

Citotoksično djelovanje strižuše (*Sisymbrium spp.*) i izopropil izotiocijanata na različite stanične linije humanih karcinoma

Grgat, Mirta

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:829037>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

MIRTA GRGAT

CITOTOKSIČNO DJELOVANJE STRIŽUŠE
(*SISYMBRIUM SPP.*) I IZOPROPIL IZOTIOCIJANATA NA RAZLIČITE
STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA

Diplomski rad

Akadska godina:

2019./2020.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2020. godine

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

MIRTA GRGAT

CITOTOKSIČNO DJELOVANJE STRIŽUŠE
(*SISYMBRIUM SPP.*) I IZOPROPIL IZOTIOCIJANATA NA RAZLIČITE
STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA

Diplomski rad

Akadska godina:

2019./2020.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2020. godine

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

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska kemija i biokemija
Tema rada je odobrena na 64. sjednici Vijeća studija Farmacije, 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 26. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
Pomoć pri izradi: Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

Citotoksično djelovanje strižuše

(*Sisymbrium* spp.) i izopropil izotiocijanata na različite stanične linije humanih karcinoma

Mirta Grgat, broj indeksa 168

Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksični učinak uzoraka dobivenih iz *Sisymbrium* spp. na tri stanične linije humanih karcinoma: A549, MDA-MB-231 i T24. Korišteni su destilati i ekstrakti iz biljnih vrsta *Sisymbrium officinale* (L.) i *Sisymbrium orientale* te izopropil izotiocijanata. Sve tri stanične linije tretirane su koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 h korištenjem MTT metode, ali su prikazani samo najznačajniji rezultati. Omjer apsorbancije stanica tretiranih uzorcima dobivenih iz *Sisymbrium* spp. i izopropil izotiocijanatom te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih uzoraka i izopropil izotiocijanata. Najznačajniji citotoksični učinak na staničnu liniju A549 vidljiv je nakon inkubacije od 72h, ali nema značajne razlike u djelovanju uzoraka dobivenih različitim metodama izolacije. Najznačajniji citotoksični učinak na staničnu liniju MDA-MB-231 postignut je djelovanjem uzorka *Sisymbrium orientale* dobivenog autolizom komuščice pri koncentraciji od 100 µg/mL gdje se nakon inkubacije od 72h broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 38%. Na staničnu liniju T24 najznačajniji citotoksični učinak pokazuje također uzorak dobiven autolizom komuščice nakon inkubacije od 72h pri koncentraciji 100 µg/mL, ali je učinak slabiji nego kod MDA-MB-231 linije. Ispitivani uzorci i izopropil izotiocijanata pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Izopropil izotiocijanata ima slabiji citotoksični učinak na stanične linije karcinoma dojke (MDA-MB-231) i karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i to samo pri najvećoj koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

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: 73 stranice, 28 slika, 8 tablica, 42 reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Maja Valić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić, član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 30.10.2020.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Medical Chemistry and Biochemistry
Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no.64 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.28 and Faculty Council of School of Medicine, session no.26
Mentor: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD
Technical assistance: Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

The cytotoxic effect of the *Sisymbrium* spp. and isopropyl isothiocyanate on different human cancer cell lines Mirta Grgat, index number 168

The aim of this research was to examine the cytotoxic effect of samples obtained from *Sisymbrium* spp. and isopropyl isothiocyanate on three human cancer cell lines: A549, MDA-MB-231 and T24. Distillates and extracts from the plant species *Sisymbrium officinale* (L.), *Sisymbrium orientale* and isopropyl isothiocyanate were used. Three cell lines were treated with concentrations of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL. Cytotoxicity was determined after 4, 24, 48 and 72 h using the MTT method, but only the most significant results were presented. The ratio of the absorbance of cells treated with samples obtained from *Sisymbrium* spp. and isopropyl isothiocyanate and the absorbance of those that are not treated is an indicator of the cytotoxic activity of the samples and isopropyl isothiocyanate we used. The most significant cytotoxic effect on the A549 cell line was achieved after 72 h of incubation, but there was no significant difference in the action of the samples obtained by different isolation methods. The most significant cytotoxic effect is achieved after treatment of MDA-MB-231 cell line with *Sisymbrium orientale* sample obtained by silique autolysis at a concentration of 100 µg/mL after 72 hours of incubation. Number of metabolically active cells decreased to 38%. *Sisymbrium orientale* sample obtained by silique autolysis after 72 h of incubation at a concentration of 100 µg/mL showed the most significant cytotoxic effect on the T24 cell line. as well, but slightly weaker. Samples obtained from *Sisymbrium* spp. and isopropyl isothiocyanate showed a cytotoxic effect dependent on the incubation time and concentration. The effectiveness of samples obtained from *Sisymbrium* spp. and isopropyl isothiocyanate was not always correspondent to the increase of concentration and incubation time and, in some cases, cell recovery occurred. Isopropyl isothiocyanate has a weak cytotoxic effect on breast cancer cell lines (MDA-MB-231) and bladder cancer (T24) only at a maximum concentration of 100 µg/mL after 72 h of incubation.

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: 73 pages, 28 figures, 8 tables, 42 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. prof. Maja Valić, MD, PhD, chair person
2. Assis. prof. Nikolina Režić Mužinić, PhD, member
3. Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, member - supervisor

Defence date: 30.10.2020.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici Vedrani Čikeš Čulić i Sandri Marijan na prijateljskom pristupu, uloženom trudu i vremenu te savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima i obitelji na beskrajnoj ljubavi. Vi ste mi bili najveći oslonac, podrška i uzor tijekom svih ovih godina.

Hvala i svim ostalim dragim ljudima koji su na bilo koji način učinili razdoblje studiranja nezaboravnim.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. KARCINOM.....	2
1.1.1. ONKOGENI I TUMOR-SUPRESORSKI GENI	3
1.2. KARCINOM PLUĆA	5
1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	5
1.2.2. PATOHISTOLOGIJA.....	6
1.2.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	7
1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA	7
1.3.5. LIJEČENJE	11
1.3. KARCINOM DOJKE	12
1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	12
1.3.2. PATOHISTOLOGIJA.....	13
1.3.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	14
1.3.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE	15
1.3.5. LIJEČENJE	17
1.3. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA	18
1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	18
1.4.2. PATOHISTOLOGIJA.....	18
1.4.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	19
1.4.4. KLASIFIKACIJA TUMORA MOKRAĆNOG MJEHURA.....	20
1.4.5. LIJEČENJE	23
1.5. <i>SISYMBRIUM</i> SPP.....	24
1.5.1. <i>SISYMBRIUM OFFICINALE</i> (L.).....	24
1.5.2. <i>SISYMBRIUM ORIENTALE</i>	26
1.6. IZOTIOCIJANATI	27
1.6.1. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST IZOTIOCIJANATA	27
1.6.2. IZOPROPIL IZOTIOCIJANAT	27
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	29
3. MATERIJALI I METODE	31
3.1. METODE IZOLACIJE.....	32
3.1.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA I DESTILACIJA.....	32
3.1.2. AUTOLIZA (EKSTRAKCIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA).....	33

3.1.3. CLEVENGER HIDRODESTILACIJA	33
3.2. STANIČNE LINIJE	35
3.3. POSTUPAK	38
3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI	39
3.5. STATISTIČKA ANALIZA.....	40
4. REZULTATI.....	41
4.1. KARCINOM PLUĆA – STANIČNA LINIJA A549.....	42
4.1.1. <i>SISYMBRIUM OFFICINALE</i> (L.), AUTOLIZA CVIJETA	42
4.1.2. <i>SISYMBRIUM OFFICINALE</i> (L.), MIKROVALNA DESTILACIJA.....	43
4.1.3. <i>SISYMBRIUM OFFICINALE</i> (L.), MIKROVALNA EKSTRAKCIJA.....	44
4.2. KARCINOM DOJKE – STANIČNA LINIJA MDA-MB-231	45
4.2.1. <i>SISYMBRIUM OFFICINALE</i> (L.) AUTOLIZA CVIJETA	45
4.2.2. <i>SISYMBRIUM OFFICINALE</i> (L.), MIKROVALNA DESTILACIJA	46
4.2.3. <i>SISYMBRIUM OFFICINALE</i> (L.), CLEVENGER HIDRODESTILACIJA	47
4.2.4. <i>SISYMBRIUM OFFICINALE</i> (L.), MIKROVALNA EKSTRAKCIJA.....	48
4.2.5. <i>SISYMBRIUM ORIENTALE</i> , AUTOLIZA KOMUŠČICE.....	49
4.2.6. <i>SISYMBRIUM ORIENTALE</i> , CLEVENGER HIDRODESTILACIJA	50
4.2.7. IZOPROPIL IZOTIOCIJANAT	51
4.3. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA - STANIČNA LINIJA T24	52
4.3.1. <i>SISYMBRIUM ORIENTALE</i> , AUTOLIZA KOMUŠČICE.....	52
4.3.2. IZOPROPIL IZOTIOCIJANAT	53
5. RASPRAVA.....	54
6. ZAKLJUČAK	60
7. LITERATURA.....	62
8. SAŽETAK.....	67
9. SUMMARY	70
10. ŽIVOTOPIS	73

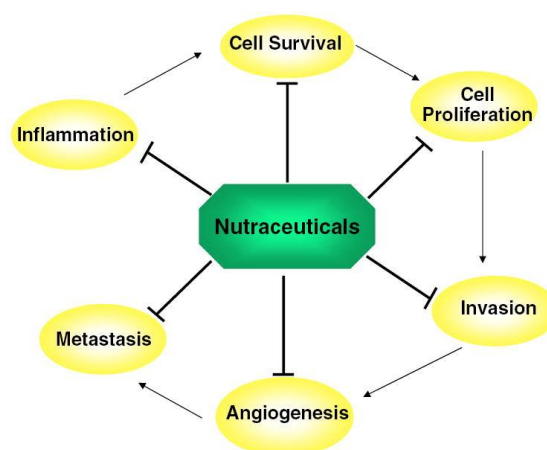
1. UVOD

1.1. KARCINOM

Tumor je svaka abnormalna masa stanica koja može biti benigna (nekancerogena) ili maligna (kancerogena). Karcinom (zloćudni tumor ili rak) je tumor čije stanice napadaju druga tkiva i rastu izvan kontrole. (1)

Iako se genetska predipozicija (nasljedne mutacije) smatraju glavnim uzročnikom razvoja raka, utvrđeno je da i čimbenici domačina (hormoni, imunološki uvjeti) i okolišni čimbenici (duhan, alkohol, kemikalije, zarazni agensi i zračenje) predstavljaju rizik za razvoj raka. Karcinom je najučestaliji tip raka, a razvija se iz epitelnih stanica, odnosno stanica koje potječu iz endodermalnog, mezodermalnog i ektodermalnog sloja embriogeneze. Proces karcinogeneze uključuje razne promjene u fenotipu stanice, a u velikoj se mjeri temelji na stečenim genetskim promjenama stanica koje nisu u potpunosti diferencirane. (2)

Najvažnije značajke stanica karcinoma su brzi rast, izbjegavanje stanične smrti, izbjegavanje kontrole proliferacije i sposobnost repliciranja izvan granica postavljenih u normalnim stanicama te sposobnost da potaknu rast krvnih žila koje im osiguravaju stalnu opskrbu kisikom i hranjivim tvarima. Rak je jedan od primarnih uzroka smrti u svijetu. Prema predviđanjima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), do 2030. godine bit će više od 21 milijun novih slučajeva raka i više od 13 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom. (3)



Slika 1. Progresija tumora

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996866/>

Datum pristupa: 07.10.2020.

1.1.1. ONKOGENI I TUMOR-SUPRESORSKI GENI

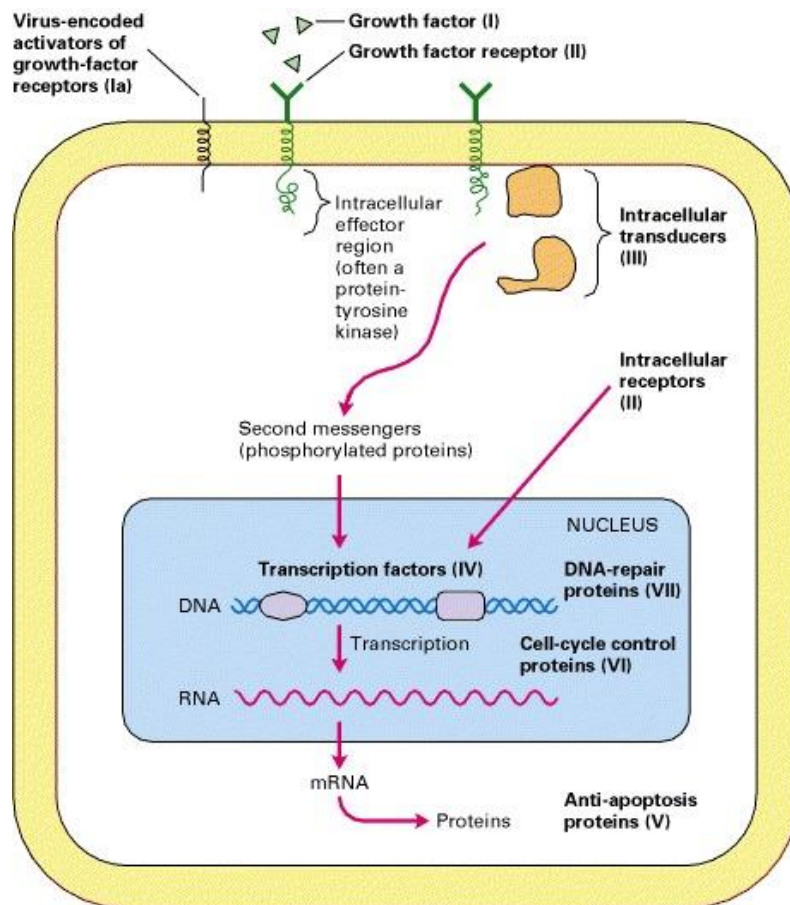
U istraživanju gena koji su uključeni u proces razvoja raka otkrivene su dvije vrste regulatornih gena: prvi koji potiču rast tumorskih stanica, nazvani onkogeni, i drugi koji djeluju suprotno tj. potiskuju rast, nazvani geni supresori ili anti-onkogeni. Ovi geni kodiraju nuklearne i citoplazmatske proteine, faktore rasta, receptore faktora rasta, prijenosnike signala i druge glasnike. Kompletni slijed kontrole staničnog rasta ide kroz nekoliko koraka, a počinje vezanjem faktora rasta koji ulazi u stanicu ili se za receptor veže izvan stanične membrane. Nakon toga receptor može djelovati izravno ili neizravno kroz G protein i drugi glasnik tako da inducira fosforilaciju (aktivaciju) unutarstaničnog proteina. Taj aktivirani protein može djelovati na više različitih načina, ali u konačnici sve uključuju vezanje izravno na DNA ili stvaranje kompleksa s proteinima koji vežu DNA ili modificiranje proteina koji vežu DNA; tako se pokreće ekspresija gena neophodnih za pokretanje diobe stanica. Inaktivacijom transkripcijskih čimbenika koji započinju sintezu DNA ili izravnom inaktivacijom molekula koje su aktivirali onkogeni načini su na koje stanica suprimira razvoj stanica raka. (4)

Kada se poremeti ovaj regulirani proces kontrole staničnog rasta, jer se jedan od regulacijskih proteina promijenio zbog mutacije gena, stanica se počinje nekontrolirano dijeliti i dolazi do malignosti. Većina znanja o onkogenima dolazi iz istraživanja retrovirusa koji uzrokuju tumore u životinja. Onkogeni se mogu aktivirati različitim mehanizmima kao što su transdukcija, insercija, amplifikacija, translokacije ili točkaste mutacije. Svaka takva genetska aberacija može dovesti do gubitka normalnih regulatornih ograničenja i nenormalne proliferacije stanica. (5)

Najbolje proučeni onkogeni su tri srodna člana iz porodice Ras gena (N-Ras, H-Ras, K-Ras) te njih ne susrećemo u zdravim stanicama. Aktivirani Ras geni prisutni su u većini tipova ljudskih neoplazija, ali incidencija varira od jedne vrste tumora do druge. U većini tumora mogu se aktivirati sva 3 Ras gena, iako gen N-ras prevladava u malignim oboljenjima krvotvornog podrijetla, a K-ras gen u tumorima nastalih iz epitelnih tkiva (karcinomi). Tumor supresorski geni razlikuju se od onkogeni po tome što su to recesivni geni i potrebne su dvije mutacije kako bi sudjelovali u nastanku raka. (6)

Za uravnoteženje protein kinaza, koje aktiviraju molekule fosforilacijom, postoji i skup proteinskih fosfataza koje te iste molekule inaktiviraju defosforilacijom. Prvi otkriveni tumor supresorski gen bio je gen retinoblastoma (RB) koji kodira za protein koji se veže na faktore

transkripcije unutar jezgre. Mehanizam djelovanja tumor supresorskih gena u zdravim stanicama kreće fosforilacijom Rb proteina od strane regulirajućih kinaza te se na taj način Rb protein inaktivira. Tada je faktor rasta slobodan vezati se na DNA i započne dioba stanice. Nakon diobe stanice, proizvod RB gena je defosforiliran te se ponovno veže za transkripcijski faktor i sprječava daljnju proliferaciju. Drugi važan tumor - supresorski gen nazvan je p53, a djelovanje mu se, kao i za Rb, temelji na reakcijama sa transkripcijskim čimbenicima i inhibicijom njihovog djelovanja. Smatra se da su mutacije gena za RB i p53 najčešći uzročnici razvoja tumora. Smatra se da karcinom nastaje kombinacijom genetskih promjena koje uključuju i prisutnost abnormalnih proizvoda onkgena i odsutnost proteinskih proizvoda gena supresora raka. (7)



Slika 2. Proteini koji sudjeluju u regulaciji staničnog rasta

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/>

Datum pristupa: 07.10.2020.

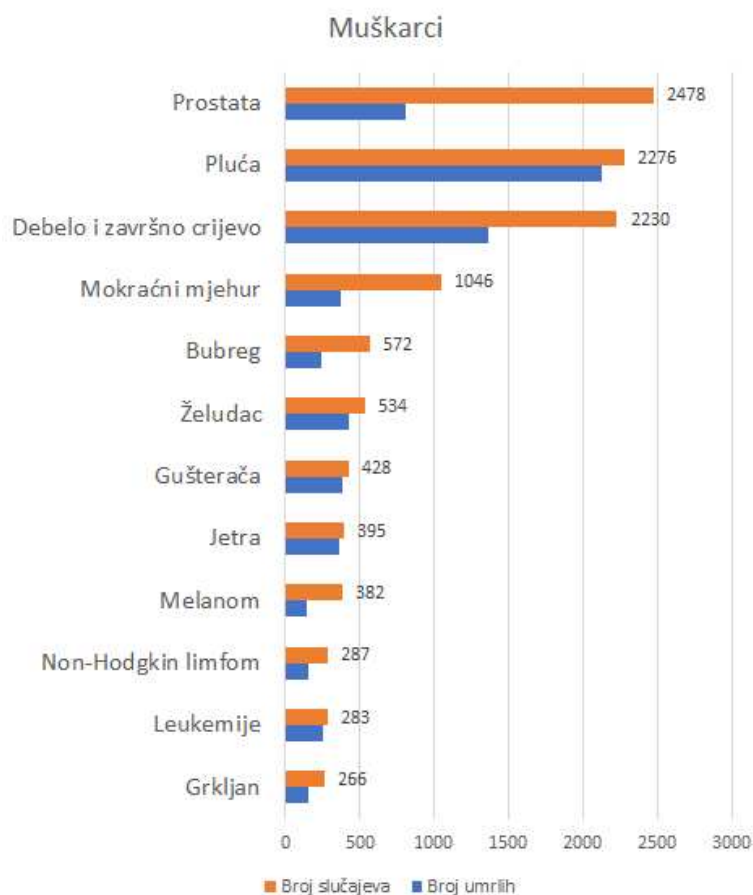
1.2. KARCINOM PLUĆA

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Značajne promjene u epidemiologiji raka pluća vidljive su u posljednjem desetljeću zbog napretka u razumijevanju genetike raka pluća, razumijevanja uloge imunološkog sustava u kontroli raka, kao i zbog sve većeg naglašavanja velike povezanosti pušenja i nastanka raka. Unatoč tom napretku, rak pluća nalazi se na prvom mjestu smrtnosti od raka. Posljednja istraživanja pokazala su da je broj novih slučajeva, kao i broj smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom pluća, u stalnom porastu. U istraživanju za 2018. godinu procijenjeno je da je bilo 2,09 milijuna novih slučajeva (11,6% od ukupnog broja oboljelih od raka) i 1,76 milijuna smrtnih slučajeva (18,4% od ukupne smrtnosti od raka). Postoje značajne varijacije u incidenciji raka pluća među državama ovisno o njihovom ekonomskom razvoju, demografiji i pušačkom statusu. Porast u incidenciji raka pluća očekuje se u državama u kojima nailazimo na porast u prevalenciji pušenja kao što su Kina, Indonezija, istočna Europa te veliki dio Afrike. Suprotno tome pad u incidenciji raka pluća očekuje se u državama koje provode nepušačke mjere kao što su UK, SAD, Australija, Novi Zeland i Njemačka. Kod usporedbe učestalosti i smrtnosti od raka pluća između spolova, one su niže u žena nego u muškaraca, iako se ta razlika smanjuje jer se broj novooboljelih i broj smrtnih slučajeva puno brže smanjuje kod muškog spola. Ako se takav trend nastavi, studije modeliranja sugeriraju da će broj umrlih od raka pluća kod žena premašiti one kod muškaraca 2045. godine. Što se tiče dobi, rak pluća najčešće se pojavljuje kod osoba starijih od 70 godina, ali je postao najčešći uzrok smrtnosti muškaraca starijih od 40 godina i žena starijih od 60 godina. Srednja dob dijagnoze raka pluća je 70 godina, a srednja dob smrti od raka pluća je 72 godine. Iako duhanski dim i pušenje ostaju vodeći čimbenik rizika za razvoj raka pluća, rizik je povezan i s drugim izlaganjima kao što su različita zračenja i onečišćenje zraka. Prevencija raka trebala bi se bazirati na izbjegavanju ili smanjenju izloženosti poznatim čimbenicima rizika. (8)

U Hrvatskoj je u razdoblju od 2001. do 2013. zabilježen porast stope incidencije raka pluća u žena, a pad kod muškaraca. (9)

Prema podacima za 2020., u Hrvatskoj rak pluća zauzima drugo mjesto po broju novodijagnosticiranih, a prvo mjesto po smrtnosti. Gledajući samo muški spol, rak pluća također zauzima drugo mjesto, odmah nakon raka prostate. (10)



Slika 3. Incidencija raka u Hrvatskoj kod muškaraca u 2020.

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

Datum pristupa: 05.10.2020.

1.2.2. PATOHISTOLOGIJA

Razlikujemo nekoliko tipova raka pluća s obzirom na vrstu stanica koje postaju maligne. Karakterizacija histološkog tipa karcinoma igra važnu ulogu u multidisciplinarnom pristupu u dijagnostici i liječenju raka pluća. Sve vrste karcinoma pluća histološki možemo svrstati u dvije velike skupine, a to su karcinom malih stanica (mikrocelularni) i karcinom ne-malih stanica (nemikrocelularni), od čega u prvu skupinu spada 80% svih karcinoma pluća. Karcinom malih stanica je agresivniji oblik i uglavnom se ne odstranjuje kirurški, dok se karcinom ne-malih stanica odstranjuje kirurški u kombinaciji sa adjuvantnom terapijom. U karcinome ne-malih stanica ubrajamo adenokarcinom, karcinom skvamoznih stanica i karcinom velikih stanica. Za mikrocelularni karcinom karakteristična je neuroendokrina diferencijacija. Adenokarcinom je najčešći tip karcinoma pluća čija je incidencija posljednjih

godina u stalnom porastu. Po definiciji adenokarcinom je maligna novotvorina epitela s diferencijacijom žlijezde ili stvaranjem mucina. Ovaj tip karcinoma obično tvori periferno smještenu masu s centralnom fibrozom i naboranom pleurom. Incidencija karcinoma skvamoznih stanica je u padu, a obično se javlja u središnjem dijelu pluća duž glavnih dišnih puteva, a na mikroskopskom prikazu mogu se vidjeti keratinizacije i međustanični mostovi. U manjem postotku susreće se karcinom velikih stanica kojeg karakteriziraju velike stanice poligonalnog oblika s pleomorfnim i vezikularnim jezgrama. Ovaj tip karcinoma najčešće je velik, nekrotičnog izgleda te smješten periferno. (11)

1.2.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Znakovi i simptomi mogu se razlikovati ovisno o vrsti tumora i opsegu metastaza, a najčešći su dispneja zbog opstrukcije dišnih puteva, hemoptiza, kašalj, pleuralna bol i sistemski simptomi poput gubitka kilograma i anoreksije. (12)

Dijagnostička procjena bolesnika sa sumnjom na rak pluća uključuje dijagnozu tkiva, cjelovitu obradu uključujući i procjenu metastaza te funkcionalnu procjenu pacijenta. Histološka dijagnoza može se dobiti torakocentezom, bronhoskopijom, citologijom sputuma, biopsijom dostupnih limfnih čvorova, transtorakalnom aspiracijom, torakoskopijom ili torakotomijom. Početna procjena metastatske bolesti temelji se na fizikalnom pregledu i anamnezi bolesnika i laboratorijskim pretragama, računalnoj tomografiji prsnog koša, pozitronskoj emisionoj tomografiji i potvrdi tkiva o zahvaćenosti medijastinuma. Daljnja procjena metastaza ovisi o kliničkoj prezentaciji. Liječenje i prognoza usko su povezani s vrstom i stadijem identificiranog tumora. Za stadij I do IIIA karcinoma nemalih stanica poželjna je kirurška resekcija. (13)

1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA

Dijagnoza i kliničko određivanje stadija karcinoma pluća ključni su za planiranje terapije. Postupci i metode u kliničkom određivanju stadija trebaju ići od manje prema više invazivnim. U posljednjem desetljeću slijede se smjernice koje su donijeli American College of Chest Physicians i European Society of Thoracic Surgeons. Stadij bolesti određuje se prema TNM klasifikaciji (T – veličina primarnog tumora, N – raširenost bolesti u regionalne limfne čvorove i M – prisustvo udaljenih metastaza). CT ostaje najbolja tehnika u kliničkom mjerenju veličine tumora. Veličina tumora jedan je od najvažnijih prognostičkih čimbenika raka pluća. Regionalni limfni čvorovi grupirani su u zone i stanice te se moraju pažljivo razmotriti u

postavljanju dijagnoze karcinoma pluća. Metastaze raka pluća mogu biti intra- ili ekstratorakalne.
(14)

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma pluća (14)

Parametar	Kratica
T	
Adenokarcinom <i>in situ</i>	Tis (AIS)
Minimalno invazivni adenokarcinom	T1mi
Tumor ≤ 1 cm	T1a
Tumor >1 cm i ≤ 2 cm	T1b
Tumor >2 cm i ≤ 3 cm	T1c
Tumor >3 cm i ≤ 4 cm i	T2a
Tumor >4 cm i ≤ 5 cm	T2b
Tumor >5 cm i ≤ 7 cm	T3
Tumor >7 cm	T4
Endobronhalno mjesto na bilo kojoj udaljenosti od glavne karine, ali	T2
Pneumonitis ili atelektaze cijelih pluća	T2
Invazija u dijafragmu	T4
Invazija u medijastinalnu pleuru	Nema T
N	
Zahvaćena jedana N1 stanica	N1a
Zahvaćeno više N1 stanica	N1b
Zahvaćen jedana N2 stanica bez N1	N2a1
Zahvaćeno više N2 stanica sa N1	N2a2
Zahvaćeno više N2 stanica	N2b
M	
Jedna ekstratorakalna metastaza	M1b
Višestruke ekstratorakalne metastaze na jednom ili više organa	M1c

Tablica 2. Stadiji karcinoma pluća (14)

Stadij	T	N	M
Okultni karcinom	TX	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA1	T1mi	N0	M0
	T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a, b, c	N1	M0
	T2a, b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a, b, c	N2	M0
	T2a, b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIB	T1a, b, c	N3	M0
	T2a, b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b
IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c

1.3.5. LIJEČENJE

Odabir načina liječenja ovisi o tipu i o stadiju tumora, a obuhvaća operabilnost, kemoterapiju i/ili zračenje. Osim tipa i stadija tumora, na izbor terapije utječu i drugi čimbenici kao što su komorbiditeti, fizički status osobe, uhranjenost i kardiopulmonalna rezerva. Operativni zahvat radi se samo bolesnicima koji bi nakon odstranjenja dijela ili čitavog plućnog krila i dalje imali adekvatnu plućnu rezervu. Bolesnici čiji je FEV1 (forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi) >2 L prije operacije u pravilu podnose pulmektomiju, dok oni čiji je FEV1 (forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi) <2 L prvo trebaju napraviti kvantitativnu ventilacijsko–perfuzijsku scintigrafiju pluća. Na taj način utvrđuje se koliki bi bio udio izgubljene plućne funkcije nakon resekcije. Izbor kemoterapije najčešće ovisi o toksičnosti i kontraindikacijama. Terapijske opcije za recidive su različite, a uglavnom ovise o lokalizaciji tumora. Ako se radi o lokalnom recidivu, ponavlja se kemoterapija, za metastaze radioterapija, a za endobronhalni tumor brahiterapija, ako bolesnik više ne podnosi dodano vanjsko zračenje. (15)

U liječenju karcinoma malih stanica, operacija nije izbor, osim ako je tumor malen i još se nije proširio. Ovaj tip karcinoma u bilo kojem stadiju dobro reagira na terapiju u početku, ali to ne traje dugo. Ako je tumor ograničen, kao najčešći terapijski protokol u 4 do 6 ciklusa koristi se kombinacija etopozida i spojeva platine, a česta je i kombinacija sa vinka alkaloidima, alkilirajućim sredstvima, doksorubicinom i taksanima. Ako se rak proširi, liječi se jednako kao i ograničeni, ali bez popratnog zračenja. U principu, recidiv karcinoma malih stanica nema dobru prognozu, iako se bolesnicima u dobrom kliničkom stanju može ponuditi sudjelovanje u kliničkim studijama.

Za I i II stadij bolesti karcinoma ne-malih stanica uobičajeno je kirurško uklanjanje sa uzorkovanjem ili potpunom disekcijom medijastinalnih limfnih čvorova. Operacija je kurativna za oko 55 do 75% bolesnika u I stadiju, te 35 do 55% bolesnika u II stadiju. Povećanje potpunog izlječenja i ukupnog 5–godišnjeg preživljenja postiže se primjenom vinorelbina u kombinaciji sa cisplatinom. U IIIA stadiju, kojeg karakterizira postojanje jednog ili više lokalno uznapredovalih tumora i zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova i metastaza koje se otkriju prilikom operacije, najčešće se kreće sa radioterapijom sa ili bez istodobne kemoterapije, posebno ako se radi o neoperabilnom tumoru. Najnovije studije pokazuju bolje rezultate kada kemoterapija i zračenje idu prije operacije. Bolesnici u stadiju IIIB, kojeg karakteriziraju kontralateralne metastaze ili pleuralni izljev, mogu primati radioterapiju ili

kemoterapiju ili kombinaciju jednog i drugog. Ako je bolest došla u IV. stadij, jedini terapijski cilj je ublažiti simptome bolesti (paliativna terapija). Za tumore pluća se koriste i novi biološki agensi, a najpoznatiji među njima je gefitinib (inhibitor EGFR) koji se primjenjuje ako bolesnici ne reagiraju na platinu ili docetaksel. Novi biološki agensi koji se istražuju su ostali inhibitori EGFR i inhibitori farnesil transferaze. (16)

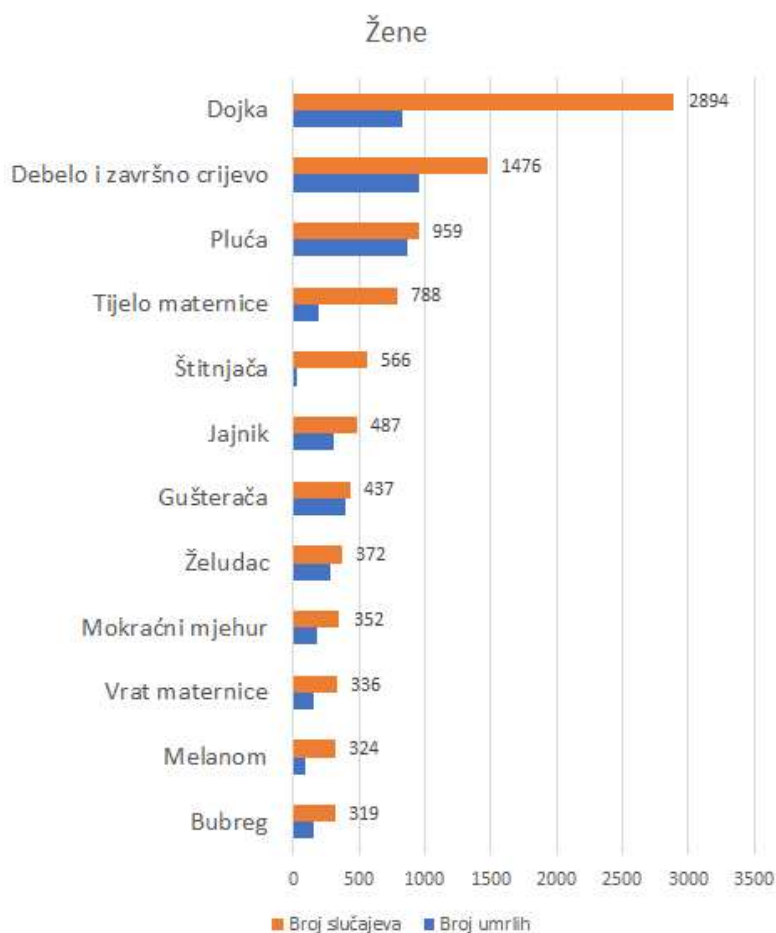
1.3. KARCINOM DOJKE

1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Rak dojke, najčešći rak kod žena, glavni je javnozdravstveni problem sa skoro milijun i 400 tisuća novih slučajeva širom svijeta i gotovo 460 tisuća povezanih smrtnih slučajeva. Po svojim patološkim karakteristikama rak dojke vrlo je raznolik. Postoje slučajevi koji pokazuju usporen rast s izvrsnom prognozom, ali postoje i mnogi agresivni tumori s lošijom prognozom. Raznim epidemiološkim studijama utvrđeni su različiti čimbenici rizika, a uključuju rasu, etničku pripadnost, obiteljsku povijest raka i genetske osobine, ali i tjelesnu neaktivnost, konzumaciju alkohola, egzogene hormone i određene čimbenike ženske reproduktivnosti. Statistika i trenutna predviđanja sugeriraju da su i broj novooboljelih od raka dojke i s tim povezana smrtnost u stalnom porastu. Stopa incidencije veća je u razvijenijim zemljama u odnosu na manje razvijene zemlje, no stopa smrtnosti je gotovo 17% viša u manje razvijenim zemljama. Relativne procjene preživljavanja od 5 godina se kreću od 12% u Africi, do gotovo 90% u Sjedinjenim Državama, Australiji i Kanadi. Gore navedene brojke odražavaju veličinu učestalosti raka dojke, njegov učinak na cjelokupno društvo kao i potrebu za hitnošću za preventivnim mjerama i mjerama liječenja. Epidemiološke studije sugeriraju da je rješavanje socioekonomskih pitanja od najveće važnosti, tj. da sve žene imaju jednak pristup medicinskoj skrbi od probira do naprednog liječenja. (17)

Američko onkološko društvo (*American cancer society*) smatra da će svaka osma žena u Sjedinjenim Državama razviti rak dojke tijekom svog života te predviđa da će svjetska incidencija raka dojke u žena doseći približno 3,2 milijuna novih slučajeva godišnje do 2050. (18)

Prema procjenama, u Hrvatskoj će 2020. godine biti dijagnosticirano skoro 3000 novih slučajeva raka dojke što ovaj rak stavlja na treće mjesto po broju novooboljelih ukupno i na prvo mjesto, ako se gleda samo ženski spol. (10)



Slika 4. Incidencija raka u Hrvatskoj za žene u 2020.g.

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

Datum pristupa: 05.10.2020.

1.3.2. PATOHISTOLOGIJA

Bolje razumijevanje čimbenika patogeneze, patohistologije i molekularnih mehanizama rizika dovelo je do velikog napretka u liječenju raka dojke. Većina tumora dojke su epitelni tumori koji se mogu razviti iz izvodnih kanalića (duktalni rak), iz žljezdanog parenhima dojke ili iz žljezdanih lobula (lobularni rak), a rjeđe su to neepitelni tumori potporne strome kao što su angiosarkom i primarni stromalni sarkomi. S obzirom na prodor kroz bazalnu membranu,

postoje dvije vrste raka dojke. *In situ* karcinom ne probija bazalnu membranu, dok naziv invazivni rak koristimo za onaj koji je probio bazalnu membranu. Postoji nekoliko histoloških tipova raka dojke. Na invazivni duktalni karcinom otpada 70 - 80 % slučajeva, 10 - 15% na invazivni lobularni dok su specifični histološki podtipovi raka, kao što su tubularni, metaplastični, mucinozni, papilarni, mikropapilarni te medularni, zastupljeni u manjem postotku. Imunohistokemijska i genska obilježja donijela su novu podjelu raka dojke na luminalne tumore tipa A i luminalne tumore tipa B, HER2 pozitivne i trostruko negativne. Tip A tumor karakterizira visoka razina estrogenskih i progesteronskih receptora, postotak Ki-67 antitijela manji od 20% te su HER2 negativni. Tip B karakteriziran je nižom razinom progesteronskih receptora (<20%), postotak antitijela Ki-67 viši od 20% i HER2 pozitivan ili negativan. Trostruko negativni (bez estrogenske, progesteronske i HER2 pozitivnosti) imaju najlošiju prognozu. (19)

1.3.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Simptomi raka dojke mogu se klasificirati u 3 glavne skupine. Prva je kvržica na dojci. Druga skupina su ostali simptomi dojke koji ne uključuju kvržicu, a to su bol u dojčkama, abnormalnosti kože ili oblika dojke i bradavice. U treću skupinu spadaju ostali opći simptomi kao što su umor, otežano disanje, aksilarni simptomi, bolovi u leđima ili kvržica na vratu. Kvržica na dojci je najčešći simptom, zabilježen u oko četiri petine svih žena. Od ostalih simptoma, po učestalosti slijede abnormalnosti bradavica (7%), bolovi u dojčkama (6%) i abnormalnosti kože dojke (2%). Napredak u dijagnostici raka dojke bitno je utjecao na terapiju i prognozu raka dojke u posljednjih nekoliko godina. Mamografija se smatra zlatnim standardom za rano otkrivanje raka dojke. Dijagnostičku točnost mamografije može povećati digitalna tomosinteza dojke pa se koristi za procjenu sumnjivih mamografskih nalaza. Ultrazvuk i magnetska rezonancija s pojačanim kontrastom (MRI) također imaju veliku ulogu u postavljanju dijagnoze i praćenju raka dojke. Perkutana biopsija brza je i minimalno invazivna metoda za histološku identifikaciju raka dojke. Nove metode snimanja dojke, poput spektralne mamografije s pojačanim kontrastom, MRI i MR spektroskopije s difuzijom mogu dodatno poboljšati dijagnostiku raka dojke. (20)

1.3.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE

Stadij karcinoma dojke određuju se prema TNM klasifikaciji (T – veličina primarnog tumora, N – raširenost bolesti u regionalne limfne čvorove i M – prisustvo udaljenih metastaza). TNM sustav ne može sa sigurnošću odrediti tijek i ishod bolesti kod pojedine bolesnice, ali liječnicima omogućuje procijeniti ishod i prognozu bolesti. Općenito, tumori većih dimenzija koji su zahvatili limfne čvorove te postojanje udaljenih metastaza svrstava rak u viši stadij te kao takav ima lošiju prognozu.(21)

Tablica 3. TNM klasifikacija karcinoma dojke (22)

Tis (DCIS)	Duktalni karcinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Pagetova bolest bradavice nepovezana sa invazivnim karcinomom i/ili DCIS u podložećem parenhimu
T1	tumor ≤ 20 mm u najvećem promjeru
T1mi	tumor ≤ 1 mm u najvećem promjeru
T1a	tumor > 1 mm, ali ≤ 5 mm u najvećem promjeru
T1b	tumor > 5 mm, ali ≤ 10 mm u najvećem promjeru
T1c	tumor > 10 mm, ali ≤ 20 mm u najvećem promjeru
T2	tumor > 20 mm, ali ≤ 50 mm u najvećem promjeru
T3	tumor > 50 mm u najvećem promjeru
T4	tumor bilo koje veličine s direktnom invazijom stijenke prsnog koša i/ili kože (ulceracija ili makroskopski kožni čvorovi)
T4a	ekstenzija tumora na stjenku prsnog koša; invazija ili adherencija pektoralnog mišića u odsutnosti invazije struktura stijenke prsnog koša ne kvalificira se kao T4
T4b	ulceracija i/ili ipsilateralni makroskopski satelitski čvor i/ili edem (uključujući 'peau d'orange') kože, koji ne uključuje kriterije inflamiranog karcinoma
T4c	prisutni kriteriji T4a i T4b
T4d	inflamirani karcinom
Nx	ne može se procijeniti (nije uzet uzorak za PHD analizu)
N0	nije se identificiralo metastaza u limfnim čvorovima ni ITC (eng. isolated tumor cells)

N0 (i+)	samo ITCs (nakupine malignih stanica ne veće od 0,2 mm) u regionalnim limfnim čvorovima
N0 (mol+)	pozitivan nalaz RT-PCR-om; nije se detektiralo ITCs
N1mi	mikrometastaze (> 0,2 mm, ali ≤ 2,0 mm)
N1a	metastaze u 1 – 3 aksilarna limfna čvora, najmanje 1 metastaza > 2,0 mm
N1b	metastaza u ipsilateralne interne mamarne limfne čvorove čuvare, isključujući ITC
N1c	N1a i N1b
N2a	metastaza u 4 – 9 aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit > 2,0 mm)
N2b	metastaze klinički detektirane u internim marnim limfnim čvorovima, sa ili bez mikroskopske potvrde; s patološki negativnim aksilarnim limfnim čvorovima
N3a	metastaza u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit > 2,0 mm) ili metastaza u infraklavikularne limfne čvorove (razina III aksilarnih limfnih čvorova)
N3b	N1a ili N2a u prisutnosti N2b (slikovnim metodama pozitivni interni marni limfni čvorovi); ili N2a u prisutnosti N1b
N3c	metastaze u ipsilateralne supraklavikularne limfne čvorove
M0 (i+)	bez kliničkog ili radiološkog dokaza o postojanju metastaze, uz prisutnost depozita tumorskih stanica < 0,2 mm dokazanog mikroskopski ili molekularnim metodama
M1	metastaza dokazana klinički ili slikovnim metodama i/ili histološki dokazana metastaza > 0,2 mm

Osim što se definira TNM status potrebno je definirati i stadij bolesti

Tablica 4. Stadiji karcinoma dojke (22)

Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij IA	T1	N0	M0
Stadij IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	
Stadij IIA	T0	N1	M0

	T1	N1	
	T2	NO	
Stadij IIB	T2	N1	M0
	T3	NO	
Stadij IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1,N2	
Stadij IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadij IIIC	Bilo koji T	N3	M0
Stadij IV	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

1.3.5. LIJEČENJE

Primarno liječenje u većine bolesnica je operacija, najčešće u kombinaciji sa zračenjem. Ovisno o osobinama tumora, dobi pacijentice, općem zdravlju i ostalim komorbiditetima može se isto tako primijeniti kemoterapija, hormonska terapija ili oboje. Kod upalnog ili uznapređovalog raka dojke, primarno liječenje je sistemsko, nakon kojeg slijedi operacija i radioterapija. Pagetova bolest bradavice liječi se kao i ostali oblici raka dojke, premda se rijetke bolesnice mogu uspješno liječiti samo lokalnom ekscizijom.

Većina bolesnica sa DCIS–om (duktalni karcinom *in situ*) se izliječi jednostavnom mastektomijom. Međutim, više bolesnica se liječi širokom ekscizijom ili kombinacijom sa zračenjem, kad su veličina i histološke osobine manje povoljne. Bolesnice s LCIS–om (lobularni karcinom *in situ*) se liječe svakodnevno, oralno tamoksifenom. Ukoliko ga pacijentice ne žele uzimati, u obzir dolazi obostrana mastektomija.

Liječenje metastaza produljuje prosječno preživljenje za samo 3 do 6 mj., premda relativno toksična liječenja (npr. kemoterapija) mogu ublažiti simptome i poboljšati kvalitetu života. Najučinkovitiji citotoksični lijekovi za metastatski rak dojke su kapecitabin, doksorubicin (uključujući i njegov liposomski pripravak), gemcitabin, taksani paklitaksel i dodetaksel te vinorelbin. Stope odgovora na kombinaciju lijekova su veće od onih na pojedinačni lijek, no preživljenje se ne produljava, a toksičnost se povećava. (23)

1.3. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA

1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Rak mokraćnog mjehura uglavnom je bolest starenja, tj. njegova učestalost i prevalencija povećava se oko šestog desetljeća, a vrhunac je u sedmom i osmom desetljeću života. Prosječna dob kod dijagnoze je otprilike 67 godina. Deveti je najčešći rak, s 430 tisuća novih slučajeva dijagnosticiranih u 2012. u svijetu. U prosjeku je 3 do 4 puta češći u muškaraca nego u žena, barem djelomično zbog veće učestalosti pušenja, ali i zbog razlika u metabolizmu povezano sa učinkom androgena. Stope incidencije su najviše u Europi, Sjedinjenim Državama i Egiptu. Postoje značajne razlike u učestalosti raka mokraćnog mjehura u svijetu, zbog razlika ne samo u podrijetlu, već i zbog razlika u standardu i životnim navikama te okolišnim čimbenicima. Pušenje cigareta, profesionalno izlaganje, izlaganje arsenu, infekcija bakterijom *Schistosoma haematobium* i neki lijekovi ostali su važni čimbenici rizika povezani s razvojem bolesti. (24)

U Hrvatskoj se rak mokraćnog mjehura po incidenciji kod muškaraca nalazi na četvrtom mjestu, a kod žena na devetom. (10)

1.4.2. PATOHISTOLOGIJA

Patološka procjena raka mokraćnog mjehura postaje sve složeniji zadatak zbog sve veće dostupnosti molekularnih podataka za različite histološke podtipove i uvažavanje njihove važnosti u određivanju ishoda neoadjuvantne kemoterapije. (25)

Rak mokraćnog mjehura histološki se dijeli na rak prijelaznog epitela, rak pločastih stanica, adenokarcinom i rak malih stanica. Karcinomi prijelaznog epitela čine 90 do 95% svih slučajeva raka mokraćnog mjehura. Tumori urotakta koji nisu podrijetla prijelaznog epitela mogu biti epitelni tumori (adenokarcinom, planocelularni karcinom), neuroendokrini tumori (karcinoid i neuroendokrini karcinom), neepitelni maligni tumori (sarkomi, hematološke maligne bolesti i melanom). Planocelularni karcinom drugi je prema učestalosti maligni tumor urotakta i može se podijeliti na onaj udružen sa shistosomijazom i onaj koji to nije. Obično je dobro diferenciran (60%) i pokazuje obilno orožnjavanje. Adenokarcinom je prema učestalosti treći maligni tumor urotakta. Neuroendokrini karcinomi mokraćnog mjehura

velikih i malih stanica izuzetno su rijetki te čine manje od 1% malignih tumora mokraćnog mjehura. Češći je onaj s malim stanicama, sličan karcinomu malih stanica pluća. Oko 75% karcinoma mokraćnog mjehura su površinski karcinomi. Oni ne prodiru u mišićni sloj i zahvaćaju samo površinske slojeve unutarnje stijenke mokraćnog mjehura. Za razliku od njih, 20% karcinoma mokraćnog mjehura su invazivni koji prodiru u mišićni sloj. Metastatski karcinom mokraćnog mjehura koji obično metastazira u limfne čvorove zdjelice, pluća, jetru, kosti, nadbubrežnu žlijezdu i crijeva čini oko 5%. (26)

1.4.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Najčešći simptom raka mokraćnog mjehura, koji se javlja u 80% bolesnika, je gruba, bezbolna hematurija. Hematurija može biti ili mikroskopska (vidljiva krv pod mikroskopom) ili krv koja je vidljiva u mokraći. Stupanj hematurije nije u korelaciji s ozbiljnošću bolesti. Iako se u bolesnika može pojaviti kontinuirana ili povremena hematurija, svi bolesnici koji imaju hematuriju trebaju se obratiti urologu kako bi se isključio rak mokraćnog mjehura. Važno je napomenuti da hematurija nije uvijek uzrokovana rakom mokraćnog mjehura već može biti uzrokovana i drugim uvjetima kao što su rak bubrega, rak prostate, intersticijski cistitis, bubrežni kamenac, benigna hiperplazija prostate i trauma. Iritativni znakovi i simptomi mokraćnog sustava, poput veće učestalosti mokrenja, hitnosti i disurije, manje su česti i pogađaju 30% bolesnika s rakom mokraćnog mjehura. Kasni znakovi i simptomi povezani s invazivnim ili metastatskim karcinomom mjehura uključuju bol u bokovima i zdjelici, zadržavanje mokraće, edem donjih ekstremiteta, gubitak težine te bolovi u kostima. (27)

Dijagnostički testovi koji ispituju urin i mjehur služe za otkrivanje karcinoma mokraćnog mjehura. Uzimanjem anamneze, fizikalnim pregledom, analizom i citologijom urina prikupljaju se prvi dijagnostički podaci. U pravilu se ide na intravensku urografiju i cistoskopiju s biopsijom opaženih promjena jer citologija urina, koja može otkriti maligne stanice, bude često negativna. Mjesto određivanja urinarnog antigena i genetskih biljega još nije utvrđeno. Za stupnjevanje očito površinskih novotvorina (70–80% svih tumora) dovoljna je cistoskopija s biopsijom. Za druge neoplazme treba snimiti abdominopelvični CT i radiogram prsnog koša, kako bi se utvrdila proširenost tumora i eventualne presadnice. Koristan je bimanualni pregled u anesteziji, kao i MR. Primjenjuje se standardno TNM stupnjevanje. (28)

1.4.4. KLASIFIKACIJA TUMORA MOKRAĆNOG MJEHURA

Zbog prognoze bolesnika i odgovarajućeg izbora potrebno je procijeniti proširenost bolesti. Procjenu proširenosti bolesti izražavamo TNM- klasifikacijom Američkog združenog odbora za rak (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*)

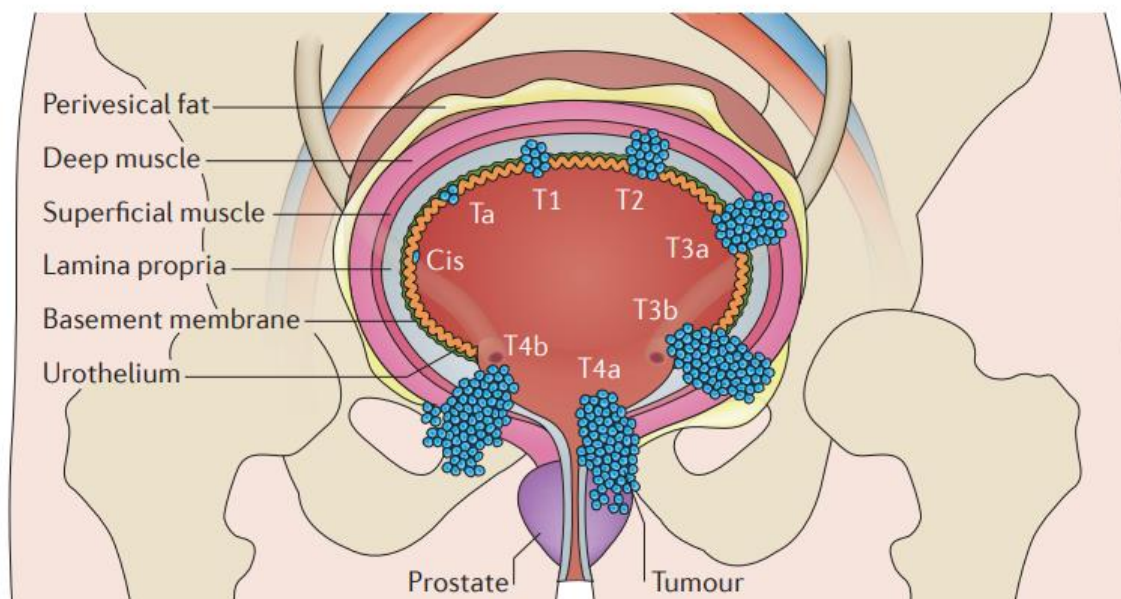
Tablica 5. TNM klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto sa <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html> Datum pristupa: 13.10.2020.

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

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

IVA	T4b	Karcinom je prošao zid mokraćnog mjehura u zdjelicu 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 5. Stadiji karcinoma mokraćnog mjehura

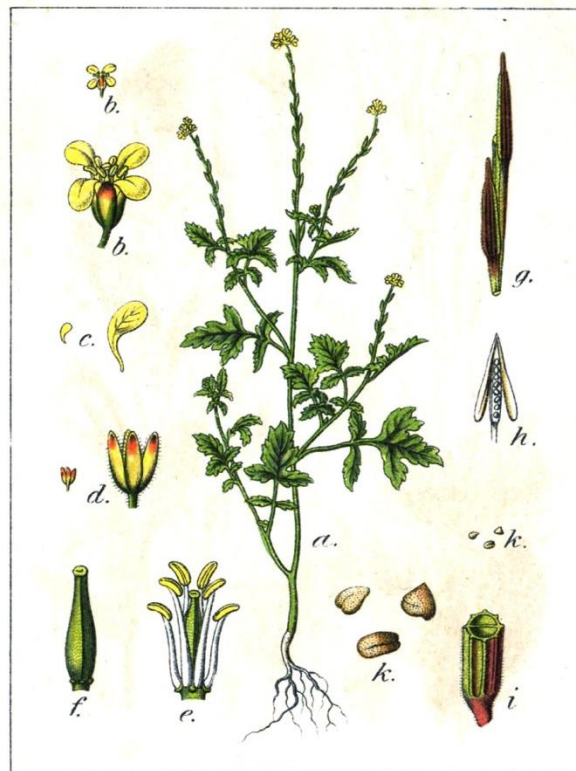
Preuzeto sa: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29384523/> Datum pristupa: 08.10.2020.

1.4.5. LIJEČENJE

U modernoj onkologiji zaštita organa multimodalnom terapijom koristi se kod više bolesti, uključujući i rak mokraćnog mjehura. Iako se najčešće radikalna cistektomija koristi za liječenje mišićno invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura (MIBC, od engl. *muscle invasive bladder cancer*), trimodalna terapija (TMT) nudi usporedive onkološke ishode uz očuvanje nativnog mokraćnog mjehura u više od 70% bolesnika. TMT se sastoji od maksimalne transuretralne resekcije tumora mokraćnog mjehura praćen radioterapijom s istodobnom kemoterapijom. Većina bolesnika s TMT-om postiže klinički potpuni odgovor (70–80%), izbjegavajući radikalnu cistektomiju, a istovremeno nudeći dugoročnu stopu preživljavanja. Petogodišnja stopa preživljenja bila je 84%, a desetogodišnja 79%. Pacijenti s malim tumorima idealni su pacijenti za TMT kako bi se očuvao mokraćni mjehur. (29)

1.5. *SISYMBRIUM* SPP.

Sisymbrium je rod biljaka iz porodice krstašica (*Brassicaceae*). Biljke nose bijele ili žute cvjetove s četiri latice, sjemenke su im duge i tanke, a listovi su obično grubi i duboko rezani. U rod *Sisymbrium* ubraja se više vrsta od kojih, zbog njihovog potencijalnog citotoksičnog djelovanja, ovdje izdvajamo *Sisymbrium officinale* (L.) i *Sisymbrium orientale*. (30)



Slika 6. *Sisymbrium officinale* (L.)

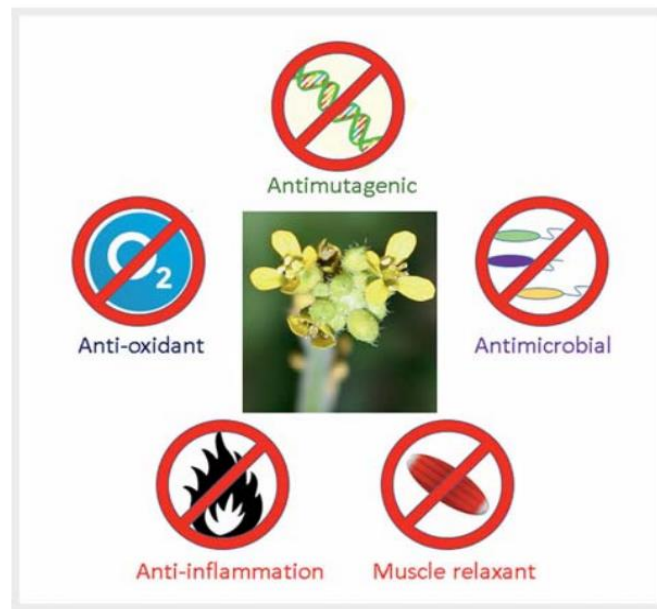
Preuzeto sa: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Sisymbrium+officinale>

Datum pristupa: 13.10.2020.

1.5.1. *SISYMBRIUM OFFICINALE* (L.)

Sisymbrium officinale (L.) Scop ili hrvatskim nazivom ljekoviti oranj ili strižuša je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka iz porodice *Brassicaceae*. Rasprostranjena je gotovo na cijelom području Europe, osim krajnjeg sjevera, Maloj Aziji i sjevernoj Africi, a raste divlje uz ceste i putove te na suhim livadama. Mladi izdanci biljke mogu se jesti sirovi ili kuhani, a jaka infuzija cijele biljke koristila se za sve bolesti grla. Ljekoviti oranj poznati je

ekspektorans, a svoju primjenu nalazi kod promuklosti, kašlja, astme i ulceracija grla, a smatra se i da djeluje kao diuretik u mokraćnim opstrukcijama. Poznato je da su glavne hlapljive tvari biljaka *Brassicaceae* glukozinolati, tj. njihovi razgradni produkti, uglavnom izotiocijanati i nitrili, koji su dobiveni enzimskim procesima ili toplinskom razgradnjom, odgovorni za njihove različite biološke učinke. (31) Zabilježeno je da su izotiocijanati biološki najaktivniji spojevi te da imaju djelovanje širokog spektra protiv bakterijskih i gljivičnih patogena, nematoda, insekata. Nitrili su također biološki aktivni, ali je njihov učinak manji nego izotiocijanata. Neka ispitivanja su također pokazala antioksidativna svojstva, uključujući neutralizaciju superoksidnog aniona, inhibiciju peroksidacije lipida i keliranje i smanjenje željeza. Neke frakcije bile su bogate polifenolima i flavonolima, što sugerira moguću ulogu ovih spojeva u antimutagenosti, posebno ako se uzime u obzir da je oksidativni stres odgovoran za različita oštećenja stanica. (32,33)



Slika 7. Biološka svojstva biljke *Sisymbrium officinale* (L.)

Preuzeto sa: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32018307/>

Datum pristupa: 13.10.2020.

Compound name	RI ^{a)}		Peak area [%]		
	(HP-FFAP)	(HP-101)	I ^{b)}	II ^{c)}	III ^{d)}
<i>Isothiocyanates and nitriles</i>					
24 2-Methylpropanenitrile ^{e)} f)	<1200	–	0.5	1.4	18.8
25 2-Methylbutanenitrile ^{e)} f)	1091	–	–	–	4.6
26 Isopropyl isothiocyanate ^{e)} f)	1304	1148	48.9	27.6	28.7
27 <i>sec</i> -Butyl isothiocyanate ^{e)} f)	1370	903	9.4	4.9	5.0
28 Benzenacetoneitrile ^{e)} f)	2086	1174	–	–	0.7
29 Benzenpropanenitrile ^{e)} f)	2202	–	–	–	0.3
Group sum [%]			58.8	33.9	58.1

^{a)} RI (HP-FFAP): Retention indices on HP-FFAP column; RI (HP-101): retention indices on HP-101 column. ^{b)} I = fresh plant material – hydrodistillation. ^{c)} II = fresh plant material – hydrodistillation upon autolysis. ^{d)} III = dried plant material – hydrodistillation. ^{e)} Compound identified by mass spectra and RI comparison with homemade library. ^{f)} Compound identified by mass spectra comparison with Wiley library. ^{g)} – = Not detected. ^{h)} tr. = Traces < 0.01 mg/kg. ⁱ⁾ Correct isomer is not identified. ^{j)} Compound identified by mass spectra comparison with literature values.

Slika 8. Kemijski sastav hlapljivih sastojaka dobivenih hidrodestilacijom (izotiocijanati i nitrili) iz biljke *Sisymbrium officinale* (L.)

Preuzeto sa: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20730965/> Datum pristupa: 13.10.2020

1.5.2. SISYMBRIUM ORIENTALE

Sisymbrium orientale vrsta je cvjetnica iz porodice *Brassicaceae* poznata pod imenom Indijska gorušica. Baš poput *Sisymbrium officinale* (L.), rasprostranjena je u većem dijelu Europe, Azije i sjeverne Afrike, a može se naći i u ostalim dijelovima svijeta kao uvedena vrsta te na nekim područjima i kao uobičajeni korov pored puta. (30)

Sjeme se koristi kao ekspektorans, tonik za povišenu temperaturu, a primjenu je našla i u liječenju bronhitisa, dizenterije i vodenih kozica. Neki dijelovi biljke također pokazuju i diuretsko djelovanje. *Sisymbrium orientale* nalazi svoju primjenu u eradikaciji crvića i u terapiji neaktivnih i neuznapredovalih čireva. (34)

1.6. IZOTIOCIJANATI

Izotiocijanati (ITC) su bioaktivni spojevi koji nastaju enzimatskom hidrolizom glukozinolata (GL) enzimom mirozinaza te su najzastupljeniji sekundarni metaboliti u botaničkom redu krstašica (*Brassicaceae*). U netaknutoj biljci mirozinaza se čuva odvojeno od GL-a. Kada dođe do oštećenja biljnog tkiva promjenom ili poremećajem tkiva uzrokovanim usitnjavanjem, mirozinaza dolazi u kontakt s glukozinolatima i utječe na njihovu hidrolizu i, posljedično, proizvodnjom ITC-a. Opća kemijska formula izotiocijanata je $R-N=C=S$. To su spojevi jakog okusa i arome, hlapljivi su i nastaju pri neutralnom pH kada nestabilni aglukonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji. Ovisno o načinu primjene, nastaju različite količine izotiocijanata. Izotiocijanati su vrlo reaktivni, a zbog toksičnosti se smatraju pogodnim kandidatima za pesticidnu aktivnost. Poznato je da ITC ima mnoge učinke na ljudsko zdravlje posebno nakon redovite konzumacije jestivih dijelova povrća iz porodice *Brassicaceae* bogatih glukozinolatima. Raznim istraživanjima pokazano je da imaju povoljno djelovanje na kardiovaskularni i središnji živčani sustav, infekcije s *Helicobacter pylori* i *E. coli* te pomažu u obnovi kožne barijere. (35)

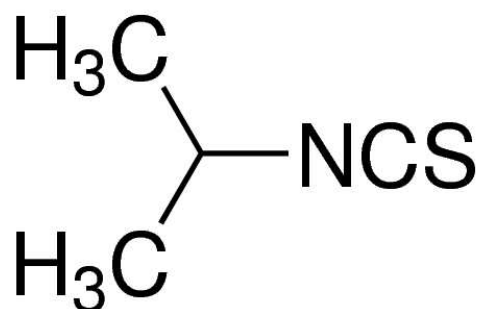
1.6.1. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST IZOTIOCIJANATA

Istraživanja su pokazala da izotiocijanati poput sulforafana (SFN), alil izotiocijanata (AITC), benzil izotiocinanata (BITC), fenil izotiocijanata (PITC) i izopropil izotiocijanata (IPRITC) inhibiraju rast bakterija i litički razvoj profaga. Mehanizam u osnovi antimikrobnog učinka ITC-a uključuje indukciju globalnog bakterijskog regulacijskog sustava. Gvanozin penta / tetrafosfat ((p) ppGpp) utječe na glavne stanične procese, uključujući sintezu nukleinskih kiselina, što dovodi do učinkovite inhibicije i indukcije profaga i sinteze toksina. Stoga bi se ITC-i mogli smatrati potencijalnim terapijskim sredstvom kod infekcija enterohemoragičnom *E. coli*. (36)

1.6.2. IZOPROPIL IZOTIOCIJANAT

Izopropil izotiocijanat je derivat izotiocijanata, identificiran kao jedan od hlapljivih komponenti dobivenih iz zrna sjemena i lista biljke *Moringa Peregrina* ili hidrolizata biljke

Sisymbrium officinale (L.). Molekularne konformacije izopropil izotiocijanata u plinskoj fazi određene su ispitivanjima difrakcije elektrona. Laboratorijski se može sintetizirati uporabom izopropil amina kao polaznog reagensa. Izopropil izotiocijanat koristi se za sintezu 4-bromo-5,6-dikloro-2-izopropilaminobenzimidazola. Antimutagena aktivnost ovog spoja bila je procijenjena u testu reverzne mutacije bakterija korištenjem *E. coli*.



Slika 9. Izopropil izotiocijanat

Preuzeto sa: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isopropyl-isothiocyanate> Datum pristupa: 13.10.2020.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

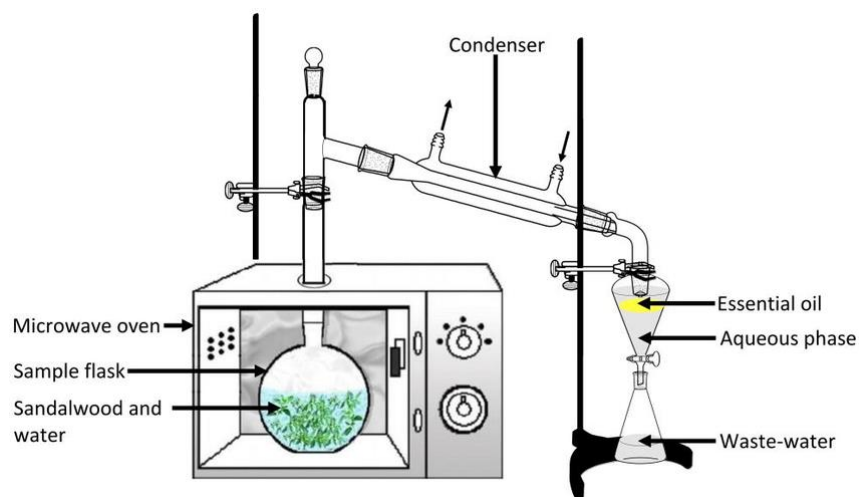
Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje uzoraka iz vrsta *Sisymbrium officinale* (L.) i *Sisymbrium orientale* dobivenih autolizom cvijeta, autolizom komuščice, mikrovalnom destilacijom, mikrovalnom ekstrakcijom i Clevenger hidrodestilacijom te izopropil izotiocijanata na različitim linijama humanih karcinoma. Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnoj aktivnosti ispitivana je na stanicama karcinoma pluća (A549), trostruko negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231) te karcinoma mokraćnog mjehura (T24).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. METODE IZOLACIJE

3.1.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA I DESTILACIJA

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju se sastoji od dva dijela čime su omogućene dvije vrste izolacije biljnog sadržaja. Gornji dio aparature omogućava izolaciju hlapljivih spojeva (engl. *fragrance*). Radi se o procesu mikrovalne destilacije čiji je konačni produkt eterično ulje. Usitnjeni biljni materijal se stavi u staklenu posudu koja se zatvori poklopcem. Na posudu se poveže sustav za refluks te hladilo. U desnu vertikalnu cijev se napuni voda. Voda će poslužiti kao medij u kojem će se prikupiti hlapljivi spojevi koje će se po završetku destilacije odvojiti pomoću male količine pentana. Uvjeti pri kojim se izvodi destilacija: snaga od 500W i temperatura 98°C u trajanju od 35 minuta. Nakon završetka destilacije, sloj pentana i hlapljivih spojeva se odvoji propipetom i prebaci u čistu čašu, a ostatak vode ispusti preko pipca. Sadržaj čaše se posuši s bezvodnim natrijevim sulfatom u slučaju da ima zaostale vode. Zatim se eterično ulje prebaci u prethodno izvaganu bočicu. Dio organskog otapala zaostalog u uzorku se uklanja uparivačem u struji dušika, nakon čega uzorak ide na GC-MS (*Gas chromatography–mass spectrometry*) analizu. Uzorak se do analize čuva u zamrzivaču. Donji dio aparature omogućava izolaciju aroma (engl. *flavour*). Uz pomoć mikrovalova i djelovanjem gravitacijske sile, u čaši postavljenoj na dnu aparature, sakuplja se ekstrakt. Uvjeti za mikrovalnu ekstrakciju su identični onima za mikrovalnu destilaciju (500 W, 35 minuta). Po završetku ekstrakcije dobiven je ekstrakt koji se prelije u lijevak za odijeljivanje te se ekstrahira s 3 puta po 10 mL diklormetana. Diklormetanski sloj se odvoji, ispusti preko pipca te suši bezvodnim natrijevim sulfatom. Konačni ekstrakt se prebaci u prethodno izvaganu bočicu te se višak organskog otapala otkloni uparivanjem u struji dušika kao i u slučaju mikrovalne destilacije. Tako dobiveni uzorci se čuvaju u frižideru i spremni su za GC-MS analizu.



Slika 10. Mikrovalna ekstrakcija i destilacija

Preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-microwave-assisted-extraction-apparatus-used-in-this_fig1_303503961 Datum pristupa: 22.10.2020.

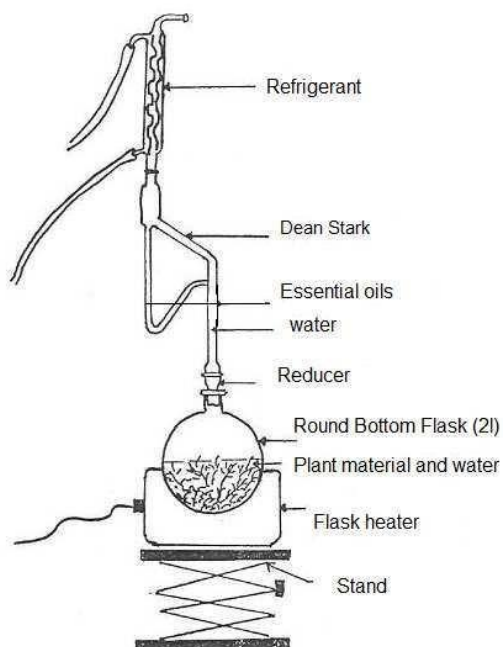
3.1.2. AUTOLIZA (EKSTRAKCIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA)

Prije ekstrakcije, uzorci su stavljeni na autolizu. Uzorci odgovarajućih masa su stavljeni u tikvice u koje je dodana mala količina destilirane vode i alikvot otopine enzima mirozinaze. Kako bi se potaknula razgradnja glukozinolata, u svaki uzorak je dodano po 10 mL organskog otapala (diklormetan). Uzorci u tikvici, omotani parafilmom, su stavljeni na tresilicu oko 10 minuta. Po završetku, sadržaj tikvica je profiltriran preko cjediljke (ovisno o finoći materijala) i filter papira u lijevak za odjeljivanje. Sadržaj lijevka za odjeljivanje je izmućkan, a donji sloj je, nakon odvajanja, odliven u čašu u koju je stavljen bezvodni natrijev sulfat za adsorpciju zaostale vode. Biljni materijal se dodatno ispiri s malom količinom diklormetana, a postupak odjeljivanja se ponavlja. Odvojeni ekstrakti se spremaju u bočice koje se čuvaju u hladnjaku do analize.

3.1.3. CLEVENGER HIDRODESTILACIJA

Hidrodestilacija biljnog materijala odvija se u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata. Kao trap koristi se smjesa organskih otapala pentana i dietiletera u omjeru 3:1 (6 mL+2 mL).

Eterično ulje dobiveno nakon destilacije je odvojeno od vodenog sloja pomoću propipete te je posušeno bezvodnim natrijevim sulfatom u svrhu uklanjanja viška vode. Zatim je eterično ulje prebačeno u prethodno odvagano bočicu i spremljeno u zamrzivač do analize na GC-MS-u.



Slika 11. Clevenger hidrodestilacija

Preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/Hydrodistillation-by-Clevenger-apparatus7-8_fig1_283806910 Datum pristupa: 22.10.2020.

3.2. STANIČNE LINIJE

In vitro ispitivanje citotoksičnog djelovanja uzoraka dobivenih iz *Sisymbrium* spp. te izotiocijanata provodilo se na humanim karcinomskim stanicama A549, MDA-MB-231 te T24. Obilježja ovih staničnih linija prikazana su u tablicama 6., 7., i 8.

Tablica 6. Obilježja A549 stanične linije.

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx>

Datum pristupa: 14.10.2020.

Organizam	<i>Homo sapiens</i>, čovjek
Tkivo	pluća
Tip stanica	epitelne
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	karcinom
Dob	58 godina
Spol	muški
Etnicitet	bijela rasa
Primjena	ova stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju.
Uvjeti pohrane	parna faza tekućeg dušika

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

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>

Datum pristupa: 14.10.2020.

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	mlječna žlijezda / dojka; izvađeno iz metastatskog mjesta: pleuralni izljev
Tip stanica	epitelne
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	adenokarcinom
Dob	51 godina
Spol	žensko
Etnicitet	bijela rasa
Primjena	ova stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju.
Uvjeti pohrane	parna faza tekućeg dušika

Tablica 8. Obilježja T24 stanične linije.

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-4.aspx>

Datum pristupa: 14.10.2020.

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	Mokraćni mjehur
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznog epitela
Dob	81 godina
Spol	žensko
Etnicitet	bijela rasa
Primjena	ova stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju.

3.3. POSTUPAK

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

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

Brojanje stanica radi se tako da se 50 µl stanica pomiješa s 50 µl Trypan Blue boje koja oboji mrtve stanice te tako omogućava brojenje živih stanica koje nisu obojane. Potom se jednak broj stanica presađuje u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu.

U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim uzorcima dobivenim iz roda *Sisymbrium* spp. i izopropil izotiocijanatom u koncentracijama 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL tijekom 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. U tri jažice, koje predstavljaju kontrolu, dodan je samo medij.



Slika 12. Vlažni inkubator za uzgoj stanica

Preuzeto sa: <https://nuve.com.tr/Products/Incubation/ec-160-co2> Datum pristupa: 14.10.2020.

3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

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

Omjer apsorbancije stanica tretiranih uzorcima dobivenih iz *Sisymbrium* spp. i izopropil izotiocijanatom te apsorbancije onih koje nisu tretirane, pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih uzoraka i izopropil izotiocijanata.



Slika 13. Ljubičasto obojenje nakon dodavanja DMSO

Preuzeto sa: <http://induced.info/?s=MTT+assay++an+overview++ScienceDirect+Topics>

Datum pristupa 14.10.2020.



Slika 14. Spektrofotometar

Preuzeto sa: <https://biosan.lv/products/hipo-mpp-96-microplate-photometer/>

Datum pristupa: 14.10.2020.

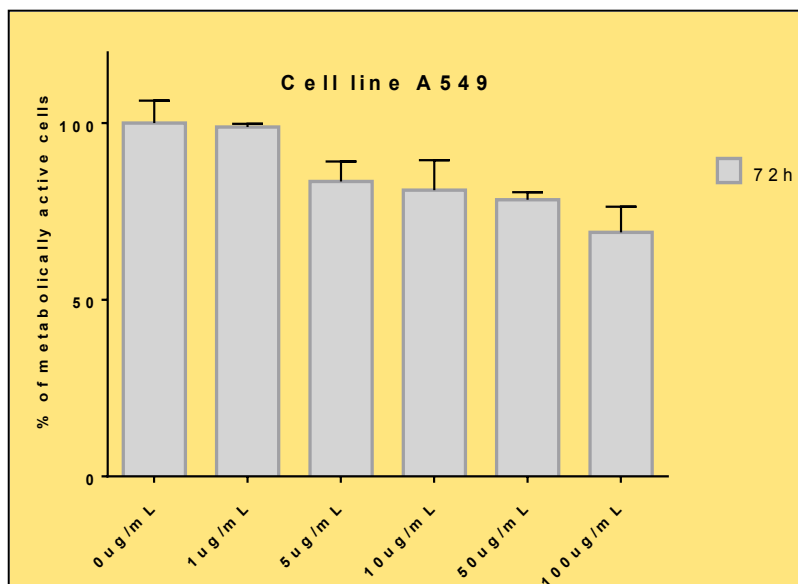
3.5. STATISTIČKA ANALIZA

Za statističku analizu korišten je statistički program GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD) sa statističkom značajnošću $P < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. KARCINOM PLUĆA – STANIČNA LINIJA A549

4.1.1. *SISYMBRIUM OFFICINALE* (L.), AUTOLIZA CVIJETA

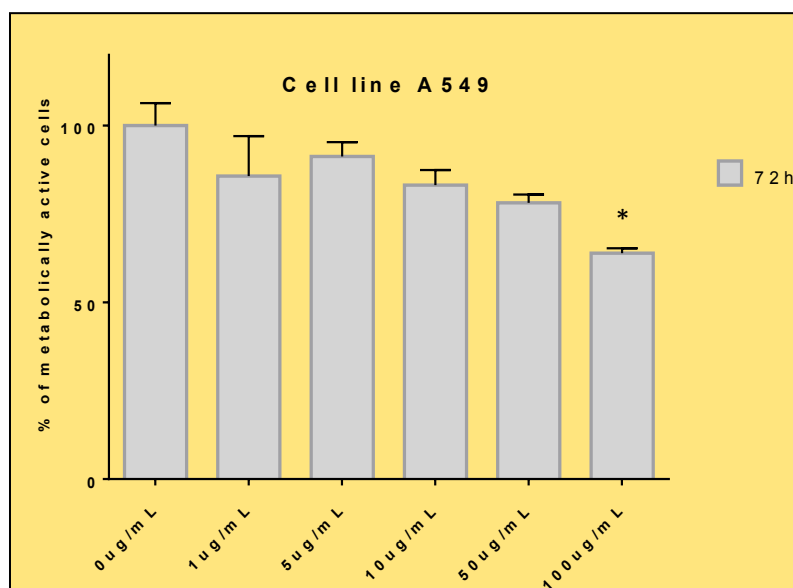


Slika 15. Citotoksičnost *Sisymbrium officinale* (L.), autoliza cvijeta nakon 72h na staničnu liniju A549

Uzorak dobiven autolizom cvijeta biljke *Sisymbrium officinale* pokazuje blagi citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h, počevši od koncentracije 5 µg/ml. Porastom koncentracije raste i citotoksični učinak odnosno postotak metabolički aktivnih stanica se smanjuje, ali ne značajno.

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

4.1.2. *SISYMBRIUM OFFICINALE* (L.), MIKROVALNA DESTILACIJA

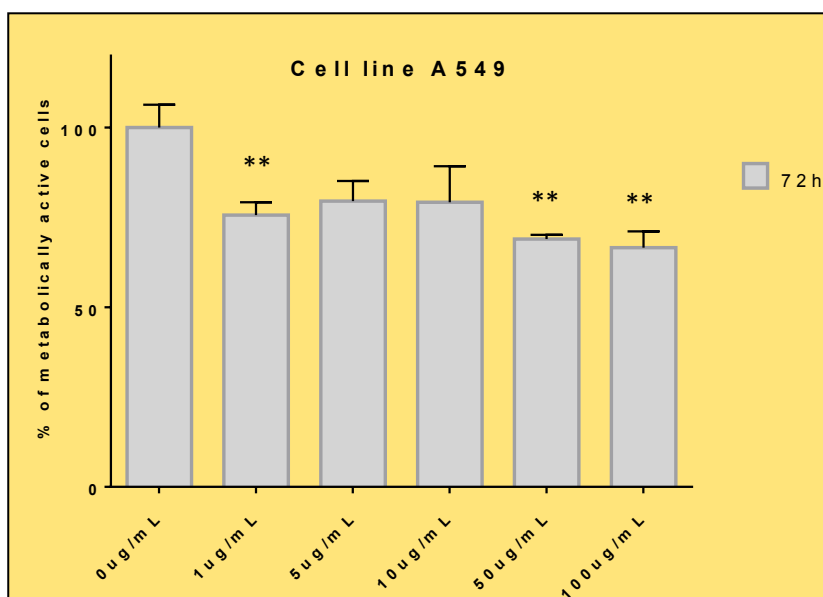


Slika 16. Citotoksičnost *Sisymbrium officinale* (L.), mikrovalna destilacija nakon 72h na staničnu liniju A549 (*P<0.05)

Uzorak dobiven mikrovalnom destilacijom biljke *Sisymbrium officinale* (L.) pokazuje blagi citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h, počevši od koncentracije 1 µg/ml. Porastom koncentracije raste i citotoksični učinak, odnosno postotak metabolički aktivnih stanica se smanjuje uz neočekivano odstupanje pri koncentraciji od 5 µg/ml. Tretiranje stanica koncentracijom od 100 µg/ml dovodi do smanjenja metabolički aktivnih stanica na 67% (P<0.05).

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

4.1.3. *SISYMBRIUM OFFICINALE* (L.), MIKROVALNA EKSTRAKCIJA



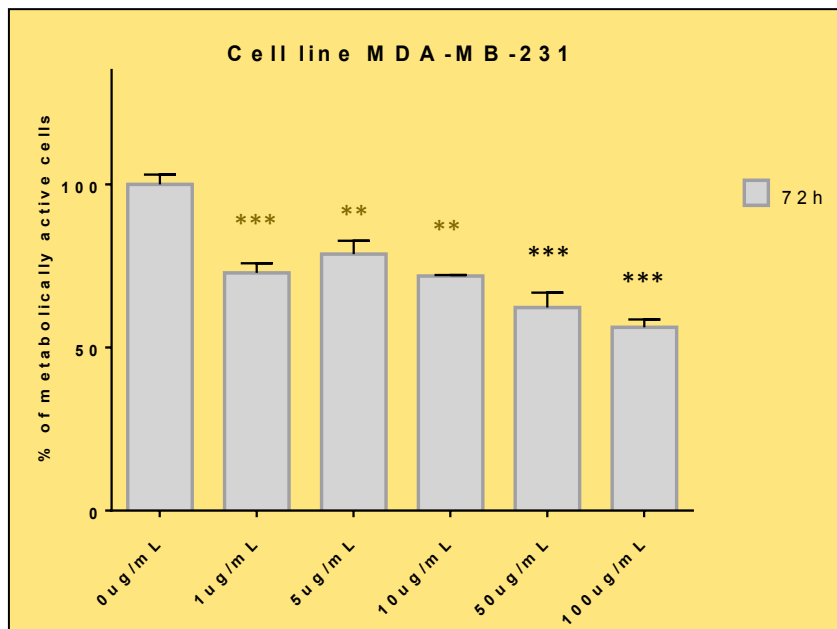
Slika 17. Citotoksičnost *Sisymbrium officinale* (L.), mikrovalna ekstrakcija nakon 72h na staničnu liniju A549 (**P<0.01)

Uzorak dobiven mikrovalnom ekstrakcijom biljke *Sisymbrium officinale* (L.) pokazuje citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h, počevši od koncentracije 1 µg/ml, pri kojoj se broj metabolički aktivnih stanica smanjuje na 79% (P<0.01). Veće koncentracije pokazale su sličan ili neznatno bolji citotoksičan učinak.

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

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

4.2.1. *SISYMBRIUM OFFICINALE* (L.) AUTOLIZA CVIJETA

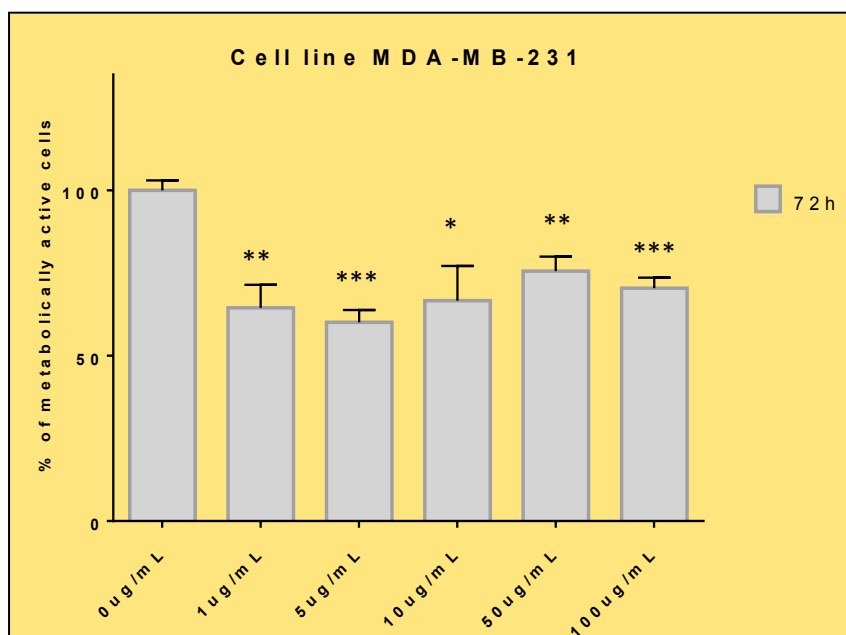


Slika 18. Citotoksičnost *Sisymbrium officinale* (L.), autoliza cvijeta nakon 72h na staničnu liniju MDA –MB-231 (**P<0.01; ***P<0.001)

Uzorak dobiven autolizom cvijeta biljke *Sisymbrium officinale* (L.) pokazuje značajan citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h, počevši od koncentracije 1 µg/ml, gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na 72% (P<0.001). Maksimalni učinak vidljiv je pri koncentraciji 100 µg/ml, pri kojoj se postotak metabolički aktivnih stanica još više smanjuje (56%, P<0.001).

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

4.2.2. *SISYMBRIUM OFFICINALE* (L.), MIKROVALNA DESTILACIJA

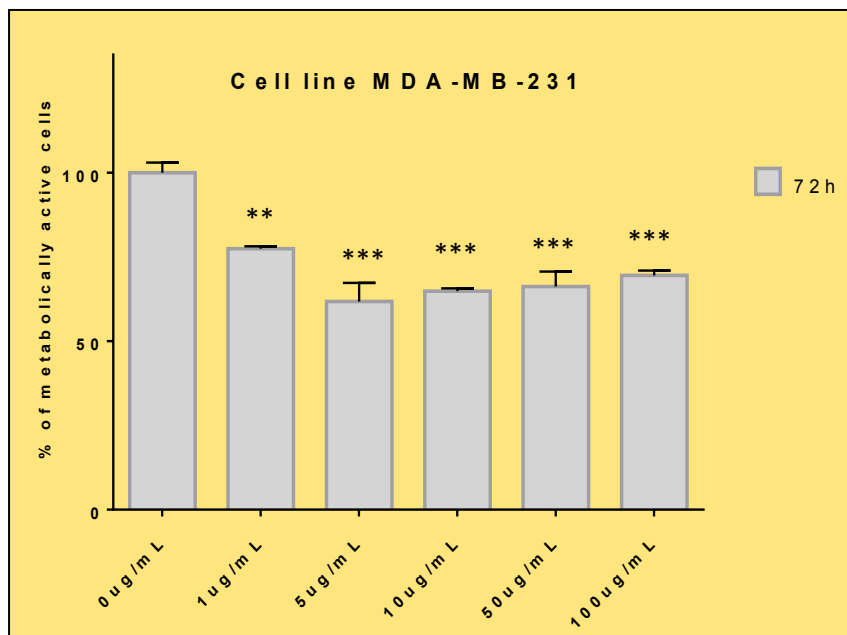


Slika 19. Citotoksičnost *Sisymbrium officinale* (L.), mikrovalna destilacija nakon 72h na staničnu liniju MDA-MB-231 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

Uzorak dobiven mikrovalnom destilacijom biljke *Sisymbrium officinale* (L.) ostvaruje citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h, počevši od koncentracije 1 µg/ml (64% metabolički aktivnih stanica, $P < 0.01$). Maksimalni učinak vidljiv je pri koncentraciji 5 µg/ml, pri kojoj se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na 59% ($P < 0.001$). Daljnjim povećanjem koncentracije dobiven je neočekivani porast broja aktivnih metaboličkih stanica.

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

4.2.3. *SISYMBRIUM OFFICINALE* (L.), CLEVINGER HIDRODESTILACIJA

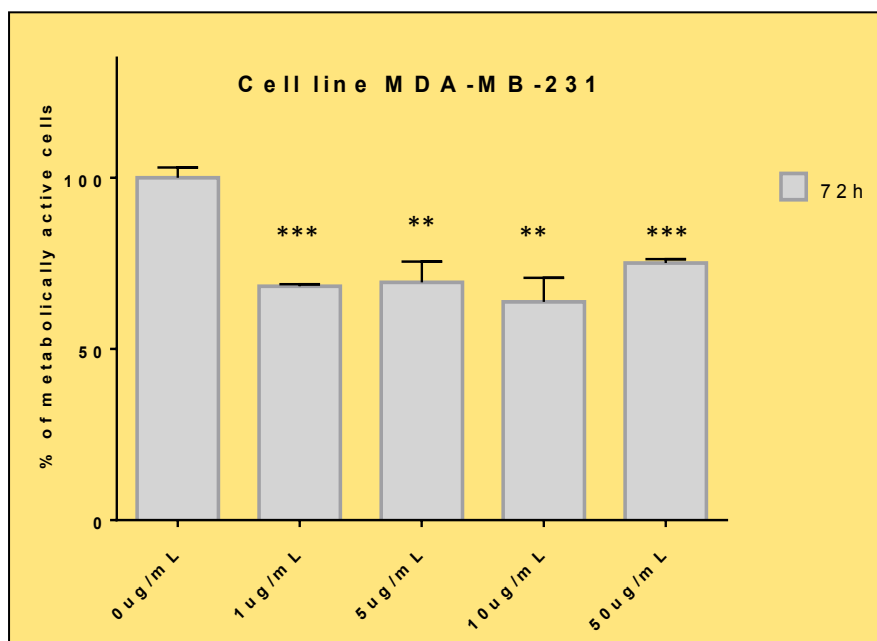


Slika 20. Citotoksičnost *Sisymbrium officinale* (L.), Clevenger hidrodestilacija nakon 72h na staničnu liniju MDA-MB-231 (**P<0.01; ***P<0.001)

Uzorak dobiven Clevenger hidrodestilacijom biljke *Sisymbrium officinale* (L.) pokazuje citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h, počevši od koncentracije 1 µg/ml. Maksimalni učinak vidljiv je pri koncentraciji 5 µg/ml, pri kojoj se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na 61% (P<0.01). Daljnjim povećanjem koncentracije dobiven je neznatan porast postotka aktivnih metaboličkih stanica.

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

4.2.4. *SISYMBRIUM OFFICINALE* (L.), MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

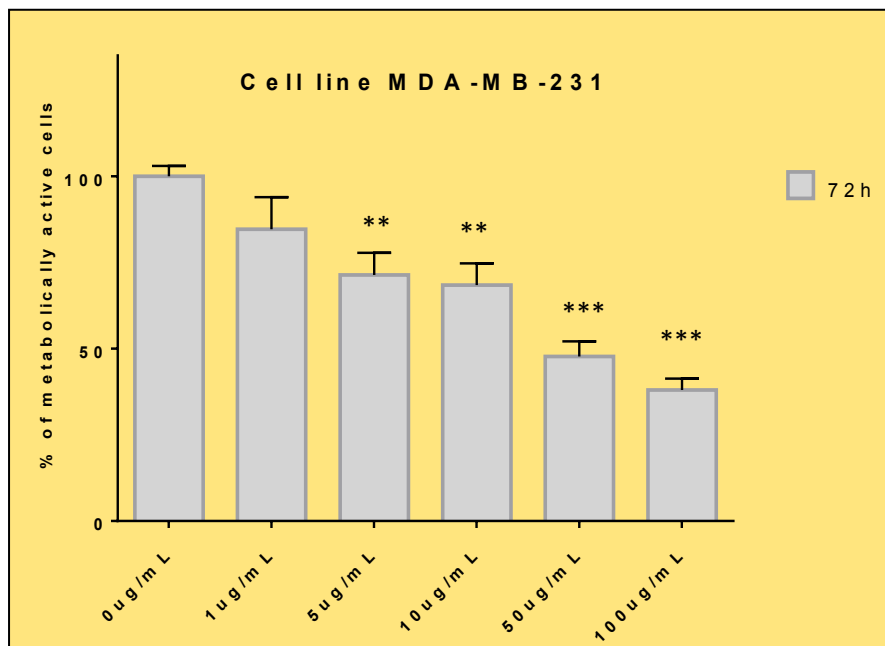


Slika 21. Citotoksičnost *Sisymbrium officinale* (L.), mikrovalna ekstrakcija nakon 72h na staničnu liniju MDA-MB-231 (**P<0.01; ***P<0.001)

Uzorak dobiven mikrovalnom ekstrakcijom biljke *Sisymbrium officinale* (L.) pokazuje citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h, počevši od koncentracije 1 µg/ml, pri kojoj se broj metabolički aktivnih stanica smanjuje na 68% (P<0.001). Veće koncentracije pokazale su sličan citotoksični učinak.

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

4.2.5. *SISYMBRIUM ORIENTALE*, AUTOLIZA KOMUŠČICE

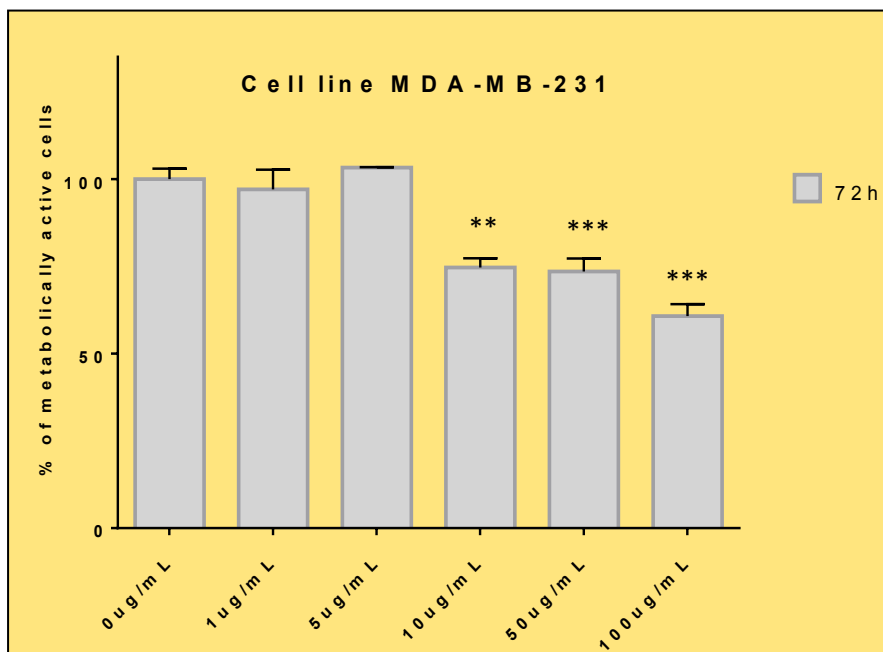


Slika 22. Citotoksičnost *Sisymbrium orientale*, autoliza komuščice nakon 72h na staničnu liniju MDA-MB-231 (**P<0.01; ***P<0.001)

Uzorak dobiven autolizom komuščice biljke *Sisymbrium orientale* pokazuje citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h počevši od koncentracije 5 µg/ml (71% metabolički aktivnih stanica, P<0.01). Povećanjem koncentracije povećava se i citotoksični učinak, odnosno broj metabolički aktivnih stanica smanjuje se na 38% pri koncentraciji 100 µg/ml (P<0.001).

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

4.2.6. *SISYMBRIUM ORIENTALE*, CLEVINGER HIDRODESTILACIJA

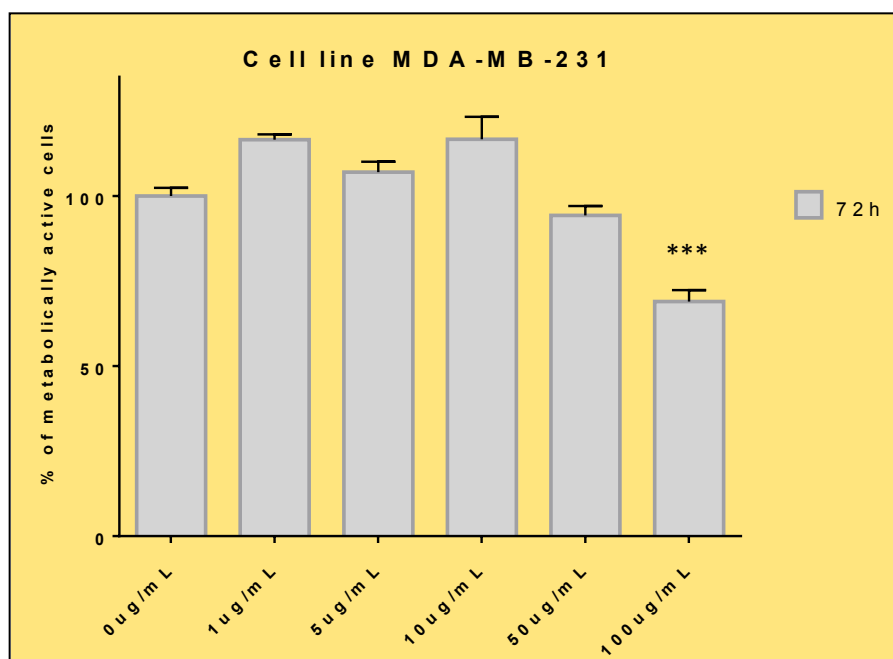


Slika 23. Citotoksičnost *Sisymbrium orientale*, Clevenger hidrodestilacija nakon 72h na staničnu liniju MDA-MB-231 (**P<0.01; ***P<0.001)

Uzorak dobiven Clevenger hidrodestilacijom biljke *Sisymbrium orientale* pokazuje citotoksični učinak nakon 72h, počevši od koncentracije 10 µg/ml, pri kojoj se broj metabolički aktivnih stanica smanjuje na 74% (P<0.01). Povećanjem koncentracije povećava se i citotoksični učinak pa pri koncentraciji od 100 µg/ml ostaje 60% metabolički aktivnih stanica (P<0.001).

Analizama nakon 4h, 24h, 48h nije primijećeno značajno citotoksično djelovanje.

4.2.7. IZOPROPIL IZOTIOCIJANAT



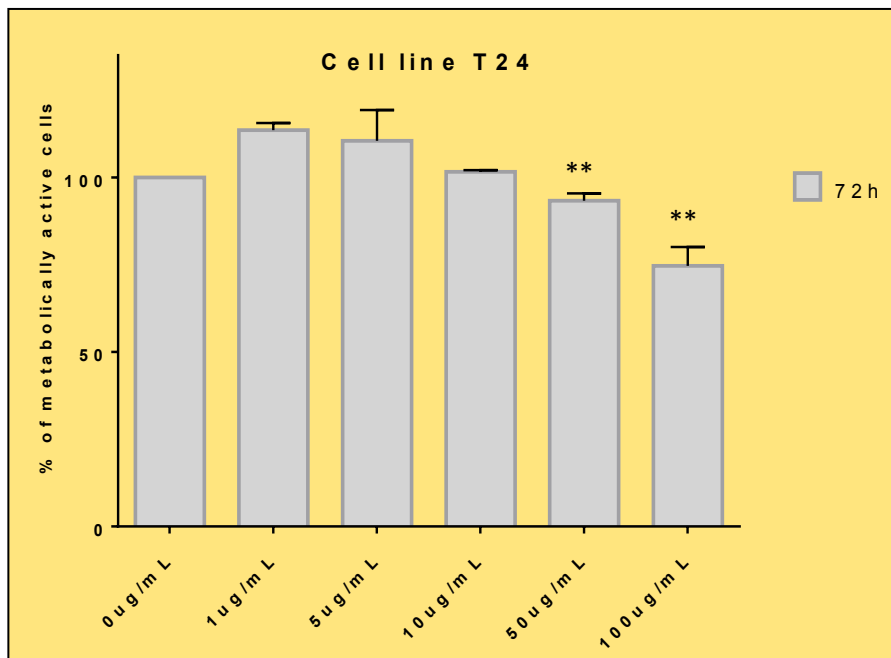
Slika 24. Citotoksičnost izopropil izotiocijanata nakon 72h na staničnu liniju MDA-MB-231
(***P<0.001)

Izopropil izotiocijanat ostvaruje učinak nakon inkubacije od 72h pri koncentraciji od 100 µg/mL, pri kojoj se broj metabolički aktivnih stanica smanjuje na 68% (P<0.001).

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

4.3. KARCINOM MOKRAČNOG MJEHURA - STANIČNA LINIJA T24

4.3.1. *SISYMBRIUM ORIENTALE*, AUTOLIZA KOMUŠČICE

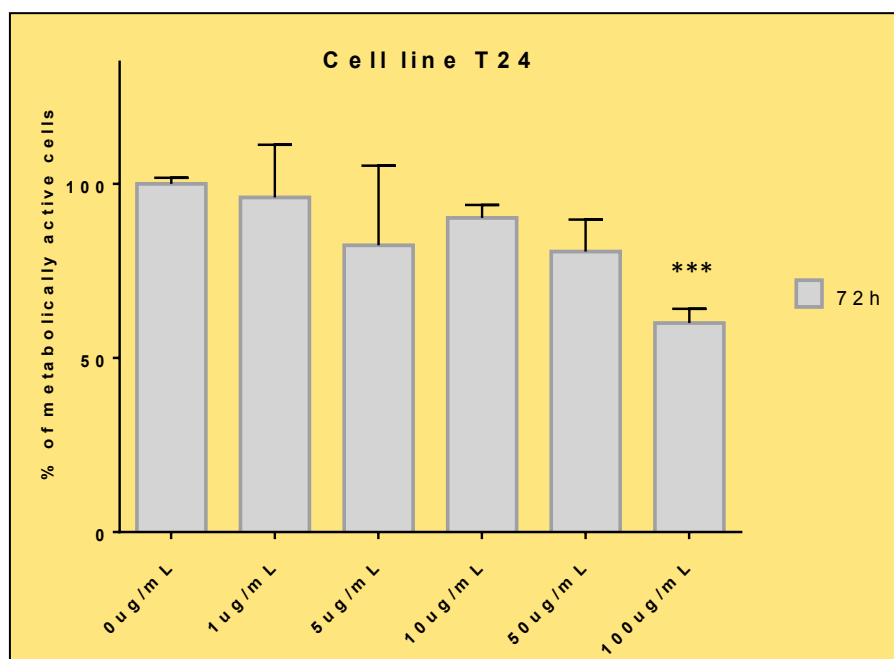


Slika 25. Citotoksičnost *Sisymbrium orientale*, autoliza komuščice nakon 72h na staničnu liniju T24 (**P<0.01)

Uzorak dobiven autolizom komuščice biljke *Sisymbrium orientale* pokazuje slab citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h, počevši od koncentracije 50 µg/ml, pri kojoj se broj metabolički aktivnih stanica smanjuje na 93% (P<0.01). Tretiranje stanica koncentracijom od 100 µg/ml smanjuje broj metabolički aktivnih stanica na 74% (P<0.01).

Analizama nakon 4h, 24h, 48h nije primijećeno značajno citotoksično djelovanje.

4.3.2. IZOPROPIL IZOTIOCIJANAT



Slika 26. Citotoksičnost izopropil izotiocijanata nakon 72h na staničnu liniju MDA-MB-231

Izopropil izotiocijanat pokazuje citotoksični učinak nakon inkubacije od 72h pri koncentraciji 5 µg/mL, pri kojoj se broj metabolički aktivnih stanica smanjuje na 82%, ali s velikom standardnom devijacijom pa nije statistički značajno. Maksimalan citotoksični učinak izopropil izotiocijanata ostvaruje se pri koncentraciji 100 µg/mL, pri kojoj se broj metabolički aktivnih stanica smanjuje na 60% ($P < 0.001$).

Tretiranje stanica tijekom 4h, 24h, 48h nije pokazalo citotoksični učinak.

5. RASPRAVA

Rak je velika skupina bolesti, a može započeti u gotovo svakom organu ili tkivu tijela kada se stanice počnu abnormalno dijeliti i nekontrolirano rasti, prelaziti uobičajene granice i napadati susjedne dijelove tijela i/ili širiti se na druge organe. Ako dođe do širenja na okolne organe, taj se proces naziva metastaziranjem i glavni je uzrok smrti od raka. Rak je drugi vodeći uzrok smrti na globalnoj razini, a procjenjuje se da je bilo 9,6 milijuna smrtnih slučajeva ili jedan od šest smrtnih slučajeva u 2018. godini. Rak pluća, prostate, debelog crijeva, želuca i jetre najčešći su tipovi raka kod muškaraca, dok su među ženama najčešći karcinom dojke, kolorektalni, plućni, cervikalni te karcinom štitnjače. Porast incidencije karcinoma predstavlja veliki problem na globalnoj razini, vršeći ogroman fizički, emocionalni i financijski pritisak na pojedince, obitelji, zajednice i zdravstvene sustave. Velik broj pacijenata s rakom na globalnoj razini nema pristup pravovremenoj kvalitetnoj dijagnozi i liječenju jer su mnogi zdravstveni sustavi u zemljama s niskim i srednjim prihodima najmanje spremni na velika izdavanja za oboljele. U zemljama u kojima su zdravstveni sustavi dobro razvijeni, stope preživljavanja za mnoge vrste karcinoma poboljšavaju se zahvaljujući mjerama prevencije, dostupnom ranom otkrivanju te kvalitetnom liječenju i skrbi za oboljele. Konzumacija alkohola i duhana, nezdrava prehrana i tjelesna neaktivnost glavni su čimbenici rizika od raka u svijetu. Faktori rizika za rak od velike važnosti u zemljama s niskim i srednjim prihodima su i neke kronične infekcije poput *Helicobacter pylori* te virusi poput humanog papiloma virusa (HPV), virusa hepatitisa B, virusa hepatitisa C i virus Epstein-Barr. (38)

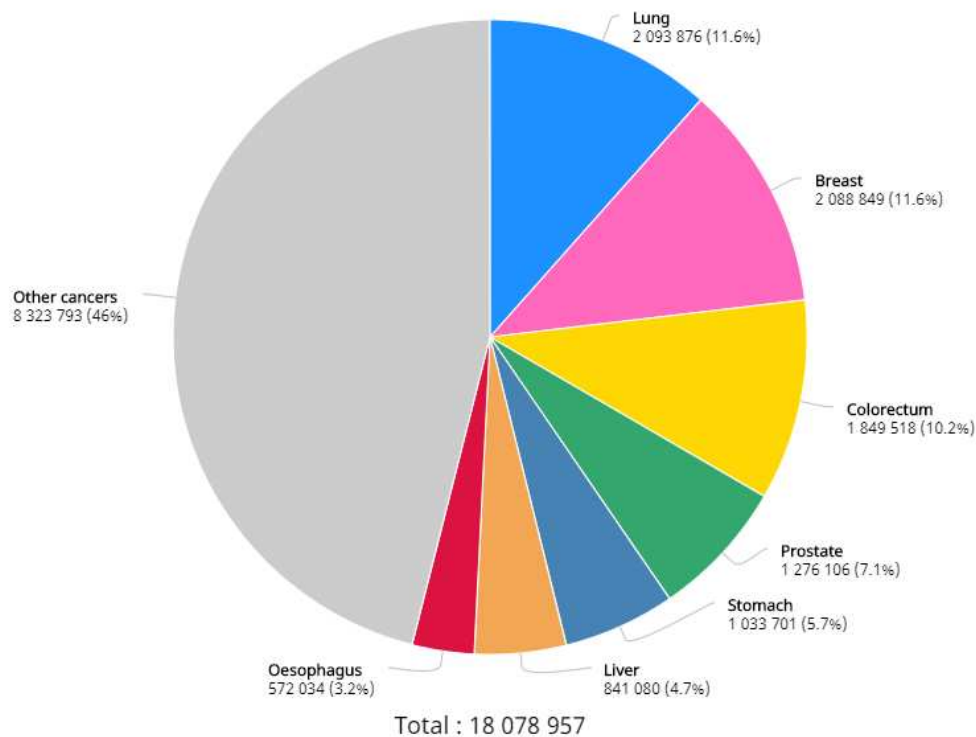
Unatoč napretku u našem razumijevanju rizika, razvoja, imunološke kontrole i mogućnosti liječenja raka pluća, on i dalje ostaje vodeći uzrok smrti od raka. Pušenje duhana i dalje je glavni čimbenik rizika za razvoj raka pluća. Budući da duhan ostaje vodeći čimbenik rizika za rak pluća, prevencija bolesti usredotočena je na izbjegavanje duhanskog dima i prestanak pušenja. Ostale mjere prevencije uključuju odabir zdrave prehrane i održavanje tjelesno aktivnog načina života. U istraživanju za 2018. procijenjeno je da je bilo 2,09 milijuna novih slučajeva (11,6% od ukupnog broja oboljelih od raka) i 1,76 milijuna smrtnih slučajeva (18,4% od ukupne smrtnosti od raka). (8)

Analiza uzroka koji su posljednjih nekoliko desetljeća doveli do promjene incidencije u učestalosti i smrtnosti od raka dojke daje važna otkrića o ulozi probira dojke, redovitoj primjeni pomoćnih terapija i promjeni čimbenika rizika. (39)

Rak dojke, najčešći je rak kod žena sa skoro milijun i 400 tisuća novih slučajeva širom svijeta i gotovo 460 tisuća povezanih smrtnih slučajeva. Stopa incidencije veća je u razvijenijim zemljama u odnosu na manje razvijene zemlje. (17)

Rak mokraćnog mjehura postao je vrlo čest rak u svijetu sa 430 tisuća novih slučajeva dijagnosticiranih u 2012. te se nalazi na devetom mjestu najčešće dijagnosticiranih karcinoma u svijetu s najvišom stopom incidencije zabilježene kod muškaraca u Južnoj i Zapadnoj Europi i Sjevernoj Americi. Stope incidencije konstantno su niže u žena nego u muškaraca, iako su razlike u spolovima uvelike varirale među zemljama. (40)

Pušenje cigareta, profesionalno izlaganje, izlaganje arsenu, infekcija bakterijom *Schistosoma haematobium* i neki lijekovi najvažniji su čimbenici rizika povezani s razvojem bolesti. (24)



Slika 27. Procijenjeni broj slučajeva raka u svijetu za oba spola iz 2018.g.

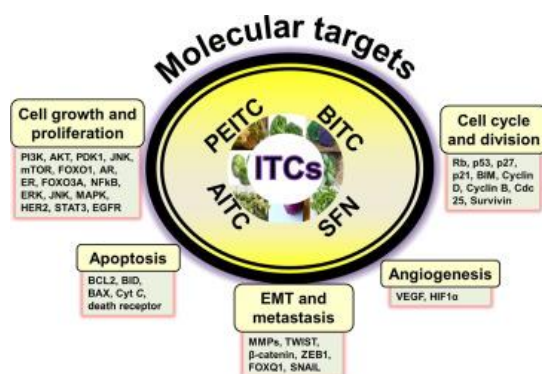
Preuzeto sa: <https://gco.iarc.fr/today/home> Datum pristupa: 15.10.2020.

Sisymbrium je rod biljaka iz porodice *Brassicaceae* ili krstašica. To su jednogodišnje ili višegodišnje biljke koje se prvenstveno nalaze u umjerenom pojasu sjeverne polutke, Južne Amerike (Andi) i južne Afrike. Postoji oko 90 vrsta koje se mogu naći uz stjenovite padine i u stepama te kao korov na poljima, vrtovima, u vrtovima i uz ceste. (41)

Sisymbrium officinale (L.) ili hrvatskim nazivom ljekoviti oranž ili strižuša je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka iz porodice *Brassicaceae*. Ljekoviti oranž poznati je ekspektorans, a svoju primjenu nalazi kod promuklosti, kašlja, astme i ulceracija grla, a smatra se i da djeluje kao diuretik u mokraćnim opstrukcijama. Poznato je da su glavne hlapljive tvari biljaka porodice *Brassicaceae* izotiocijanati i nitrili odgovorni za njihove različite biološke učinke. (31)

Sisymbrium orientale vrsta je cvjetnica iz porodice *Brassicaceae* poznata pod imenom Indijska gorušica. Sjeme se koristi kao ekspektorans, tonik za povišenu temperaturu, a primjenu je našla i u liječenju bronhitisa, dizenterije i vodenih kozica. Neki dijelovi biljke također pokazuju i diuretsko djelovanje. (34)

Blagotvorni učinci porodice *Brassicaceae* na ljudsko zdravlje su povezani s fitokemikalijama. One sprječavaju oksidativni stres, potiču detoksikacijske enzime, stimuliraju imunološki sustav, smanjuju rizik od karcinoma, inhibiraju malignu transformaciju i kancerogene mutacije. Porodica *Brassicaceae* sadrži puno vrijednih metabolita koji su učinkoviti u kemoprevenciji raka, što su već dokumentirale brojne studije te zbog prisutnosti polifenola i sumporno-organskih spojeva djeluje i antimutageno. Glukozinolati su nestabilni spojevi i podvrgavaju se razgradnji u biološki aktivne indole i izotiocijanate pod utjecajem enzima u biljnim tkivima - mirozinaze. Te tvari indukcijom enzimskih sustava I. i II. faze metabolizma ksenobiotika mogu utjecati na eliminaciju ili neutralizaciju kancerogenih i mutagenih čimbenika, a posljedično inhibiraju metilaciju DNA i razvoj raka. (42)



Slika 28. Mehanizmi antitumorskog djelovanja izotiocijanata

Preuzeto sa: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874604715000074>

Datum pristupa: 16.10.2020.

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su ekstrakti, destilati i izolirani spojevi iz biljne vrste *Sisymbrium*, odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na tri stanične linije: A549 (karcinom pluća), MBA-MD-231 (karcinom dojke) i T24 (karcinom mokraćnom mokraćnog mjehura).

Utjecaj na stanice karcinoma pluća (A549) kod većine korištenih uzoraka je nešto značajniji pri većim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica vidljiv je nakon inkubacije od 72h, ali nema značajne razlike u djelovanju uzoraka dobivenih različitim metodama izolacije.

In vitro istraživanje na stanicama karcinoma dojke (MDA-MB-231) pokazalo je da svi uzorci imaju određeni učinak na smanjenje broja metabolički aktivnih stanica, a najznačajniji učinak vidljiv je djelovanjem uzorka dobivenog autolizom komuščice biljke *Sisymbrium orientale* pri koncentraciji od 100 µg/mL, gdje se nakon inkubacije od 72h broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 38%.

Utjecaj na stanice karcinoma mokraćnog mjehura (T24) vidljiv je djelovanjem uzoraka dobivenog autolizom komuščice, a najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica vidljiv je nakon inkubacije od 72 h pri koncentraciji 100 µg/mL.

Na temelju navedenih rezultata, vidljivo je da biljna vrsta *Sisymbrium* spp. ima potencijal za liječenje različitih bolesti, a posebno je važno istaknuti kemoprotektivna i antitumorska svojstva koja smo u našem *in vitro* ispitivanju pokazali na stanicama karcinoma pluća, dojke i

mokraćnog mjehura. Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica, tj. citotoksični učinak ovisi o njihovoj koncentraciji i vremenu izlaganja. Ispitivani uzorci iz *Sisymbrium* spp. najveći citotoksični učinak pokazuju na stanicama karcinoma dojke (MDA-MB-231) nakon 72h inkubacije.

6. ZAKLJUČAK

- 1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma pluća (A459), karcinoma dojke (MDA-MB-231) i karcinoma mokraćnog mjehura (T24) uzorcima iz biljnih vrsta *Sisymbrium officinale* (L.) i *Sisymbrium orientale* te izopropil izotiocijanatu dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.
- 2) Ispitivani uzorci pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji.
- 3) Djelovanje uzoraka nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica.
- 4) Ispitivani uzorci iz *Sisymbrium* spp. najveći citotoksični učinak pokazuju na stanicama karcinoma dojke (MDA-MB-231) nakon 72h inkubacije. Najbolji učinak ima uzorak *Sisymbrium orientale* dobiven autolizom komuščice.
- 5) Izopropil izotiocijanat ima slabi citotoksični učinak na stanične linije karcinoma dojke (MDA-MB-231) i karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i to samo pri najvećoj koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

7. LITERATURA

1. Cooper, Geoffrey M., Hausman, Robert E. Rak. In: Lauc G, editor. Stanica: molekularni pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. pp. 631-632.
2. García-Castillo V, Sanhueza E, McNerney E, Onate SA, García A. Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *J Med Microbiol.* 2016 Dec;65(12):1347-62.
3. Cree IA. Cancer biology. *Methods Mol Biol.* 2011;731:1-11.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
5. Torry DS, Cooper GM. Proto-oncogenes in development and cancer. *Am J Reprod Immunol.* 1991 Apr;25(3):129-32
6. Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res.* 1988 May;195(3):255-71.
7. Yarbrow JW. Oncogenes and cancer suppressor genes. *Semin Oncol Nurs.* 1992 Feb;8(1):30-9.
8. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* 2020 03;41(1):1-24.
9. Siroglavić KJ, Polić Vižintin M, Tripković I, Škerija M, Kukulj S. Trends in incidence of lung cancer in Croatia from 2001 to 2013: gender and regional differences. *Croat Med J.* 2017 Oct 31;58(5):358-63.
10. <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/> Datum pristupa: 05.10.2020.
11. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016 07;25(3):447-68.
12. Latimer KM, Mott TF. Lung cancer: diagnosis, treatment principles, and screening. *Am Fam Physician.* 2015 Feb 15;91(4):250-6.
13. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician.* 2007 Jan 1;75(1):56-63.

14. Rami-Porta R, Call S, Doooms C, Obiols C, Sánchez M, Travis WD, et al. Lung cancer staging: a concise update. *Eur Respir J*. 2018 05;51(5):1800190.
15. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-prirucnik/pulmologija/tumori-pluca/karcinom-pluca> Datum pristupa: 05.10.2020.
16. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Dec;1856(2):189-210.
17. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Jun;72(2):333-8.
18. Coughlin SS. Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:9-29.
19. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they. *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):192-208.
20. 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 06;48:140-6.
21. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(17):3628-36.
22. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. *Klinička onkologija*. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 203-13.
23. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-prirucnik/ginekologija/bolesti-dojke/rak-dojke> Datum pristupa: 12.10.2020.
24. Malats N, Real FX. Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Apr;29(2):177-89, vii.
25. Compérat E, Varinot J, Moroch J, Eymerit-Morin C, Brimo F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol*. 2018 03;15(3):143-54.

26. https://lijecnicki-vjesnik.hlz.hr/pdf/5-6-2018/01_ljubic.pdf Datum pristupa: 13.10.2020.
27. Farling KB. Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management. *Nurse Pract.* 2017 03 7;42(3):26-33.
28. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/genitourinarne-bolesti/rak-spolnog-i-mokracnog-sustava/rak-mokracnog-mjehura> Datum pristupa: 13.10.2020.
29. Pham A, Ballas LK. Trimodality therapy for bladder cancer: modern management and future directions. *Curr Opin Urol.* 2019 05;29(3):210-5.
30. <https://www.britannica.com/plant/rocket-plant-Sisymbrium-genus> Datum pristupa: 13.10.2020.
31. Blazević I, Radonić A, Mastelić J, Zekić M, Skocibusić M, Maravić A. Hedge mustard (*Sisymbrium officinale*): chemical diversity of volatiles and their antimicrobial activity. *Chem Biodivers.* 2010 Aug;7(8):2023-34.
32. Zorzan M, Zucca P, Collazuol D, Peddio S, Rescigno A, Pezzani R. *Sisymbrium officinale*, the Plant of Singers: A Review of Its Properties and Uses. *Planta Med.* 2020 Mar;86(5):307-11.
33. Di Sotto A, Di Giacomo S, Toniolo C, Nicoletti M, Mazzanti G. *Sisymbrium Officinale* (L.) Scop. and its Polyphenolic Fractions Inhibit the Mutagenicity of Tert-Butylhydroperoxide in *Escherichia Coli* WP2uvrAR Strain. *Phytother Res.* 2016 May;30(5):829-34.
34. Rahman M, Khatun A, Liu L, Barkla BJ. Brassicaceae Mustards: Traditional and Agronomic Uses in Australia and New Zealand. *Molecules.* 2018 Jan 21;23(1):E231.
35. Brzović P. Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama *Lepidium* spp. (Brassicaceae) i *Moringa oleifera* (Moringaceae) : diplomski rad [Diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017 Datum pristupa: 08.10.2020.
36. Nowicki D, Rodzik O, Herman-Antosiewicz A, Szalewska-Pałasz A. Isothiocyanates as effective agents against enterohemorrhagic *Escherichia coli*: insight to the mode of action. *Sci Rep.* 2016 Feb 29;6:22263.

37. Dehshahri S, Afsharypuor S, Asghari G, Mohagheghzadeh A. Determination of volatile glucosinolate degradation products in seed coat, stem and in vitro cultures of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. *Res Pharm Sci*. 2012 Jan;7(1):51-6.
38. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 Datum pristupa: 15.10.2020.
39. 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):368-79.
40. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. 2017 01;71(1):96-108.
41. <https://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Sisymbrium> Datum pristupa: 16.10.2020.
42. 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.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj je istraživanja ispitati potencijalno citotoksično djelovanje izotiocijanata, spojeva izoliranih iz biljne vrste *Sisymbrium* spp., na humane karcinomske stanice pluća (A549), dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24). Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica nakon izlaganja uzorcima smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

Materijali i metode:

Ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama karcinoma pluća, dojke i mokraćnog mjehura rađeno je MTT testom. Usporedbom apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih uzorcima dobivenih iz *Sisymbrium* spp. te izopropil izotiocijanata i apsorbancije kod netretiranih stanica (kontrola), dobili smo postotak preživljenja karcinomskih stanica. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije.

Rezultati:

Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica.

Kod stanica karcinoma pluća, svi uzorci ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica vidljiv je nakon 72h inkubacije, ali nema statistički značajne razlike u djelovanju uzoraka dobivanih različitim metodama izolacije.

Kod stanica karcinoma dojke, većina uzoraka te izopropil izotiocijanat najjači citotoksični učinak imaju pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Najznačajniji učinak vidljiv je djelovanjem spojeva dobivenih autolizom komuščice biljke *Sisymbrium orientale* pri koncentraciji od 100 µg/mL, gdje se nakon 72h broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 38%.

Kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura, uzorak dobiven autolizom komuščice biljke *Sisymbrium orientale* pokazuje najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica nakon 72h inkubacije pri koncentraciji 100 µg/mL.

Zaključci:

In vitro izlaganje stanica karcinoma pluća (A549), dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) uzorcima dobivenih iz *Sisymbrium* spp. te izopropil izotiocijanatu dovodi do

smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak ovisan je o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Ispitivani uzorci iz *Sisymbrium* spp. najveći citotoksični učinak pokazuju na MDA-MB-231 stanicama nakon 72h inkubacije. Najbolji učinak ima uzorak *Sisymbrium orientale* dobiven autolizom komuščice. Izopropil izotiocijanat ima slabi citotoksični učinak na MDA-MB-231 stanice i T24 stanice i to samo pri najvećoj koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

9. SUMMARY

The aim of the research:

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of isothiocyanates, a chemical substance isolated from the *Sisymbrium* spp. family of plants on human carcinoma cells of lung (A549), breast (MDA-MB-231) and bladder (T24). The assumption is that number of carcinoma cells after the exposure to isothiocyanates will be reduced in comparison to the control group.

Materials and methods:

MTT assay was used to establish cytotoxicity levels on lung, breast and bladder cancer cell lines. The comparison between the absorbance of created formazan in cells treated with samples obtained from *Sisymbrium* spp. and isopropyl isothiocyanates and those untreated (the control group) established the survival rates of carcinoma cells. Cytotoxicity levels were established after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours of incubation.

Results:

The results are graphically presented in relation to incubation times and the percentages of metabolically active cells.

In lung carcinoma cells, all samples obtained from *Sisymbrium officinale* (L.) show better cytotoxic effect in concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL. The most significant effect on the reduction of metabolically active cells is visible after 72 hours of incubation, but there is no significant difference in the effect of samples obtained by different isolation methods.

In breast carcinoma cells, most samples obtained from *Sisymbrium* spp. and isopropyl isothiocyanates have the strongest effect in concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL. The most significant effect is noticed after 72h treatment with *Sisymbrium orientale* compound obtained by silique autolysis at a concentration of 100 µg/mL, which decreased the number of metabolically active cells to 38%.

In bladder cancer cells, sample obtained by silique autolysis from *Sisymbrium orientale* show the most significant effect on the reduction of metabolically active cells after 72 h of incubation at a concentration of 100 µg / mL.

Conclusions:

In vitro exposure of lung carcinoma cells (A549), breast (MDA-MB-231) and bladder (T24) to isothiocyanates leads to reduced cell survival rate. Cytotoxic effects depend on incubation time and concentration. Cytotoxic effect is not always proportional to the increase in concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurs. Samples from *Sisymbrium* spp. show the most significant cytotoxic effect on MDA-MB-231 cells () after 72h incubation. The *Sisymbrium orientale* sample obtained by autolysis of the silique has the most significant cytotoxic effect. Isopropyl isothiocyanate has a weak cytotoxic effect on MDA-MB-231 and T24 cells only after 72 h of incubation when maximum concentration of 100 µg / mL is used.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Mirta Grgat

Datum rođenja: 25.11.1996.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Jelašce 60, 21238 Otok Dalmatinski

e-mail: mirta.grg01@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- **2003. – 2011.** Osnovna škola „Kamešnica”, Otok Dalmatinski, Republika Hrvatska
- **2011. – 2015.** „Franjevačka klasična gimnazija“ Sinj, Republika Hrvatska
- **2015. - 2020.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

RADNO ISKUSTVO:

01.09.2019. - 20.09.2019. – Farmacia Aguiar, Lisabon, Portugal

III. 2020. – IX. 2020. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Lučac

CPSA Split (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski jezik, njemački jezik

Vozačka dozvola: B kategorija