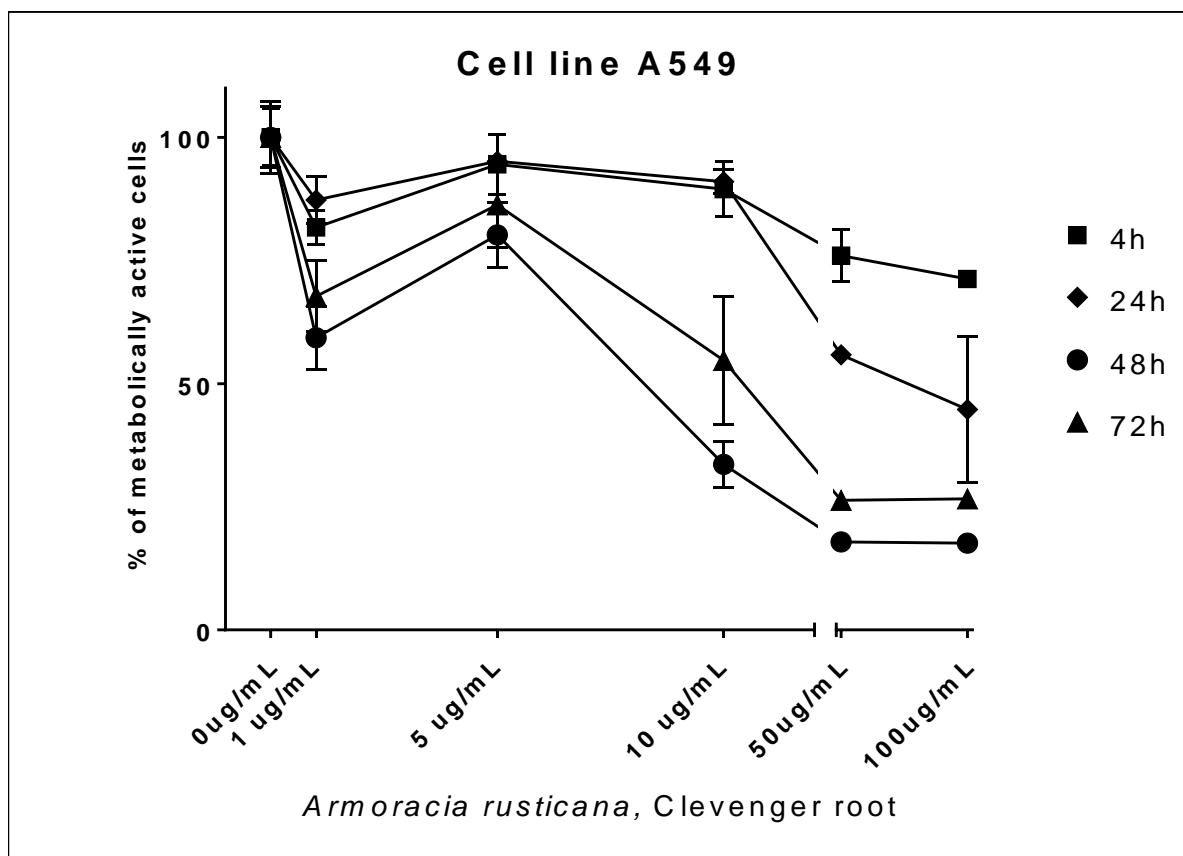


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	60.76	20.55	31.86

Slika 30. Mikrovalni ekstrakt korijena hrena

Mikrovalni ekstrakt korijena hrena značajan učinak pokazuje pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$, a najbolji pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ nakon 48 h inkubacije. Daljnjom inkubacijom učinak se smanjuje pri svim koncentracijama. Pri koncentracijama 1, 5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ učinak se neznatno smanjuje rastom koncentracije.

3.2.3. ARMORACIA RUSTICANA KORIJEJEN - HIDRODESTILAT

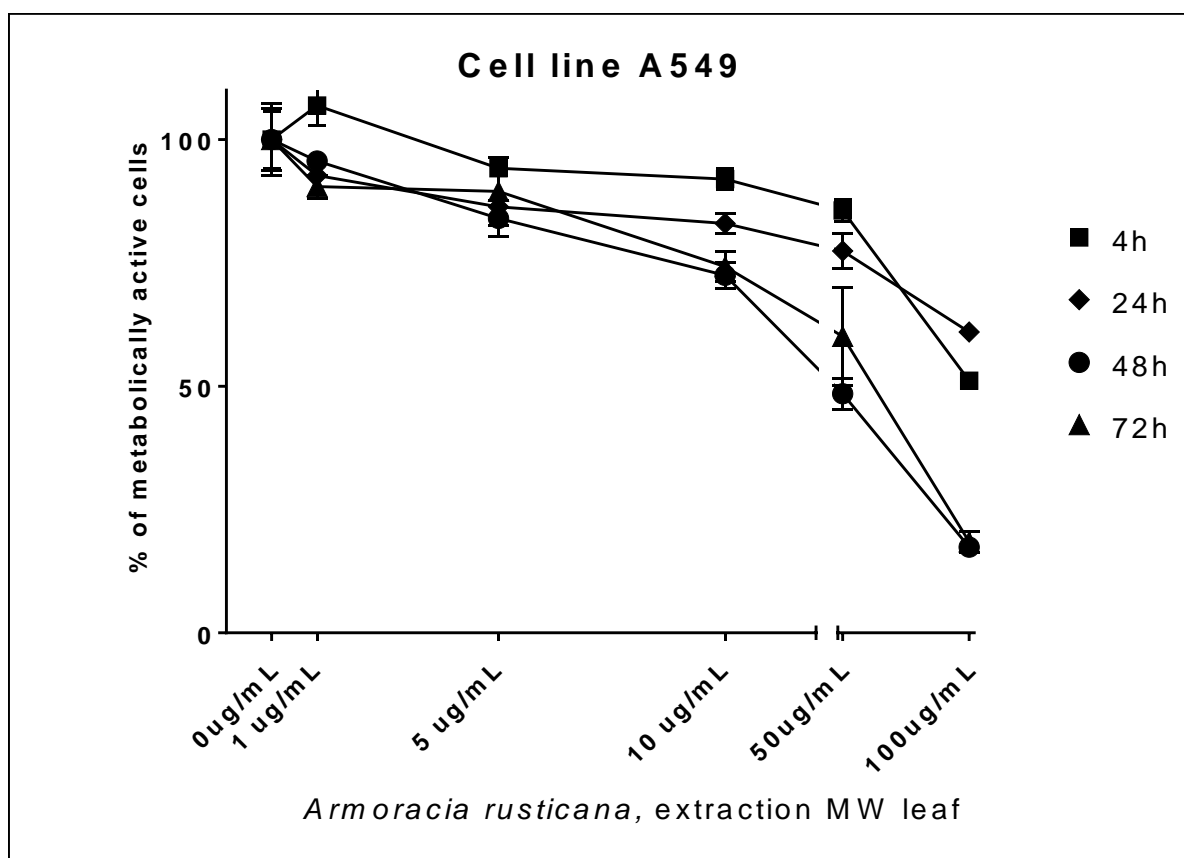


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	73.27	8.003	16.91

Slika 31. Hidrodestilat korijena hrena

Hidrodestilat korijena hrena najbolji učinak pokazuje pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ nakon 48 h inkubacije. Daljnjom inkubacijom učinak se neznatno smanjuje pri svim koncentracijama. Porast koncentracije ne prati dosljedno porast učinka.

3.2.4. ARMORACIA RUSTICANA LIST - MIKROVALNI EKSTRAKT

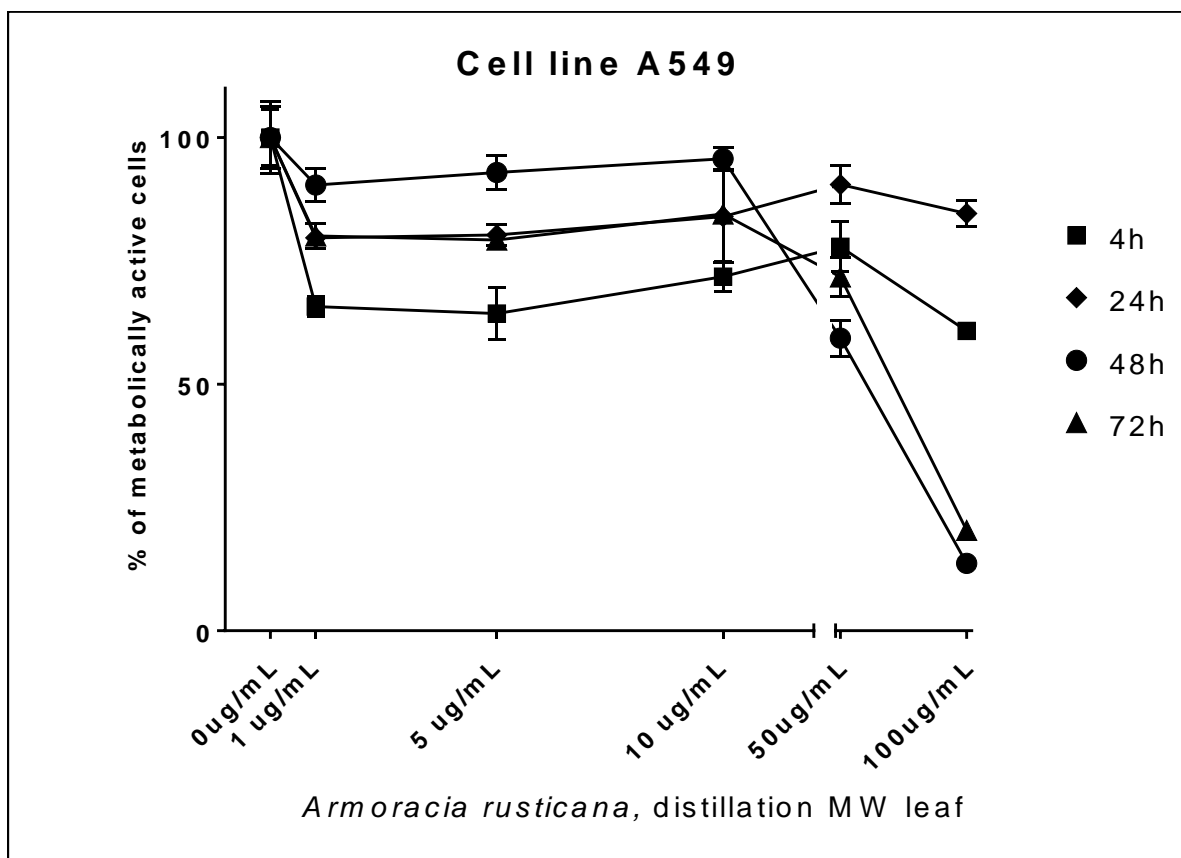


	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	Not determined	Not determined	31.97	42.31

Slika 32. Mikrovalni ekstrakt lista hrena

Mikrovalni ekstrakt lista hrena pokazuje značajan učinak pri koncentraciji od 50 µg/mL i 48 h inkubacije, a najbolji učinak ostvaren je pri koncentraciji od 100 µg/mL i 48 h inkubacije. Vrijeme inkubacije ne prati dosljedno porast učinka.

3.2.5. ARMORACIA RUSTICANA LIST - MIKROVALNI DESTILAT

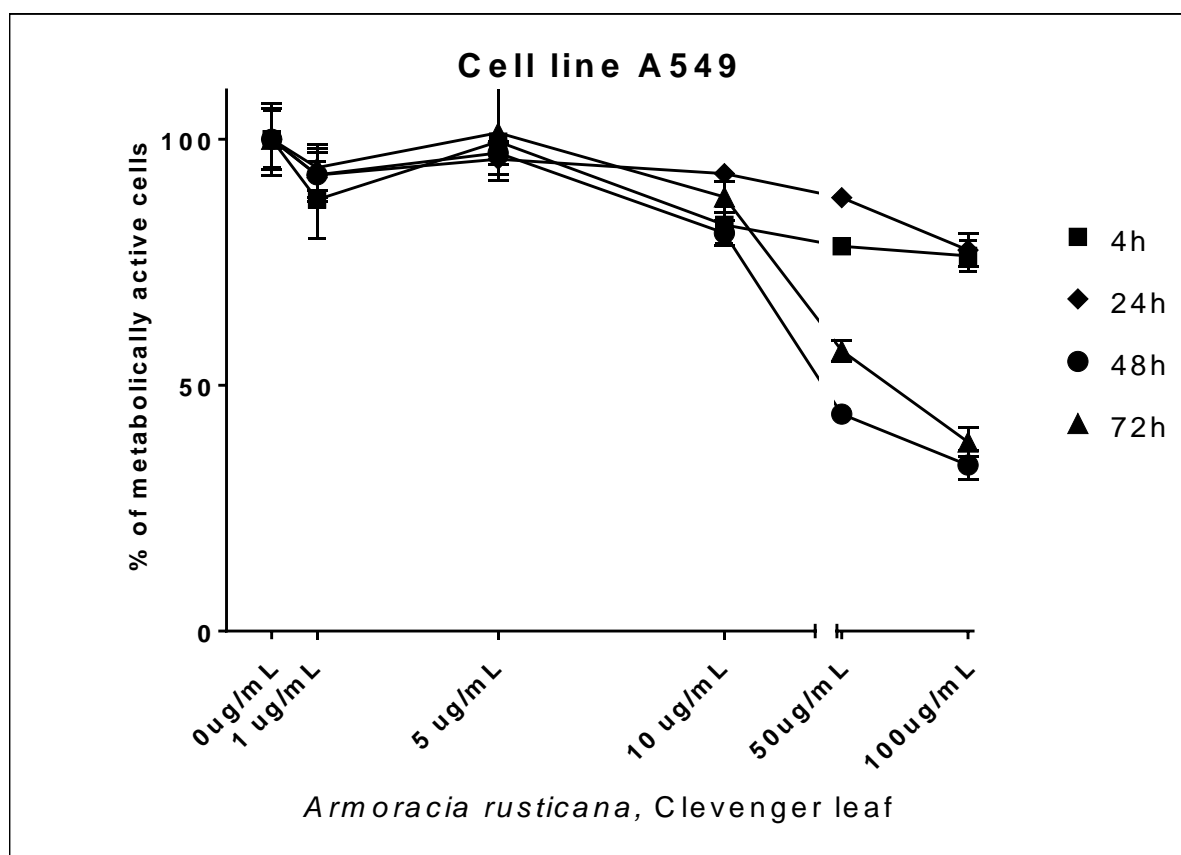


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	49.06	55.32

Slika 33. Mikrovalni destilat lista hrena

Mikrovalni destilat lista hrena najbolji učinak ostvaruje pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ i 48 h. Pri koncentracijama manjim od 50 $\mu\text{g/mL}$ najbolji učinak ostvaruje se nakon samo 4h inkubacije, iako učinak nije značajan. Pri svim koncentracijama vrijeme inkubacije ne prati nužno porast učinka.

3.2.6. ARMORACIA RUSTICANA LIST - HIDRODESTILAT

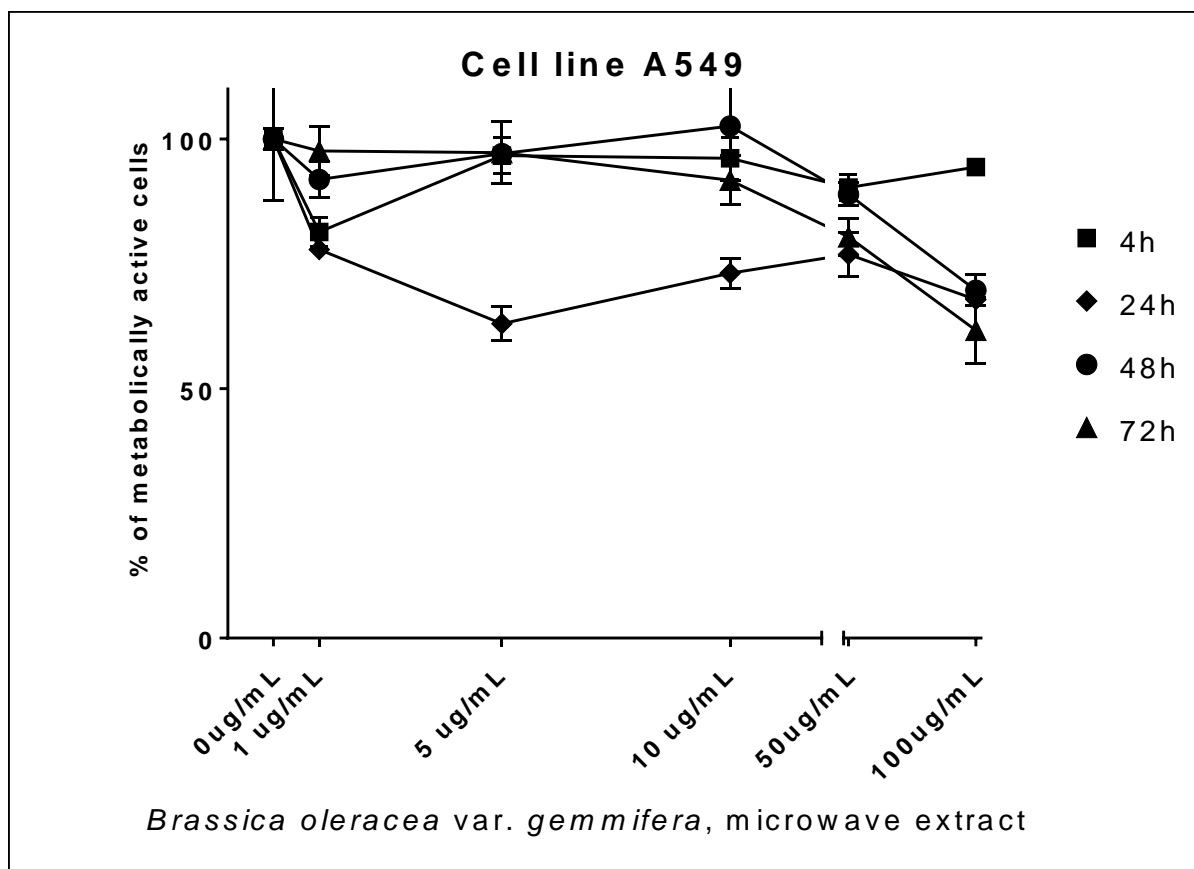


	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	Not determined	Not determined	45.6	67.74

Slika 34. Hidrodestilat lista hrena

Hidrodestilat lista hrena značajan učinak ostvaruje pri koncentraciji od 50 µg/mL i 48 h inkubacije. Pri manjim koncentracijama ne ostvaruje se značajan učinak, te se gotovo ne mijenja s vremenom inkubacije.

3.2.7. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA - MIKROVALNI EKSTRAKT

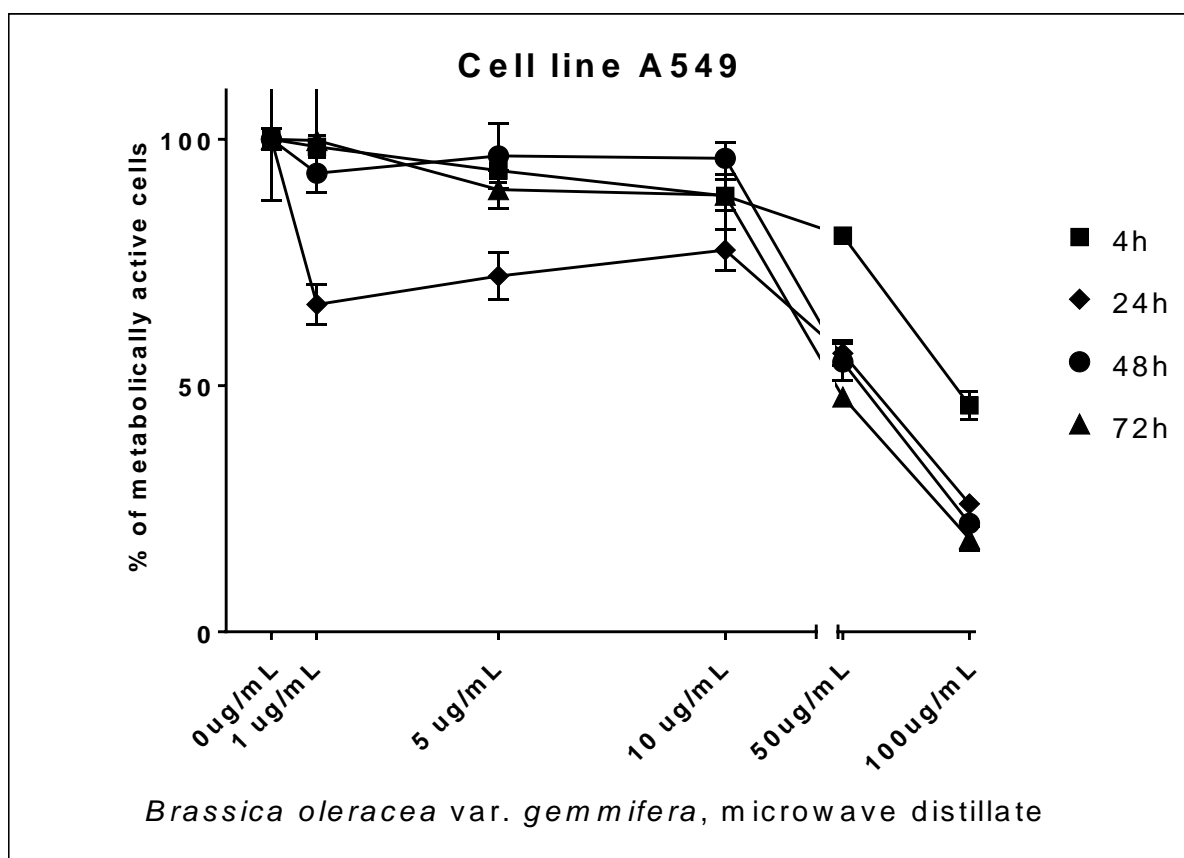


	4h	24h	48h	72h	
IC50		Not determined	Not determined	Not determined	Not determined

Slika 35. Mikrovalni ekstrakt kelja pupčara

Mikrovalni ekstrakt kelja pupčara- koncentracija metabolički aktivnih stanica se ne smanjuje ispod 50% ni pri jednoj koncentraciji i vremenu inkubacije. Učinak ne raste dosljedno s vremenom inkubacije i porastom koncentracije.

3.2.8. BRASSICA OLERACEA VAR. GEMMIFERA - MIKROVALNI DESTILAT



	4h	24h	48h	72h
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	Not determined	38.89	52.7	40.91

Slika 36. Mikrovalni ekstrakt kelja pupčara

Mikrovalni ekstrakt kelja pupčara značajan učinak ostvaruje pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ i 24 h inkubacije, a najbolji učinak vidljiv je pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ i 72 h inkubacije. Pri koncentracijama 1, 5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ najbolji učinak se postiže nakon 24 h inkubacije a kasnije se smanjuje.

4. RASPRAVA

Rak nastaje kao posljedica abnormalne proliferacije stanica. Rak nastaje iz bilo koje strukture organa ili tijela i sastavljen je od stanica koje su izgubile sposobnost prestanka rasta. Rizik od raka višestruko je veći kod osoba čiji je imunološki sustav potisnut zbog bilo kojeg čimbenika, uključujući kronični stres, starost, kroničnu bolest, prethodnu uporabu kemoterapije i prekomjernu uporabu lijekova kao što su analgetici, antibiotici i kortikosteroidi (17). Zna se da su neke vrste raka povezane s određenim rizičnim ponašanjima i čimbenicima rizika iz okoline u većoj ili manjoj mjeri te da isto tako postoji genetička predispozicija za razvoj raka unutar nekih porodica. Na većinu izloženosti čimbenicima rizika može se utjecati ispravnim životnim navikama i različitim društvenim mjerama te tako smanjiti rizik za obolijevanje od raka. U čimbenike rizika spadaju: čimbenici povezani sa stilom života (pušenje duhana, pasivno pušenje, konzumacija alkohola, neadekvatne prehrambene navike, seksualne navike itd.), okolišni čimbenici (Sunčevo zračenje, radon, aflatoksin itd.), čimbenici povezani s profesionalnom izloženosti (digoksin, azbest, etilvinil-klorid, nikal, arsen itd.), biološki čimbenici (Epstein-Barr virus, virus hepatitisa B i C, HIV tipa 1, humani papiloma virus tipovi 16 i 18, humani virus T- staničnog limfoma tipa 1, *H. pylori*) (18).

Procjenjuje se da je globalno opterećenje rakom naraslo na 18,1 milijuna novih slučajeva i 9,6 milijuna smrtnih slučajeva u 2018. Jedan od pet muškaraca i jedna od šest žena u svijetu razvijaju karcinom tijekom svog života, a jedan od 8 muškaraca i jedna od 11 žena umire od bolesti. Diljem svijeta, ukupan broj ljudi koji su živi unutar 5 godina dijagnoze raka, procjenjuje se na 43,8 milijuna (8).

Rak mokraćnog mjehura je šesti najčešći rak u muškaraca i 17. najčešći rak u žena. U 2018. bilo je gotovo 550.000 novih slučajeva. Kod muškaraca je više od četiri puta veća vjerojatnost od raka mokraćnog mjehura, a učestalost je veća u starijih osoba. Na primjer, prosječna dob u SAD-u je 73 godine (19).

Smatra se da se geografske varijacije u stopama incidenata mogu objasniti razlikama u učestalosti čimbenika rizika u različitim zemljama. Upotreba duhana, dobro utvrđen čimbenik rizika od raka mokraćnog mjehura procjenjuje se na oko polovice svih slučajeva raka mokraćnog mjehura kod muškaraca i žena i može objasniti visoku učestalost raka mokraćnog mjehura u Europi i Sjevernoj Americi. Visoka incidencija raka mokraćnog mjehura u Egiptu i drugim zemljama Sjeverne Afrike u velikoj se mjeri pripisuje infekciji s parazitom *Schistosoma*. Nakon uspješne kontrole šistosomijaze, Egipat je doživio smanjenje u broju slučajeva karcinoma skvamoznih stanica, koji su povezani sa šistosomijazom, ali povećanjem udjela karcinoma prijelaznih stanica koji je povezan s pušenjem. Profesionalna izloženost

kancerogenim aromatičnim aminima, policikličkim aromatskim ugljikovodicima i kloriranim ugljikovodicima je čimbenik rizika za rak mokraćnog mjehura, a sve je sve veći broj dokaza koji podupiru utjecaj genetske predispozicije (20).

Rak pluća je najčešći uzrok smrti od raka, a procjenjuje se da je odgovoran za gotovo jednu od pet smrti od raka. Preživljavanje raka pluća uglavnom je određeno stadijem u kojem se dijagnosticira, a kasnija dijagnoza ima lošiju prognozu. Pušenje je glavni uzrok raka pluća. Procjenjuje se da se više od 90% slučajeva među muškarcima i preko 80% među ženama širom svijeta može pripisati uporabi duhana. Pasivno pušenje je također uzrok raka pluća (21).

Kemoterapija se rutinski koristi za liječenje raka. Budući da stanice raka gube mnoge regulatorne funkcije prisutne u normalnim stanicama, i dalje se dijele kada normalne stanice to ne čine. Ova značajka čini stanice raka osjetljive na kemoterapijske lijekove. Otprilike pet desetljeća sustavnog otkrivanja i razvoja lijekova dovelo je do uspostavljanja velike zbirke korisnih kemoterapeutskih sredstava. Međutim, kemoterapijski tretmani nisu lišeni vlastitih negativnih učinaka. Različite vrste toksičnosti mogu se pojaviti kao posljedica kemoterapijskih tretmana. Na primjer, poznato je da 5-fluorouracil, uobičajeno kemoterapijsko sredstvo, uzrokuje mijelotoksičnost, kardiotoksičnost i čak se pokazalo da djeluje kao vazospastično sredstvo u rijetkim, ali dokumentiranim slučajevima. Drugi široko korišteni kemoterapeutik, doksorubicin uzrokuje srčanu toksičnost, toksičnost bubrega i mijelotoksičnost. Slično tome, bleomicin je dobro poznato kemoterapijsko sredstvo, poznato po plućnoj toksičnosti. Osim toga, bleomicin pokazuje kožnu toksičnost. Pokazalo se da ciklofosfamid, lijek za liječenje mnogih malignih stanja, uzrokuje toksičnost mokraćnog mjehura u obliku hemoragijskog cistitisa, imunosupresiju, alopeciju i pri visokim dozama i kardiotoksičnost (22).

Toksičnost kemoterapijskih lijekova ponekad stvara značajan problem u liječenju raka. Danas na tržištu postoje četiri klase antitumorskih sredstava izoliranih iz biljaka, vinka alkaloidi (vinblastin, vinkristin i vindesin), epipodofilotoksini (etopozid i tenipozid), taksani (paklitaksel i docetaksel) i derivati kamptotecina (camptotecin i irinotekan). Biljke imaju ogroman potencijal za otkrivanje novih lijekova i kao takve su spremnik prirodnih kemikalija koje mogu pružiti kemoprotektivni potencijal protiv raka (22).

Kupusnjače imaju kemijske sastojke koji pokazuju protuupalno djelovanje. Ove namirnice također potiču detoksikaciju određenih karcinogenih enzima i toksične su za mnoge vrste stanica raka. Konzumacija povrća kao što su kupus, brokula, prokulica i drugog povrća iz ove porodice može značajno smanjiti učestalost smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom.

Zapravo, dokazi pokazuju da pojedinci čija je prehrana bogata kupusnjačama, imaju niži rizik od razvoja raka. Kupusnjače sadrže kemijske komponente koje se nazivaju glukozinolati, a koji se pretvaraju u indole, izotiocijanate, tiocijanate i cijano-epitioalkane putem žvakanja kao rezultat oslobađanja enzima mirozinaze (23).

Mnogi prirodni izotiocijanati (ITC), uključujući alil izotiocijanat (AITC), benzil izotiocijanat (BITC), erucin (ECN), fenetil izotiocijanat (PEITC) i sulforafan (SF) pokazali su obećavajuću kemoprevencijsku aktivnost protiv raka. Kemopreventivni mehanizmi ITC-a uključuju modulaciju proteina povezanih s rakom koji su uključeni u upale, zaustavljanje staničnog ciklusa, staničnu smrt, angiogenezu, invaziju i metastaziranje zajedno s modulacijom enzima koji metaboliziraju karcinogene tvari. BITC, PEITC i SF također napadaju matične stanice raka. ITC inhibiraju razvoj karcinogeno induciranih karcinoma u organima glodavaca, uključujući mokraćni mjehur, debelo crijevo, jednjak, jetru, pluća, mliječnu žlijezdu, gušteraču, kožu i tanko crijevo (24).

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su mikrovalni ekstrakti i destilati iz biljnih vrsta *Armoracia rusticana*; korijen i list i *Brassica oleracea* var. *gemmifera* te hidrodestilati *Armoracia rusticana* korijena i lista koji oboje pripadaju porodici *Brassicaceae*, odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije: T24 (karcinom mokraćnog mjehura) i A549 (rak pluća nemalih stanica).

Utjecaj na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24 je za sve ekstrakte korijena biljne vrste *Armoracia rusticana* značajan već pri niskim koncentracijama od 1 i 5 $\mu\text{g/mL}$, dok ekstrakti lista vrste *Armoracia rusticana* i ekstrakti vrste *Brassica oleracea* var. *gemmifera* takav učinak uglavnom postižu pri većim koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju T24 ostvario je hidrodestilat korijena vrste *Armoracia rusticana*, i to nakon 48 h inkubacije, kada sve koncentracije imaju jednak učinak, osim koncentracije od 50 $\mu\text{g/mL}$ koja pokazuje blago veći učinak od ostalih.

Utjecaj na staničnu liniju raka pluća pluća nemalih stanica A549 je za većinu ekstrakta značajan tek pri većim koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$, izuzev mikrovalnog ekstrakta vrste *Brassica oleracea* var. *gemmifera* koji nije pokazao značajan učinak ni pri kojoj koncentraciji. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju A549 ostvario je mikrovalni destilat korijena vrste *Armoracia rusticana*, i to pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ i 48 h inkubacije.

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

5. ZAKLJUČAK

1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura i stanica raka pluća nemalih stanica uzorcima izoliranim iz biljne porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.

2) Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju T24 ostvario je hidrodestilat korijena vrste *Armoracia rusticana*. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju A549 ostvario je mikrovalni destilat korijena vrste *Armoracia rusticana*.

3) Ispitivani ekstrakti pokazuju citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.

4) Djelovanje izoliranih ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u nekim slučajevima dolazi do blagog oporavka stanica.

6. LITERATURA

- (1) Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Biologija raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.3-10.
- (2) Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur., Zloćudna preobrazba i rast: Nestabilnost genoma i poremećaj staničnog ciklusa u karcinogenezi. In: Kovač Z, editor. Patofiziologija. 7. Obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. pp. 669-672
- (3) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Bilten 41, Zagreb, 2019. https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2016_zavrсна.pdf Datum pristupa: 10.07.2019
- (4) Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur., Zloćudna preobrazba i rast: Biološka karcinogeneza. In: Gamulin S, editor. Patofiziologija. 7. Obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. pp. 681-688
- (5) Vrdoljak, E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Tumori mokraćnog sustava. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.154-159.
- (6) DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician. 2017 Oct 15;96(8):507-514.
- (7) World Cancer Research Fund <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/lung-cancer-statistics> Datum pristupa: 13.07.2019
- (8) World Health Organization <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf> Datum pristupa: 13.07.2019
- (9) Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Tumori dišnog sustava i sredopršja: Rak pluća. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.124-130.
- (10) Encyclopaedia Britannica <https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae> Datum pristupa: 14.07.2019
- (11) Kapusta-Duch J, Kopeć A, Piatkowska E, Borczak B, Leszczyńska T. The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. Rocz Panstw Zakl Hig. 2012;63(4):389-95.
- (12) Danilov CA, Chandrasekaran K, Racz J, Soane L, Zielke C, Fiskum G. Sulforaphane protects astrocytes against oxidative stress and delayed death caused by oxygen and glucose deprivation. Glia. 2009 Apr 15;57(6):645-56. doi: 10.1002/glia.20793.
- (13) Kraft AD, Johnson DA, Johnson JA. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane

occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. J Neurosci. 2004 Feb 4;24(5):1101-12.

(14) Encyclopaedia Britannica <https://www.britannica.com/plant/horseradish>

Datum pristupa: 16.07.2019

(15) Ryszard Kosson, Marcin Horbowicz. Some quality characteristics including isothiocyanates content of horseradish cream as affected by storage period. Research Institute of Vegetable Crops Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland 2 University of Podlasie, Institute of Biology Department of Plant Physiology and Genetics. Prusa 12, 08-110 Siedlce, Poland. 2009 vol. 71, 123-132

<https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/vcrb.2009.71.issue--1/v10032-009-0033-8/v10032-009-0033-8.pdf> Datum pristupa: 17.07.2019

(16) Priroda i biljke <https://www.plantea.com.hr/kelj-pupcar/> Datum pristupa: 20.7.2019

(17) Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. Indian J Cancer. 2016 Jul-Sep;53(3):441-442.

(18) Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Etiologija raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.15-18.

(19) World Cancer Research Fund <https://www.wcrf.org/dietandcancer/bladder-cancer> Datum pristupa: 21.07.2019

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

(21) World Cancer reasearch Fund <https://www.wcrf.org/dietandcancer/lung-cancer> Datum pristupa: 21.07.2019

(22) Desai AG, Qazi GN, Ganju RK, El-Tamer M, Singh J, Saxena AK i sur. Medicinal plants and cancer chemoprevention. Curr Drug Metab. 2008 Sep;9(7):581-91.

(23) Royston KJ, Tollefsbol TO. The Epigenetic Impact of Cruciferous Vegetables on Cancer Prevention. Curr Pharmacol Rep. 2015 Feb 1;1(1):46-51.

(24) Veeranki OL, Bhattacharya A, Tang L1, Marshall JR, Zhang Y. Cruciferous vegetables, isothiocyanates, and prevention of bladder cancer. Curr Pharmacol Rep. 2015 Aug;1(4):272-282.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

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

Materijali i metode:

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

Rezultati:

Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju humanog karcinoma mokraćnog mjehura, T24, ostvario je hidrodestilat korijena vrste *Armoracia rusticana*. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju humanog raka pluća nemalih stanica, A549, ostvario je mikrovalni destilat korijena vrste *Armoracia rusticana*.

Zaključci:

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

8. SUMMARY

The aim of the research

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of extracts from the *Brassicaceae* family of plants *Armoracia rusticana* and *Brassica oleracea* var. *gemmifera* on human carcinoma cells of urinary bladder (T24) and non-small lung cancer (A549). The assumption is that after the exposure of carcinoma cells to extracts their number will be reduced in comparison to the control group.

Materials and methods

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

Results

The results are graphically presented as a relation of incubation times and the percentages of metabolically active cells. The best cytotoxic effect on the human bladder carcinoma cell line, T24, was achieved by *Armoracia rusticana* root hydrodistillate. The best cytotoxic effect on the human non-small lung cancer cell line, A549, was achieved by *Armoracia rusticana* root microwave distillate.

Conclusions

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

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Lucia Rajčić

Datum rođenja: 10.09.1995.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Terzićeva 9, Split

E-mail: rajcic.lucia@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2002.-2010. Osnovna škola “Ravne njive” Split, Republika Hrvatska

2010.-2014. IV. gimnazija “Marko Marulić”, Split, Republika Hrvatska

2014.-2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, studij Farmacija

RADNO ISKUSTO:

Ožujak, 2019. – Rujan, 2019. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna □Skalice”

Srpanj 2013. – Listopad 2018. – rad pri Studentskom centru Split (rad u “prometnoj jedinici mladeži”, telefonsko anketiranje u Agenciji za anketiranje Ipsos, Unicef-ov predstavnik, rad preko agencije Dekra)

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski jezik, talijanski jezik