

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Bruna Perkov-Stipičin**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE RAŠTIKE NA STANIČNE LINIJE HUMANIH  
KARCINOMA MJERENO MTT METODOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Bruna Perkov-Stipičin**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE RAŠTIKE NA STANIČNE LINIJE HUMANIH  
KARCINOMA MJERENO MTT METODOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Medicinska kemija i biokemija  
**Tema rada** je odobrena na 70. sjednici Vijeća studija Farmacije, 8. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 5. sjednici Vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

**Citotoksično djelovanje raštike na stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom**  
Bruna Perkov-Stipičin, broj indeksa 208

### Sažetak:

Cilj istraživanja je bio ispitati potencijalno citotoksično djelovanje raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) na humane stanice karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24). Obje stanične linije tretirane su ekstraktima lista, stabljike i korijena raštike u koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih ispitivanim uzorcima te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih ekstrakata. Najjači citotoksični učinak na stanične linije T24 i MDA-MB-231 imao je ekstrakt korijena u koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72h inkubacije. Ispitivani uzorci pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Njihovo djelovanje nije uvijek proporcionalno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do povećanja broja metabolički aktivnih stanica. Potencijalan citotoksičan učinak raštike na stanične linije humanih karcinoma, ujedno i hipoteza ovog istraživanja, je potvrđen. Potrebna su daljnja *in vivo* ispitivanja kako bi se potvrdilo djelovanje i na životinjskim modelima.

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

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

**Rad sadrži:** 54 stranica, 22 slike, 3 tablice, 51 referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

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

**Datum obrane:** 26.10.2021.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

University of Split School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Medical Chemistry and Biochemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 70 as well as by Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 8 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 5

**Mentor:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD  
**Technical assistance:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

**The cytotoxic effect of *Brassica oleracea* var. *acephala* on human cancer cell lines measured by MTT method**

Bruna Perkov-Stipičin, index number 208

### Summary:

The aim of the study was to examine the potential cytotoxic effects of *Brassica oleracea* var. *acephala* on human breast cancer cells (MDA-MB-231) and bladder (T24). Both cell lines were treated with leaf, stem and root extracts at 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 MTT method. The ratio of the absorbance of cells treated with the tested samples and the absorbance of those not treated is an indicator of the cytotoxic activity of the used extracts. The strongest cytotoxic effect on T24 and MDA-MB-231 cell lines had root extract at the concentration of 50 µg/mL after 72 h of incubation. The tested samples showed a cytotoxic effect depended on incubation time and concentration. Their activity is not always proportional to the increase in concentration and incubation time, so in some cases after a certain time there is an increase in the number of metabolically active cells. The potential cytotoxic effect of collard greens on human cancer cell lines, as well as the hypothesis of this study, has been confirmed. Further *in vivo* studies are needed to confirm the effects in animal models as well.

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:** collard greens, cancer, cytotoxicity, MTT assay

**Thesis contains:** 54 pages, 22 figures, 3 tables, 51 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Maja Valić, PhD, full prof., member
2. Marina Degoricija, PhD, assist. prof., member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member - supervisor

**Defence date:** 26.10.2021.

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

# SADRŽAJ

## 1. UVOD

<b>1.1. KARCINOM</b> .....	1
<b>1.2. MOLEKULARNA PATOLOGIJA TUMORA</b> .....	2
<b>1.3. KARCINOM DOJKE</b> .....	5
1.3.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA.....	5
1.3.2. KLINIČKA SLIKA.....	6
1.3.3. KLASIFIKACIJA I PATOHISTOLOGIJA.....	6
1.3.4. PROGNOСТИČKI I PREDIKTIVNI ČIMBENICI.....	7
1.3.5. LIJEČENJE.....	7
<b>1.4. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA</b> .....	9
1.4.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA.....	9
1.4.2. KLINIČKA SLIKA.....	9
1.4.3. KLASIFIKACIJA I PATOHISTOLOGIJA.....	9
1.4.4. PROGNOСТИČKI I PREDIKTIVNI ČIMBENICI.....	11
1.4.5. LIJEČENJE.....	11
<b>1.5. KUPUSNJAČE</b> .....	12
1.5.1. LJEKOVITOST.....	12
<b>1.6. RAŠTIKA (<i>Brassica oleracea var. acephala</i>)</b> .....	12
1.6.1. KARAKTERISTIKE.....	12
1.6.2. KLIMA I STANIŠTE.....	13
1.6.3. LJEKOVITOST I UPOTREBA.....	13
<b>1.7. GLUKOZINOLATI</b> .....	14
<b>1.8. IZOTIOCIJANATI</b> .....	15
<b>1.9. FENOLNI SPOJEVI</b> .....	17
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1. STANIČNE LINIJE</b> .....	22
3.1.1. MDA-MB-231.....	22
3.1.2. T24.....	23
<b>3.2. METODE IZOLACIJE</b> .....	24
3.2.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA.....	24

<b>3.3. POSTUPAK</b> .....	26
<b>3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA)</b> .....	27
<b>3.5. STATISTIČKA ANALIZA</b> .....	28
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1. STANIČNA LINIJA T24</b> .....	30
4.1.1. EKSTRAKT LISTA RAŠTIKE .....	30
4.1.2. EKSTRAKT STABLJIKE RAŠTIKE.....	31
4.1.3. EKSTRAKT KORIJENA RAŠTIKE .....	32
<b>4.2. STANIČNA LINIJA MDA-MB-231</b> .....	33
4.2.1. EKSTRAKT LISTA RAŠTIKE .....	33
4.2.2. EKSTRAKT STABLJIKE RAŠTIKE.....	34
4.2.3. EKSTRAKT KORIJENA RAŠTIKE .....	35
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>36</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>42</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>44</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>49</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>52</b>

## **ZAHVALA**

*Obitelji i dugogodišnjim prijateljima na podršci tijekom studiranja.*

*Mentorici, prof. Vedrani Čikeš-Čulić, na ukazanoj pomoći u izradi diplomskog rada te pruženoj prilici za provođenje ovog istraživanja.*

## **1. UVOD**

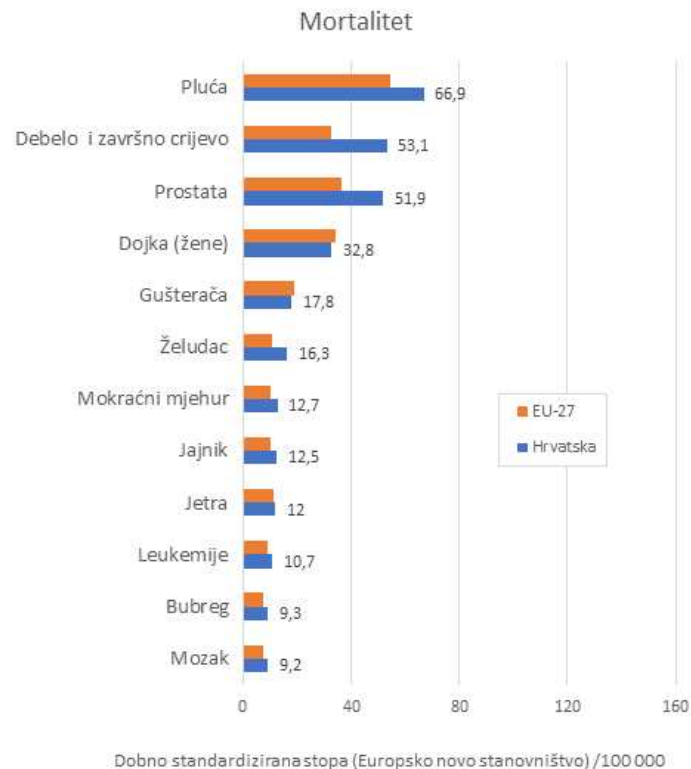


## 1.1. KARCINOM

Tumori (lat. *tumor*-oteklina), neoplazme ili novotvorine su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Obilježja rasta novotvorina su: nesvrhovitost, autonomnost (neovisnost o fiziološkim kontrolnim mehanizmima), parazitarnost, nepravilnost i neorganiziranost. Govoreći o kliničkoj klasifikaciji tumora, svrstavamo ih u dvije skupine: dobroćudni (benigni) i zloćudni (maligni) tumori. Dobroćudni tumori rastu ekspanzivno, polagano te ograničeno na organ u kojem su nastali. Za razliku od benignog, maligni tumori rastu mnogo brže. Rast im je infiltrativan što znači da razara normalno tkivo organa u kojem su nastali te se krvlju ili limfom šire u druge dijelove tijela, odnosno metastaziraju (grč. *metastasis* - promjena mjesta). Mogu biti opasni po život izazivajući sistemske simptome, kao što su opća slabost, gubitak tjelesne mase te smrt (1).

Neke od glavnih karakteristika maligne transformacije su stalni poticaj na staničnu proliferaciju, izbjegavanje usporavanja proliferacije, izbjegavanje apoptoze, gubitak ograničenja proliferacije, razvoj novog krvotoka (neoangiogeneza), invazija, metastaziranje i kolonizacija udaljenih organa (2).

Najčešći uzroci smrti su rak pluća (20,4%), a zatim rak debelog i završnog crijeva (12,4%), dojke (7,3%) i rak gušterače (7,1%) (Slika 1). Hrvatska je, u usporedbi s drugim državama, po ukupnoj incidenciji raka na razini prosjeka EU-27, dok je po smrtnosti od raka na petom mjestu (iza Slovačke, Poljske, Cipra i Mađarske) (3).



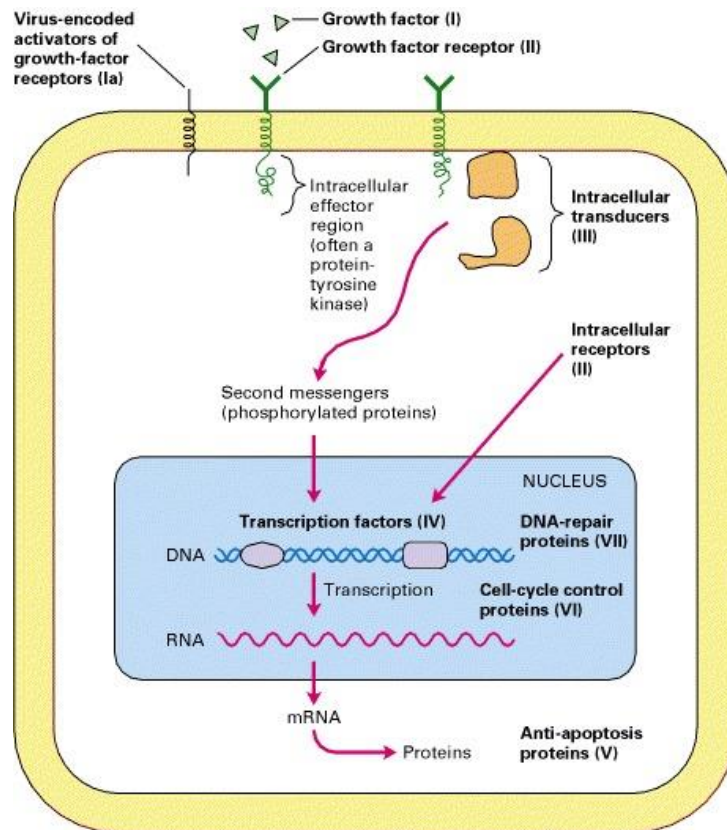
**Slika 1.** Mortalitet od raka u Hrvatskoj i EU u 2020. godini

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

## 1.2. MOLEKULARNA PATOLOGIJA TUMORA

Genske promjene su povezane s malignom transformacijom stanica. Razlikujemo četiri glavne skupine gena: onkogeni, tumorsupresorski geni, geni koji sudjeluju u apoptozi te geni koji sudjeluju u popravku DNA (Slika 2). Onkogeni, odnosno mutacije normalnih staničnih gena nazvani protoonkogenima, odgovorni su za autonomni rast neoplastičnih stanica koje rastu i bez egzogenih čimbenika rasta. Neki od najvažnijih procesa koji dovode do funkcionalnih onkogenata su točkasta mutacija, odnosno mutacija RAS gena kao najčešća u

humanoj patologiji, prekomjerno izražavanje kao posljedica amplifikacije normalnih protoonkogeni koji proizvode mnogo više proteina, kao na primjer N-MYC geni u neorblastomu, translokacija (npr. ABL gena u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji) te insercija virusnog gena (kronični virusni hepatitis B). Tumorsupresorski geni imaju suprotnu ulogu. Oni zaustavljaju rast novotvorina. Njihov gubitak očituje se kao gubitak heterozigotnosti. RB-1 je prvi identificirani tumorsupresorski gen otkriven u studiji retinoblastoma. Njegova delecija i mutacija dovode do raznih karcinoma (oka, pluća, kostiju). Drugi gen, TP53, je najvažniji tumorsupresorski gen i njegova mutacija dovodi do većine ljudskih karcinoma (60%). Njegov protein ima ključnu ulogu u regulaciji mitotičkog ciklusa, kao što je kontrola prelaska iz G1 u S fazu i popravak oštećene DNA, odnosno aktivira CDK (*cyclin-dependent kinase*) inhibitor koji koči mitozu i omogućava popravak defektne DNA. U stanicama s mutiranim ili oštećenim TP53 genom izostaje kontrola prelaska iz G1 u S fazu pa tako one prolaze u S fazu i podijele se, postanu neoplastične i nastave se nekontrolirano dijeliti. Mutacija gena koji sudjeluju u apoptozi dovodi do njene poremećene regulacije te kao posljedica nastaju tumori koji, za razliku od prethodno opisanih tumora, ne pokazuju pojačanu mitotičku aktivnost. Ključnu ulogu u samom procesu imaju kaspaze, proapoptotični (BAX, BAK) i antiapoptotični (BCL2, BCLXL) proteini te BH-3 proteini (BAD, BID, PUMA). Bitna je uloga i gena za enzime koji sudjeluju u popravku DNA, a nazivaju se DNA popravljajući enzimi. Oni održavaju integritet genskog sustava stanice, a mutacija njihovih gena dovodi do neoplastične pretvorbe stanica s oštećenom DNA (4).



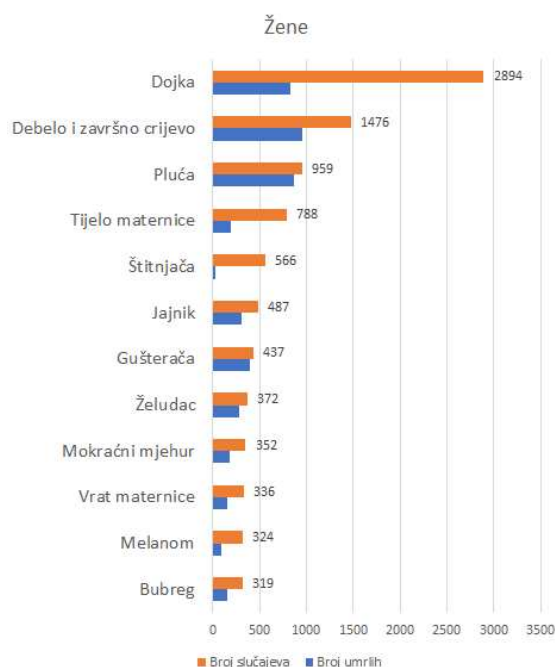
**Slika 2.** Sedam tipova proteina koji sudjeluju u procesu staničnog rasta: virusni aktivatori receptora čimbenika rasta (Ia), čimbenik rasta (I), receptor čimbenika rasta (II), stanični prijenosnici (III), stanični receptori (II), transkripcijski čimbenici (IV), DNA popravljajući enzimi (VII), proteini koji kontroliraju stanični ciklus - tumorsupresorski proteini (VI), antiapoptični proteini (V)

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

## 1.3. KARCINOM DOJKE

### 1.3.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA

Karcinom dojke je najzastupljenija maligna bolest žena te najčešći maligni uzrok smrti u više od 90% zemalja (Slika 3) (5). 2020. je u svijetu zabilježeno 2,3 milijuna slučajeva karcinoma dojke te 685000 smrti kod žena. Također, krajem 2020. postojalo je 7,8 milijuna žena s dijagnosticiranom bolešću zadnjih pet godina. Bolest zahvaća žene u bilo kojoj dobi nakon puberteta te se češće pojavljuje u starijoj populaciji (6). Složene je etiologije. Čimbenici rizika su povezani sa stilom života, reproduktivnim ponašanjem te endokrinim i genetičkim čimbenicima. Uvelike ovisi o hormonu estrogenu pa je tako povećan rizik u žena s ranijom menarhom, kasnijom menopauzom, žena koje nisu rodile te kod hormonske terapije (kombinirana i oralni kontraceptivi). U nekim slučajevima odgovorni su genetski čimbenici kod kojih bitnu ulogu imaju 2 visokorizična gena - BRCA1 i BRCA2. Mutacija tih gena dovodi do većeg rizika od obolijevanja od raka dojke i jajnika, ali čine samo 5% od ukupnog broja oboljelih (7).



Slika 3. Najčešća sijela raka kod žena u Hrvatskoj 2020. godine

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

### 1.3.2. KLINIČKA SLIKA

Najčešći simptom je pojava kvržice na dojci. Takva kvržica može biti bezbolna i tvrda, ali moguća je pojava i bolne i mekane, okrugle s nepravilnim rubovima. Ostali karakteristični simptomi mogu biti oticanje dojke, umotavanje kože, bolovi u dojkama i bradavicama, uvlačenje bradavice, crvena, suha ili zadebljala koža bradavice ili dojke, iscjedak iz bradavica te otečeni limfni čvorovi (8). Važnost ranog otkrivanja i dijagnostike karcinoma dokazuje podatak o povećanju stope preživljenja koje je započelo 80-ih u državama s programima rane detekcije u kombinaciji s različitim metodama liječenja. Također, samo liječenje može biti vrlo učinkovito sa šansom preživljenja više od 90% kada se bolest otkrije rano (6).

### 1.3.3. KLASIFIKACIJA I PATOHISTOLOGIJA

Razlikujemo benigne i maligne tumore dojke, a mogu nastati iz epitela ili strome. Epitelni nastaju proliferacijom epitela terminalnih kanalića ili duktulo-lobularnih jedinica te su najučestaliji tip karcinoma te skoro svi spadaju u histološku skupinu adenokarcinoma. Govoreći o invazivnosti, razlikujemo neinvazivne, mikroinvazivne i invazivne oblike. Neinvazivni ili karcinomi *in situ* sadrže održanu bazalnu membranu te su tumorske stanice ograničene na duktuse ili lobule pa se dijele na intraduktalne i intralobularne karcinome. Invazivni, za razliku od neinvazivnog, nemaju održanu bazalnu membranu te nastaju iz epitela terminalnih kanalića dojke na ulasku u lobule. Mikroinvazivni se rijetko dijagnosticira, a nastaje proliferacijom epitelnih stanica s morfološkim izgledom zloćudnih stanica unutar kanalića tkiva dojke koji probijaju bazalnu membranu kanalića i dovode do invazije okolnog tkiva u debljini manjoj od 0,1 cm (9). S obzirom na molekularnu osnovu, postoji nekoliko subtipova: luminalni tip A iz luminalnih stanica kanalića, luminalni tip B istog podrijetla, ali lošije prognoze, trostruko negativni (ER, PR, HER-2) iz bazalnih stanica s najlošijom prognozom te HER-2 pozitivni karcinom dojke (10).

#### 1.3.4. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI ČIMBENICI

Prognoštički čimbenici, koji određuju vjerojatnost izlječenja, su veličina tumora, stupanj zloćudnosti, Ki-67 mitotički indeks, zahvaćenost aksilarnih limfnih čvorova, status hormonskih receptora, dob te HER2 status. Prediktivni čimbenici govore o vjerojatnosti odgovora tumora na određenu terapiju, a obuhvaćaju status hormonskih receptora koji definira vjerojatnost odgovora na hormonsku terapiju te HER2 status, odnosno učinkovitost određene imunoterapije usmjerene na HER2 receptor (11).

#### 1.3.5. LIJEČENJE

##### 1.3.5.1. LOKALNI, PRIMARNO OPERABILAN RAK DOJKE

U slučaju lokalnog raka svrha terapijskog postupka je izlječenje. Liječenje se započinje kirurškim zahvatom pri čemu se uklanja primarni tumor te moguće presadnice u limfnim čvorovima. Zahvat obuhvaća mastektomiju (uklanjanje cijele dojke) ili se radi pošteдна operacija (uklanjanje samo dijela dojke), ovisno o stadiju bolesti. Kod bolesnica sa srednjim i visokim stupnjem recidiva potrebno je uvesti adjuvantnu (zaštitnu) terapiju radi uništavanja mogućih zaostalih mikropresadnica. Adjuvantna radioterapija indicirana je nakon svih pošteđnih zahvata te kod onih s pozitivnim limfnim čvorovima aksile, njome se povećava vjerojatnost izlječenja za 5-7%. Hormonska terapija se primjenjuje kod pozitivnog nalaza hormonskih receptora (estrogenskih ili progesteronskih). Zlatni standard u liječenju premenopauzalnih bolesnica te muškaraca s ranim stadijem karcinoma je primjena selektivnog modulatora estrogenskih receptora (SERM), tamoksifena (20 mg na dan kroz 5-10 godina), pri čemu se rizik smrti smanjuje za 25% (12, 13). Kod postmenopauzalnih bolesnica koriste se inhibitori aromataze (letrozol, anastrozol i egzemestan) kroz 5-10 godina. Sve bolesnice s trostruko negativnim i HER2 pozitivnim tumorima trebaju primiti i adjuvantnu kemoterapiju koja se primjenjuje prva nakon operacije. Obuhvaća 4 trotjedna ciklusa kombinacije doksorubicina i ciklofosfamida praćena s 12 tjednih aplikacija paklitaksela. Ovakav način liječenja smanjuje vjerojatnost smrti za 30%. Adjuvantna imunoterapija trastuzumabom kroz godinu dana indicirana je kod HER2 pozitivnog tumora i onih većih od 0,5 cm te smanjuje vjerojatnost smrti za 40% (14).

### 1.3.5.2. LOKALNI, PRIMARNO NEOPERABILAN RAK DOJKE

Primjenjuje se neoadjuvantna terapija, uglavnom kemoterapija ili rjeđe hormonska terapija, pri čemu se smanjuje veličina primarnog tumora, odnosno prevodi se u operabilno stanje, a uključuje mastektomiju s uklanjanjem regionalnih limfnih čvorova (15).

### 1.3.5.3. METASTATSKA BOLEST

Cilj liječenja metastatskog raka dojke jest osiguranje maksimalno kvalitetnog i dugog života. U liječenju se mogu koristiti svi spomenuti terapijski protokoli ovisno o karakteristikama tumora. Započinje se hormonskom terapijom kod hormonski ovisnog tumora. Lijekovi izbora su SERM (tamoksifen) te LHRH agonisti (leuprolid i goserelin) u premenopauzalnih žena te aromatazni inhibitori, SERM, megestrol-acetat i fulvestrant kod postmenopauzalnih. Pri primjeni kemoterapije, prvenstveno kod trostruko negativnih tumora, prva linija su antraciklini ili taksani. Uobičajena je primjena više linija kemoterapije, a uključuje i neke citostatike (kapecitabin, vinorelbin, gemcitabin, iksabepilon, mitomicin i mitoksantron). U slučaju HER2 pozitivne metastatske bolesti, prvolinijsko liječenje obuhvaća kombinaciju monokemoterapije taksanima i dvaju monoklonalnih protutijela trastuzumaba i pertuzumaba usmjerenih na ekstracelularne domene HER2 receptora blokirajući njegovu aktivnost (16). Radioterapija se primjenjuje uglavnom u slučajevima pritiska na kralježničnu moždinu, presadnica u mozgu i kostima, pojačanog krvarenja te jetrenih bolova (17). Prosječno preživljenje bolesnica s metastatskim rakom dojke je 3 do 5 godina ovisno o tipu tumora (luminalni - 45 mjeseci, HER2 pozitivni - oko 60 mjeseci, trostruko negativni - 24 do 36 mjeseci) (15).



## 1.4. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

### 1.4.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA

Tumori mokraćnog mjehura smatraju se najvažnijim novotvorinama ljudskog tijela. Po učestalosti su na petom mjestu incidencije malignih tumora kod muškaraca, a incidencija je u porastu gotovo svugdje u svijetu, a najviše u Sjevernoj Americi i Europi. Mortalitet je ostao otprilike jednak. Bolest se pojavljuje uglavnom u starijoj dobi (50-80 godina), a najčešći čimbenici rizika su pušenje cigareta, industrijske kemikalije, shistosomijaza te kemoterapija citostaticima (ciklofosamid) (18).

### 1.4.2. KLINIČKA SLIKA

Kod otprilike 80-90% pacijenata prisutna je bezbolna hematurija. Također mogu biti prisutni i iritativni simptomi, poput disurije, urgentnosti ili učestalosti mokrenja, a javlja se kod 20-30% oboljelih. Pacijentima s uznapredovalom bolešću mogu se pojaviti zdjelična i koštana bol, edem donjih ekstremiteta, nastao zbog pritiska na ilijačnu arteriju, te bol u slabinama zbog opstrukcije mokraćne cijevi (19). U rijetkim slučajevima površinskog karcinoma moguće je napipati masu pri fizikalnom pregledu (20).

### 1.4.3. KLASIFIKACIJA I PATOHISTOLOGIJA

Tumori mokraćnog mjehura u 90% slučajeva potječu iz prijelaznog (urotelnog) epitela. Ostali oblici su rak pločastih stanica (3%), adenokarcinom (2%) te rak malih stanica (1%) (21). Za procjenu stadija proširenosti karcinoma koristi se TNM sustav Američkog združenog odbora za rak (American Joint Committee on Cancer, AJCC). T opisuje koliko je primarni tumor narastao te njegovu invazivnost, odnosno prodor u okolna tkiva, N označava širenje tumora u limfne čvorove, a M metastaze (22).

**Tablica 1.** TNM klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto sa [https://www.researchgate.net/figure/TNM-classification-of-urinary-bladder-cancer\\_tbl1\\_336790077](https://www.researchgate.net/figure/TNM-classification-of-urinary-bladder-cancer_tbl1_336790077) Datum pristupa: 07.09.2021.

<b>Primarni tumor (T)</b>
TX primarni tumor se ne može opisati
T0 nema dokaza primarnog tumora
Ta neinvazivni papilarni karcinom
Tis karcinom in situ
T1 tumor invadira subepitelno vezivno tkivo
T2 tumor invadira mišićni sloj
pT2a tumor invadira površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)
pT2b tumor invadira duboki mišićni sloj (vanjska polovica)
T3 tumor invadira perivezikalno tkivo
pT3a mikroskopska invazija perivezikalnoga tkiva
pT3b makroskopska invazija perivezikalnoga tkiva
T4 tumor invadira jedno od navedenoga: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina, stijenka zdjelice, trbušna stijenka
T4a tumor invadira stromu prostate, maternicu, vaginu
T4b tumor invadira stijenku zdjelice, trbušnu stijenku
<b>Regionalni limfni čvorovi (N)</b>
NX limfni čvorovi ne mogu biti određeni
N0 nema zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova
N1 jedan zahvaćeni regionalni limfni čvor u zdjelici
N2 više od jednog zahvaćenog limfnog čvora u zdjelici
N3 metastaze u zajedničkim ilijačnim limfnim čvorovima
<b>Udaljene metastaze (M)</b>
M0 nema udaljenih metastaza
M1a nisu zahvaćeni regionalni limfni čvorovi
M1b ostale udaljene metastaze

#### 1.4.4. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI ČIMBENICI

Tumor mokraćnog mjehura ima najveću učestalost recidiva od svih maligniteta. Genetske promjene koje dovode do tumora događaju se u cijelom urotelijumu čineći cijelu sluznicu urinarnog sustava osjetljivu na recidiv tumora. Neki od faktora rizika za recidiv i progresiju bolesti su ženski spol, veličina tumora, multifokalnost, broj tumora, stadij tumora te prisutnost karcinoma *in situ* (23). Površinski rak prijelaznog epitela je izlječiv, dok kod invazivnih oblika preživljenje iznosi 40-50% (24).

#### 1.4.5. LIJEČENJE

##### 1.4.5.1. POVRŠINSKI RAK MOKRAĆNOG MJEHURA

Liječenje se provodi transuretralnom endoskopskom resekcijom (TUR), pri čemu je potrebno u tromjesečnim intervalima ponavljati cistoskopiju, postupak pri kojem se kroz mokraćovod uvodi kamera (25, 26). Također, uključuje i intravezikalnu imunoterapiju BCG-om (*Bacillus Calmette- Guérin*) te kemoterapiju mitomicinom C koji produljuju preživljenje bez znakova bolesti i smanjuju broj recidiva (25).

##### 1.4.5.2. MIŠIĆNO-INVAZIVNI RAK MOKRAĆNOG MJEHURA

Liječenje se temelji na radikalnoj cistektomiji s neoadjuvantnom kemoterapijom cisplatinom koja ovisi o patohistologiji tumora, statusu regionalnih limfnih čvorova i stadiju bolesti. U nekim slučajevima primjenjuje se i usporedna aplikacija radioterapije i kemoterapije radi očuvanja mokraćnog mjehura. Kod metastatske bolesti koristi se kemoterapija, kombinacija cisplatine i gemcitabina kao prva linija. U slučaju nepodnošenja cisplatine druga opcija je imunoterapija atezolizumabom ili pembrolizumabom. Visoku djelotvornost pokazala je imunoterapija anti PD1 i PD-L1 protutijelima. Kod koštanih metastaza primjenjuju se bifosfonati i palijativna radioterapija (25).

## 1.5. KUPUSNJAČE

Kupusnjače (lat. *Brassicaceae*) ili krstašice (lat. *Cruciferae*), porodice cvjetnica (red *Brassicales*), sastoje se od 338 rodova i oko 3.700 vrsta. Članovi porodice poznati su po svom gospodarskom značaju. Neke od najpoznatijih su kupus, brokula, prokulice, kelj, koraba, repa, hren, rotkvica, itd. Neke se uzgajaju i kao ukrasno bilje (srebrenka, vazdazelena ognjica), a neki se članovi smatraju i invazivnim vrstama u područjima van prirodnog staništa. Jednogodišnje i višegodišnje biljke se uglavnom nalaze u umjerenim i tropskim planinskim područjima, a najviše u sjevernim umjerenim područjima (27).

### 1.5.1. LJEKOVITOST

Sekundarni metaboliti zaslužni su za njihov karakterističan okus te ljekovita svojstva. Najbolje istraženi su glukozinolati (GSL) i njihovi produkti razgradnje, izotiocijanati i indoli. Također obiluju brojnim fenolnim spojevima, karotenoidima i drugim, manje proučavanim, fitoaleksinima, terpenima, fitosteroidima i tokoferolima. Prehrana bogata biljkama iz ove porodice pokazala je važan utjecaj na kontrolu i učestalost različitih bolesti poput raka, hipertenzije, dijabetesa, kronične upale ili oksidativnog stresa, a posebna važnost pridodaje se spomenutim spojevima, poput polifenola i glukozinolata (28).

## 1.6. RAŠTIKA (*Brassica oleracea var. acephala*)

### 1.6.1. KARAKTERISTIKE

Raštika je dvogodišnja zeljasta biljka iz spomenute porodice kupusnjača. Sastoji se od uspravne, nerazgranate stabljike visine do 150 cm, vretenastog korijena te plavozelenih, mesnatih listova (Slika 4). Žuti cvjetovi rastu u drugoj godini sakupljajući se u grozdaste cvatove. Plod je komuška s okruglastim crvenim sjemenkama (29).



**Slika 4.** Raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

Preuzeto s: <https://www.plantea.com.hr/rastika/>

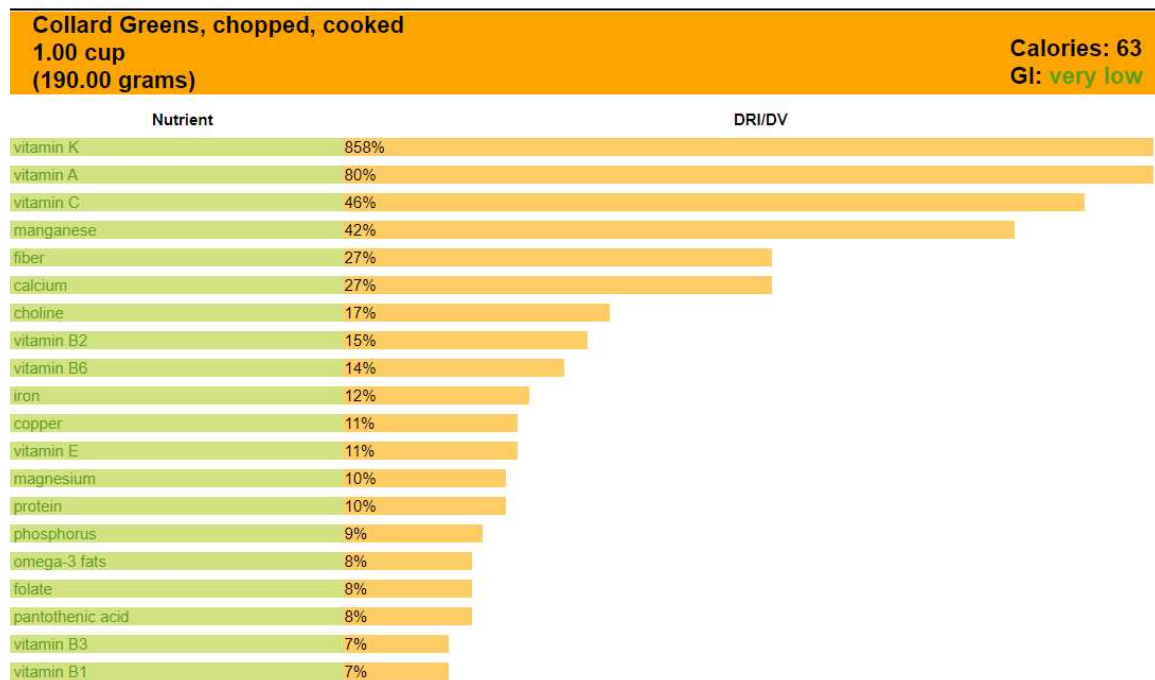
#### 1.6.2. KLIMA I STANIŠTE

Raštika potječe s područja Istočne Europe te Male Azije, no trenutno je rasprostranjena po skoro svim regijama gdje su niže temperature (30). Pogoduje joj sunčano i polusjenovito mjesto te humusno tlo bogato hranjivim tvarima. Otporna je na niske temperature, stoga bez problema prezimi (29).

#### 1.6.3. LJEKOVITOST I UPOTREBA

Raštika je bogat izvor vlakana, vitamina A (karotenoida), C, K, B1, B5, B6, kolina te minerala, kalcija, željeza, magnezija, kalija, mangana, fosfora i bakra. Od fitonutrijenata, najzastupljeniji su fenoli (kofeinska i ferulična kiselina), flavonoidi (kvercetin, kempferol) te glukozinolati (glukobrasicin, glukorafanin). Za značajno antioksidativno djelovanje zaslužna je alfa lipoična kiselina koja ima i potencijalan hipoglikemijski učinak. Visok udio vlakana i vode potiče probavu, a kolin je zaslužan za poboljšanje kognitivnih funkcija. Brojni vitamini i minerali povoljno djeluju na razne sustave u organizmu (kosti, koža, kosa, živčani i krvotvorni sustav). S obzirom na bogatu nutritivnu vrijednost (Slika 5), brojna istraživanja pokazala su njeno povoljno terapijsko djelovanje. Zahvaljujući izotiocijanatima, visokom udjelu vitamina K te dobrom izvoru omega-3 masnih kiselina, ističe se njeno protuupalno djelovanje. Uočen je

i njen povoljan učinak na kardiovaskularne bolesti pri čemu se naglašava utjecaj na smanjenje LDL kolesterola te prevencija oštećenja krvnih žila. Kako su upalni procesi usko povezani s nastankom raka, istraživanja su dokazala i antikancerogeno djelovanje gdje bitnu ulogu imaju derivati glukozinolata, izotiocijanati (31, 32).



**Slika 5.** Nutritivna vrijednost 190 grama kuhane raštike prikazana preko preporučenog dnevnog unosa (DRI/DV)

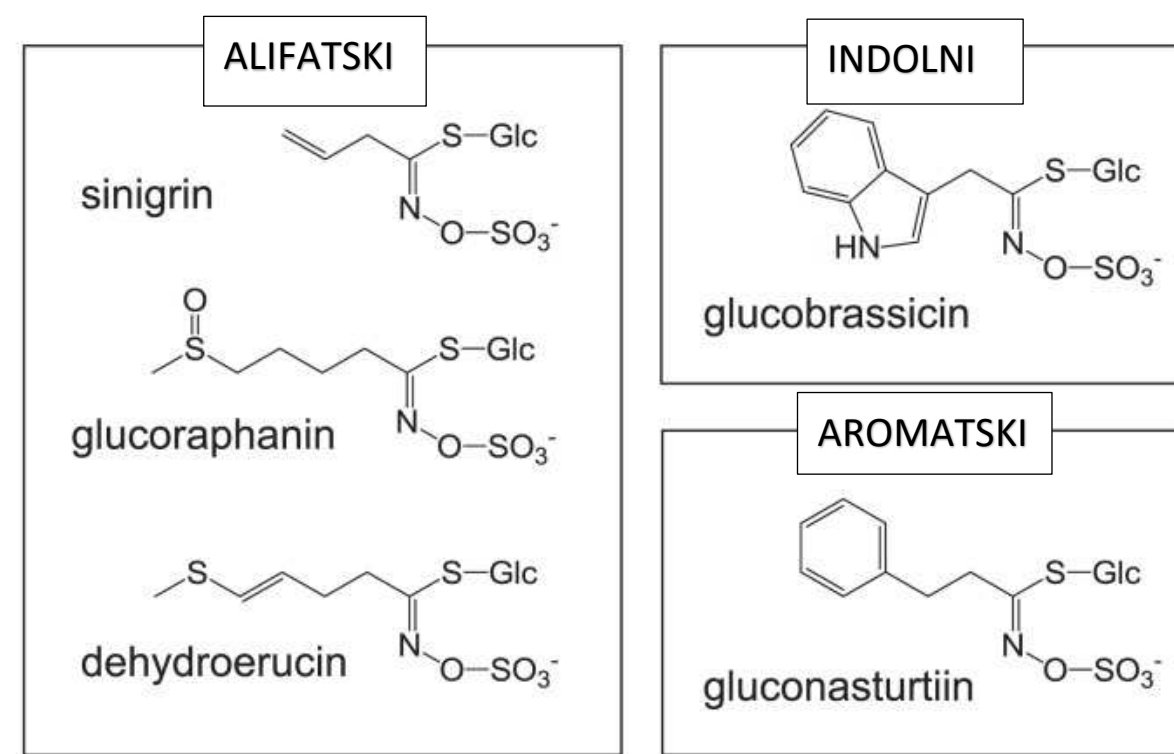
Preuzeto s:

<http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=138#nutritionalprofile>

## 1.7. GLUKOZINOLATI

Glukozinolati (S-glukopiranozil tiohidroksimati) su sekundarni metaboliti biljaka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*). Njihova kemijska struktura obuhvaća  $\beta$ -tioglukozu, sulfonirani oksim i varijabilan aglikanski bočni lanac nastao iz  $\alpha$ -aminokiselina. S obzirom na različite aminokiselinske prekursore dijele se na alifatske, indolne te aromatske glukozinolate (Slika 6). Različite skupine sintetiziraju se neovisnim metaboličkim putevima zajedničkim

enzimima uključenim u stvaranje jezgrene strukture glukozinolata pod utjecajem gena. Sastav i sadržaj glukozinolata ovisi o genotipu, klimi i uvjetima kultivacije (gnojidba, vrijeme berbe i položaj biljke). Pri oštećenju biljnog tkiva dolazi do hidrolize glukozinolata pomoću enzima mirozinaze te nastaju izotiocijanati, tiocijanati, nitrili, goitrin i epitionitril (33).



**Slika 6.** Primjeri različitih glukozinolata

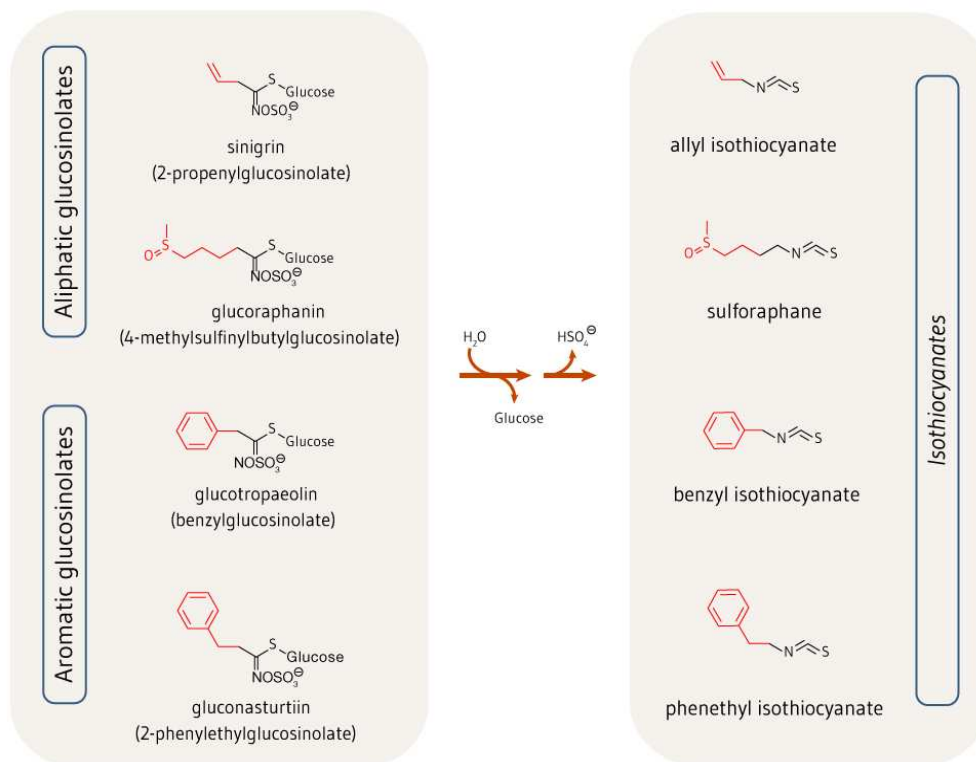
Preuzeto i modificirano s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4031110/>

## 1.8. IZOTIOCIJANATI

Izotiocijanati, opće formule R-NCS, su fitokemikalije koje u svojoj strukturi sadrže sumpor (Slika 7) (34). Benzil izotiocijanati (BITC), fenetil izotiocijanati (PEITC) i sulforafan (SFN) su predmeti istraživanja zbog povoljnog terapijskog učinka (35). Otkrićem citoprotektivnog djelovanja sulforafana, izotiocijanata nađenog u brokuli, porastao je interes za daljnje istraživanje njihovih povoljnih učinaka. Ispitivanja na glodavcima pokazala su njihovo antitumorsko djelovanje u onima s genetskom predispozicijom te kod tumora uzrokovanim vanjskim čimbenicima. Takvo djelovanje otkriveno je u različitim organima,

poput jednjaka, želuca, debelog crijeva, pluća, mokraćnog mjehura, gušterače, mliječne žlijezde te kože (36). Mehanizam djelovanja temelji se na interakciji s proteinima uključenim u proces popravka DNK-a, inhibiranju staničnog ciklusa i induciranju apoptoze stanica. Također, inhibiraju NF- $\kappa$ B (nuklearni faktor-*kappaB*) koji ima ulogu u procesu upale i imunološkog odgovora, a smatra se glavnim faktorom migracije tumorskih stanica (35). Ulogu u ekspresiji gena ostvaruju inhibicijom histon deacetilaze (HDAC) pri čemu dolazi do ekspresije tumorsupresorskih gena te posljedično inhibiranja staničnog ciklusa i apoptoze prekancerogenih stanica (37, 38). Inhibiraju i aktivnost enzima biotransformacije prve faze, iz obitelji citokrom P450, uključenih u proces karcinogeneze, a induciraju enzime druge faze, kao što su GST, UDP-glukuronil transferaza (UGT), NQO1 i glutamat cistein ligaza (GCL), koji sudjeluju u zaštiti stanica od oštećenja DNK uzrokovanog karcinogenima i reaktivnim kisikovim spojevima (39). Inhibiraju proces angiogeneze utjecajem na čimbenike inducirane hipoksijom (HIF) koji sudjeluju u kontroli samog procesa (40). Dokazano je njihovo protuupalno i imunomodulatorno djelovanje različitim mehanizmima inhibicije VEGF (vaskularni endotelni čimbenik rasta) i proupalnih citokina (36). Antioksidativna aktivnost sulforafana dokazana je putem indukcije citoprotektivnih proteina, posebice antioksidativnih enzima, aktivacijom transkripcijskog faktora NRF2 neophodnog za pokretanje antioksidacijskog odgovora stanice na stres (41). Uz spomenute učinke, *in vitro* i *in vivo* istraživanja dokazala su njihovo i antibakterijsko djelovanje eradikacijom *Helicobacter pylori* (42).





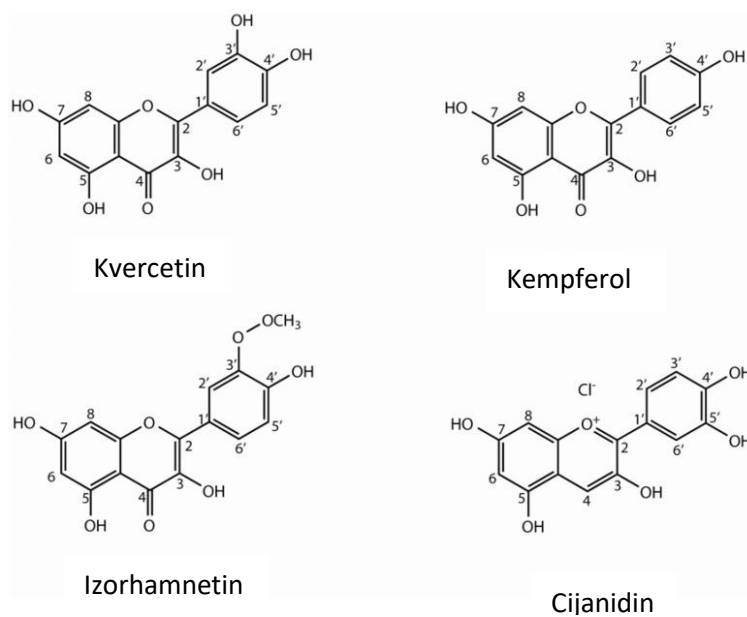
**Slika 7.** Kemijska struktura glukozinolata i njihovih izotiocijanatnih derivata

Preuzeto s: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates>

## 1.9. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su još jedna skupina fitokemikalija kojima su bogate kupusnjače (Slika 8). Sintetiziraju se kao sekundarni metaboliti u biljkama iz aminokiseline fenilalanina pomoću enzima fenilalanil-amonij-lijaze. Karakteristična struktura sastoji se od aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina. Ovisno o strukturi dijele se na jednostavne fenole, fenolne kiseline, derivate hidroksicimetne kiseline te najzastupljenije, flavonoide. Njihova uloga u biljkama je brojna. Neke od njih su privlačenje kukaca, oprašivanje, obrambeni mehanizam protiv insekata, gljivica, virusa i bakterija te oponašanje fitohormona. Brojnim istraživanjima potvrđen je i njihov povoljan terapijski učinak, kao što je protuupalno, antimikrobno, antialergijsko, antitumorsko i najznačajnije, antioksidativno djelovanje. Zahvaljujući njihovom antioksidativnom djelovanju, neutralizacijom reaktivnih kisikovih spojeva, imaju protektivno djelovanje na brojne organe te bitnu ulogu u bolestima povezanih s oksidacijskim stresom, kao što su upalne bolesti, rak, ateroskleroza te neurodegenerativne, Alzheimerova i Parkinsonova

bolest. Širok spektar djelovanja ostvaruju i preko inhibicije ili indukcije različitih enzimskih sustava uključenih u puteve stanične diobe i proliferacije, agregacije trombocita, detoksifikacije te upalnog i imunološkog odgovora (43). Prema nekim istraživanjima flavonoidi ostvaruju antitumorsko djelovanje kroz različite molekularne puteve koji dovode do inhibicije staničnog ciklusa i apoptoze tumorskih stanica (44). Uz spomenute funkcije, značajna je i njihova antibakterijska aktivnost, posebice derivata kvercetina i kempferola, koji su efikasno inhibirali rast nekih gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. Izorhamnetin, izoliran iz lista gorušice, pokazao je i značajno hipoglikemijsko djelovanje te vazodilacijske sposobnosti, stoga i potencijalnu kardioprotektivnu ulogu. Spomenuta tri spoja ostvaruju i protuupalno djelovanje na aktivirane makrofage (43). Najnovija istraživanja dokazuju i anksiolitičko djelovanje kempferola, izoliranog iz brokule (45). Zahvaljujući univerzalnim adhezivnim i reduktivnim svojstvima, funkcionalnim skupinama i biokompatibilnosti, polifenoli su se pokazali prikladnim materijalom za oblikovanje raznih nanočestica koje se odlikuju visokom stabilnošću, brojnim funkcijama, dobrom biorazgradivošću i biološkom sigurnošću, stoga imaju široku primjenu u biomedicinskim područjima (dostava lijekova, genska terapija, slikovna dijagnostika, itd.) (46).



**Slika 8.** Primjeri flavonoida iz biljaka porodice *Brassica*

Preuzeto i modificirano s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6259264/>

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje ekstrakata lista, stabljike i korijena biljne vrste *Brassica oleracea var. acephala* (raštika) na stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom. Hipoteza o potencijalno citotoksičnom djelovanju ispitivana je na staničnim linijama karcinoma dojke (MDA-MB-231) i karcinoma mokraćnog mjehura (T24).

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

### 3.1. STANIČNE LINIJE

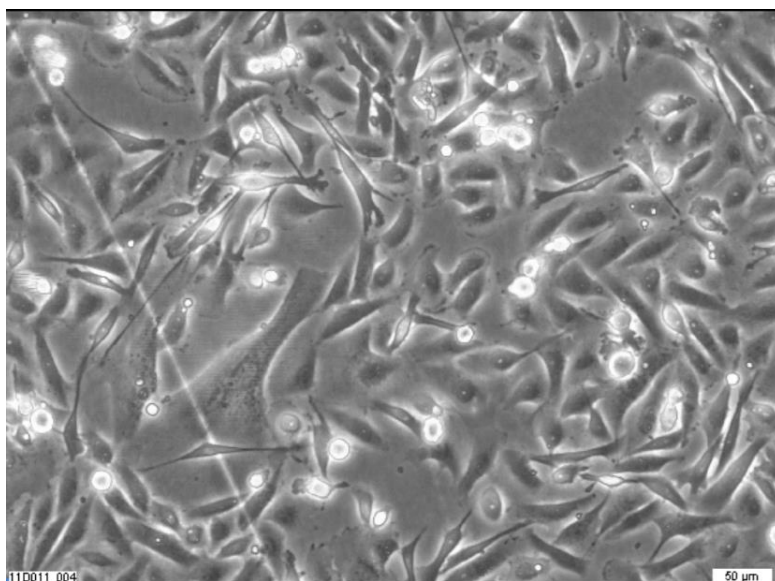
Citotoksična aktivnost ekstrakata provodila se *in vitro* na humanim staničnim linijama trostruko-negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231) te karcinoma mokraćnog mjehura (T24). Karakteristike navedenih staničnih linija prikazane su u tablicama 2 i 3.

#### 3.1.1. MDA-MB-231

**Tablica 2.** Karakteristike stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-26#detailed-product-information>

<b>ORGANIZAM</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>TIP STANICA</b>	epitelne
<b>MORFOLOGIJA</b>	epitelna
<b>TKIVO</b>	dojka, mliječna žlijezda, pleularni izljev
<b>BOLEST</b>	adenokarcinom
<b>UVJETI ČUVANJA</b>	parna faza tekućeg dušika
<b>TIP RASTA</b>	adherentan
<b>KARIOTIP</b>	aneuploidni ženski (modalni broj kromosoma = 64)



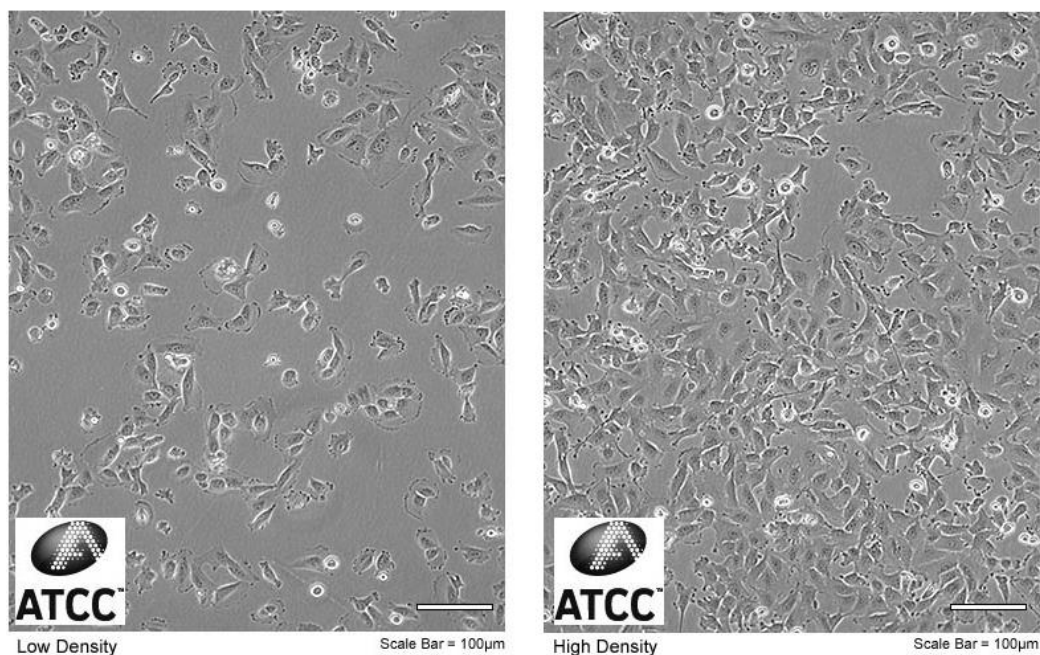
**Slika 9.** Stanična linija MDA-MB-231

Preuzeto s: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>

### 3.1.2. T24

**Tablica 3.** Karakteristike stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura T24 Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-4#detailed-product-images>

<b>ORGANIZAM</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>TIP STANICA</b>	epitelne
<b>MORFOLOGIJA</b>	epitelna
<b>TKIVO</b>	mokraćni mjehur
<b>BOLEST</b>	karcinom prijelaznih stanica
<b>UVJETI ČUVANJA</b>	parna faza tekućeg dušika
<b>TIP RASTA</b>	adherentan
<b>KARIOTIP</b>	hipodiploidija do hipopentaploidija



**Slika 10.** Stanična linija T24

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-4#detailed-product-images>

## 3.2. METODE IZOLACIJE

### 3.2.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju se sastoji od dva dijela čime su omogućene dvije vrste izolacije biljnog sadržaja (Slika 11). Gornji dio aparature omogućava izolaciju hlapljivih spojeva (engl. *fragrance*) pomoću procesa 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 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 (plinska kromatografija s masenom spektrometrijom, od engl. *Gas chromatography–mass*



*spectrometry*) analizu. Uzorak se do analize čuva u zamrzivaču. Biljni materijal raštike je obrađen mikrovalnom ekstrakcijom. Donji dio aparature za mikrovalnu ekstrakciju omogućava izolaciju aroma (engl. *flavour*). Provodi se bez dodatka organskog otapala. Pri određenim uvjetima (snaga 500W, 35 minuta) te uz pomoć mikrovalova i gravitacijske sile, u čaši postavljenoj na dnu aparature, sakuplja se ekstrakt. Po završetku ekstrakcije dobije se određen volumen ekstrakta koji se prelije u lijevak za odijeljivanje te se ekstrahira s 3 puta po 10 mL diklormetana. Potom se diklormetanski sloj odvoji, ispusti preko pipca te suši bezvodnim natrijevim sulfatom. Konačni dobiveni ekstrakt se prebaci u prethodno izvaganu bočicu te se višak organskog otapala otkloni uparivanjem u struji dušika. Tako dobiveni uzorci se čuvaju u hladnjaku i spremni su za GC-MS analizu.



**Slika 11.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju

Preuzeto s: <https://ats-scientific.com/products/ethos-ex-microwave-extraction>

### 3.3. POSTUPAK

Stanične linije su nakon odmrzavanja uzgojene u DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mediju u vlažnom inkubatoru na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub>. DMEM sadrži hranjive tvari kao što su aminokiseline i minerali te FBS (*Fetal bovine serum*, hrv. goveđi serum) koje su potrebne stanicama. U njemu se nalaze i antibiotici, te fenolno crvenilo, indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je potrebna promjena medija. Stanice u mediju ostavimo preko noći kako bi se uhvatile za podlogu. Adherirane stanice na podlozi, nakon uklanjanja DMEM-a PBS-om (*phosphate buffer saline*, hrv. puferirana otopina fosfatnih soli), tretiraju se tripsinom, proteolitičkim enzimom koji omogućava odvajanje stanica od podloge te njihovo presađivanje.

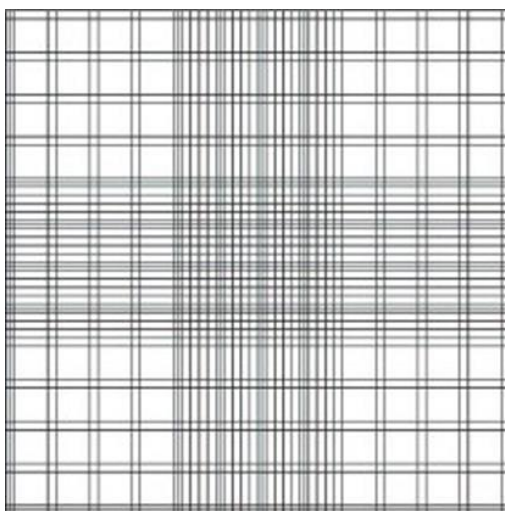
Potom slijedi brojanje stanica pomoću Bürker - Türkove komorice (Slika 12) pri čemu se 10 µl stanica pomiješa s 90 µl Trypan Blue boje koja selektivno boja mrtve stanice te tako omogućava razlikovanje i brojanje živih stanica koje nisu obojane zbog sačuvanog integriteta stanične membrane. U komoricu prenesemo pripravljenu staničnu suspenziju te pomoću mikroskopa izbrojimo žive stanice unutar pet kvadratića (Slika 13), a konačan broj izračunamo po formuli:  $N \times 10 \times 10^4$  stanica/mL ( $N$  = broj živih stanica u kvadratićima, 10 = faktor razrjeđenja,  $10^4$  = volumen komorice). Jednak broj stanica presađuje se u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu.

Nakon toga se staničnim linijama na četiri različite ploče s jažicama dodaju određena razrjeđenja vodenih ekstrakata lista, stabljike i korijena raštike u koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL te ostave u inkubatoru tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice, koje sadrže samo medij, predstavljaju kontrolu.



**Slika 12.** Bürker - Türkova komorica

Preuzeto s: <https://market.mikro-polo.si/vsi-izdelki/izdelek.aspx/i783251>



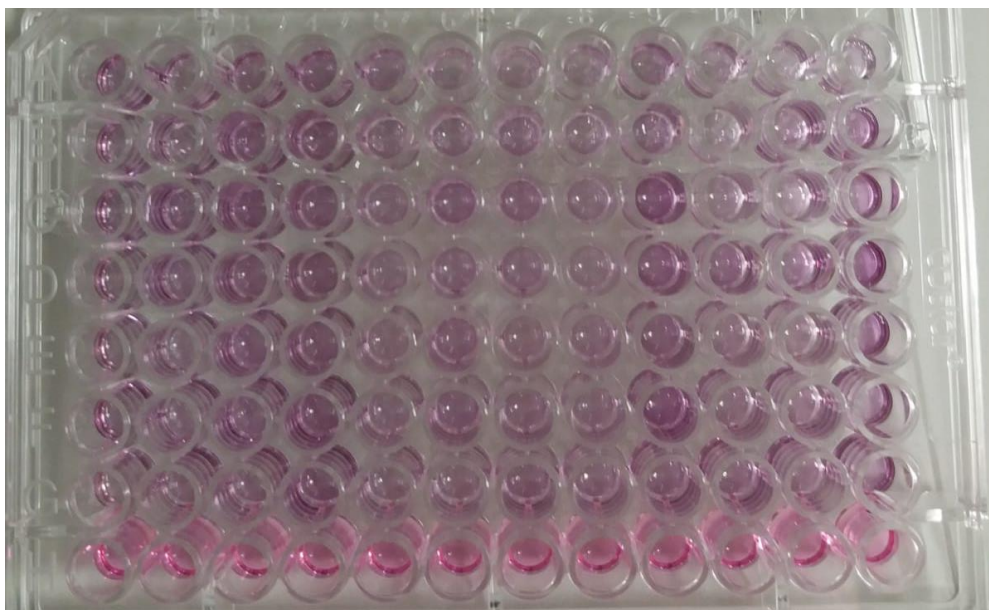
**Slika 13.** Komorica za brojanje stanica

Preuzeto s: <http://www.kefo.hr/plo%C5%A1%C4%8Dice-burkerturk-za-mikroskopiranje>

### **3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA)**

MTT metodom mjerimo preživljenje i proliferaciju stanica. Žuti tetrazolin MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) se reducira u mitohondrijima metabolički aktivnih stanica. MTT testom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica tretiranih određenim ekstraktima biljaka s obzirom da metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan, dok mrtve stanice gube tu sposobnost. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Nakon dodatka otopine MTT-a, stanice se inkubiraju na 37 °C 2 sata. Ljubičasti formazan koji nastaje u stanici se mjeri spektrofotometrijski. Nakon uklanjanja medija, novonastali formazan je potrebno otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid) kako bi se mogla očitati njegova apsorbancija na 570 nm. Pločice su zatim inkubirane 10 min na 37°C uz treskanje.

Citotoksična aktivnost ispitivanih uzoraka raštike se iskazuje omjerom izmjerenih apsorbancija stanica tretiranih uzorcima vodenih ekstrakata dijelova raštike te apsorbancije onih koje nisu tretirane (kontrolne skupine).



**Slika 14.** Ljubičasto obojenje nakon otapanja formazana DMSO-om

### **3.5. STATISTIČKA ANALIZA**

Izmjerene su apsorbancije kontrolnih (stanice karcinoma u mediju) te ispitivanih skupina (stanice tretirane ekstraktima lista, stabljike i korijena raštike). Izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija kontrolnih i ispitivanih skupina nakon 4, 24, 48 i 72 sata te vrijednosti omjera između srednjih vrijednosti ispitivanih i kontrolnih skupina za svaku koncentraciju korištenih ekstrakata nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Dobiveni rezultati su prikazani grafički te statistički analizirani u programu GraphPadPrism v.7.0.

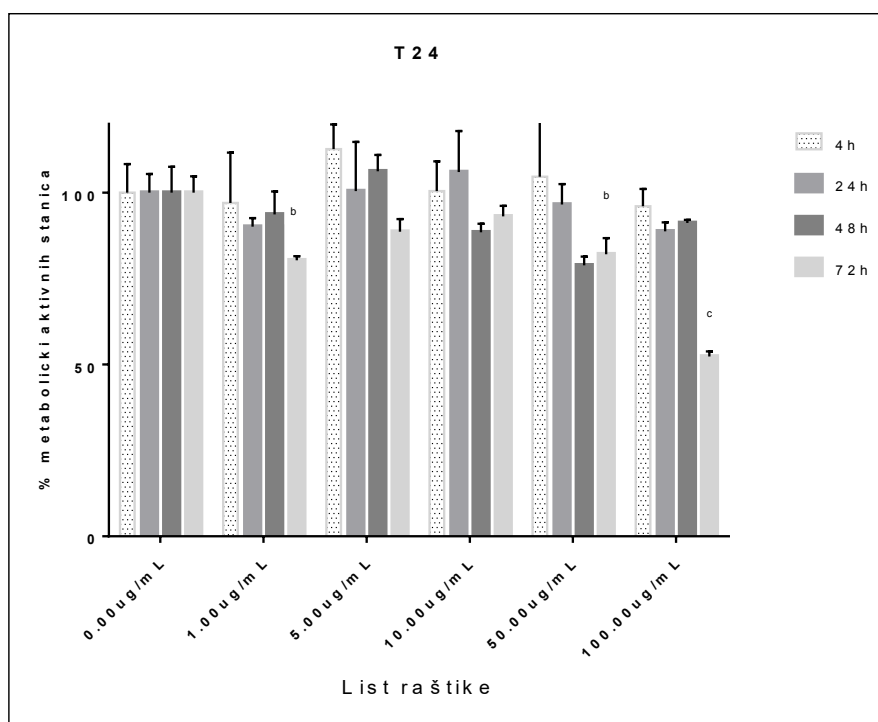
## **4. REZULTATI**

## Empirijska obrada:

Kao ograničenje istraživanja uzima se premala serija podataka.

### 4.1. STANIČNA LINIJA T24

#### 4.1.1. EKSTRAKT LISTA RAŠTIKE

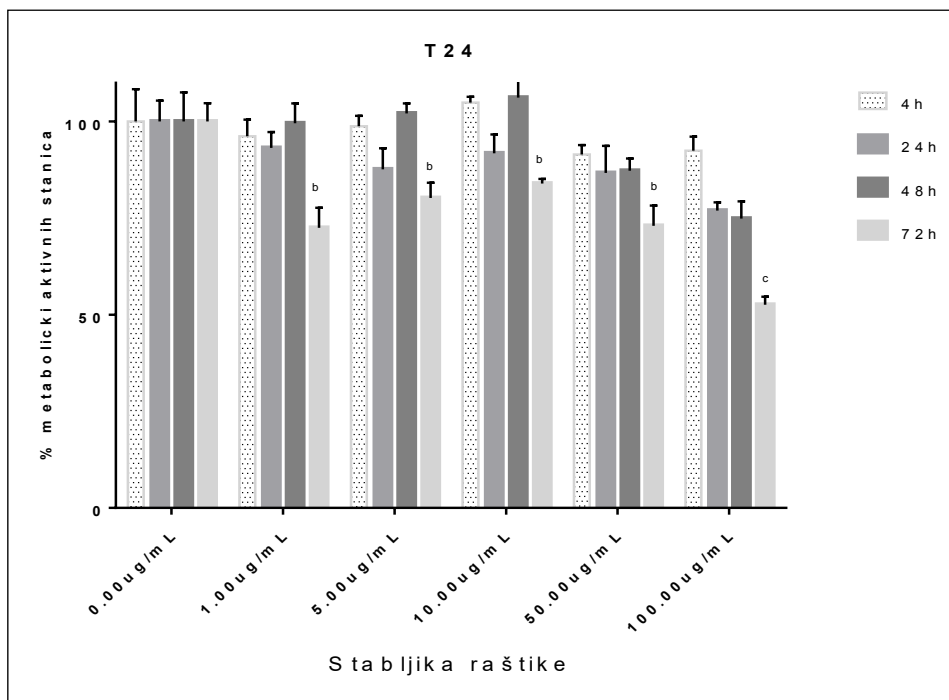


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	ND	ND	ND	ND

**Slika 15.** Citotoksična aktivnost ekstrakta lista raštike (IC50=koncentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika:  $P^b < 0,01$ ,  $P^c < 0,001$ )

Tretiranjem stanica vodenim ekstraktom lista raštike pri koncentracijama od 5 i 10 µg/mL nije zabilježena značajna citotoksična aktivnost, dok je kod 1 i 50 µg/mL aktivnost opažena nakon 48 i 72 sata ( $P < 0,01$ ). Najveća koncentracija od 100 µg/mL pokazala je maksimalnu aktivnost nakon inkubacije od 72 sata (postotak metabolički aktivnih stanica se smanjio skoro na polovicu,  $P < 0,001$ ). IC50 vrijednost se nije mogla odrediti.

#### 4.1.2. EKSTRAKT STABLJIKE RAŠTIKE



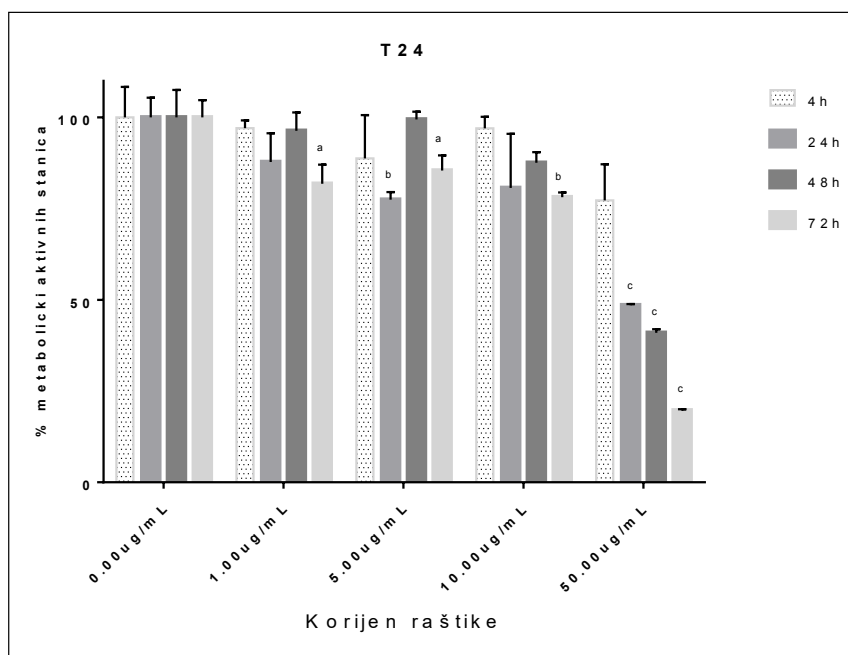
	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	ND	ND	ND	ND

**Slika 16.** Citotoksična aktivnost ekstrakta stabljike raštike

(IC50=koncentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika:  $P^b < 0,01$ ,  $P^c < 0,001$ )

Citotoksičnu aktivnost pokazuju ekstrakti stabljike nakon 72 sata inkubacije ( $P < 0,01$ ), a maksimalna je ona kod najveće koncentracije od 100  $\mu\text{g/mL}$ , nakon čega se postotak metaboličkih stanica smanjio na oko 60% ( $P < 0,001$ ). IC50 vrijednost se nije mogla odrediti.

### 4.1.3. EKSTRAKT KORIJENA RAŠTIKE



	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	ND	38,92	45,33	21,58

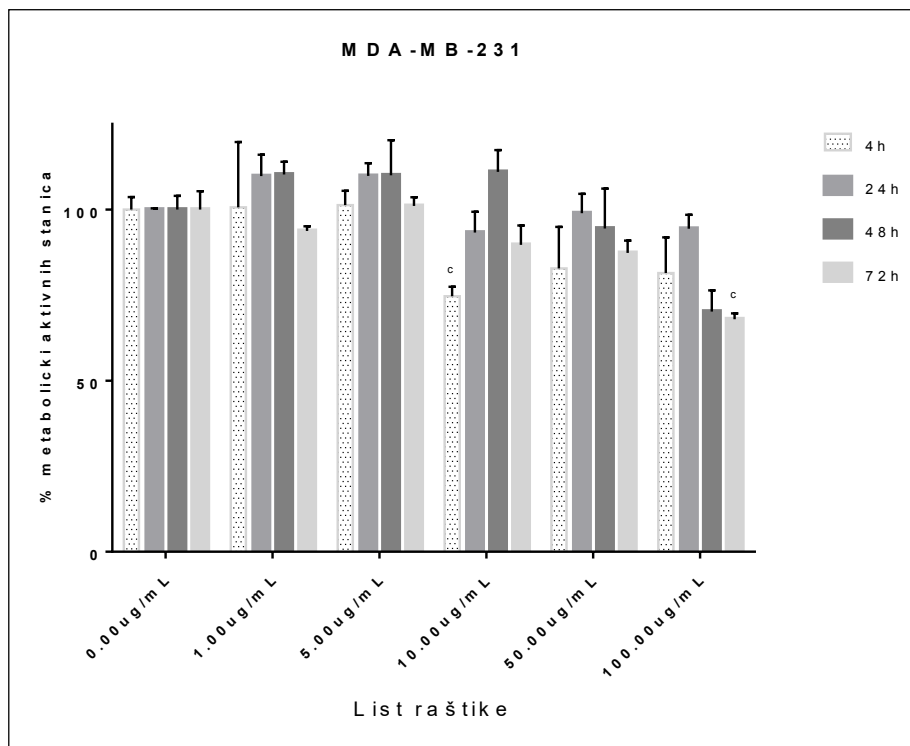
**Slika 17.** Citotoksična aktivnost ekstrakta korijena raštike (IC50=konzentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika:  $P^a < 0,05$ ,  $P^b < 0,01$ ,  $P^c < 0,001$ )

Citotoksična aktivnost zabilježena je kod svih koncentracija nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. Umjerena citotoksična aktivnost uočena je nakon 24, 48 i 72 sata, pri čemu je IC50 vrijednost nakon 24 sata 38,92 µg/mL, 48 sati 45,33 µg/mL, a nakon 72 sata 21,58 µg/mL. Maksimalna je pri koncentraciji od 50 µg/mL gdje postotak metabolički aktivnih stanica opada proporcionalno s vremenom inkubacije do oko 30% nakon 72 sata ( $P < 0,001$ ).



## 4.2. STANIČNA LINIJA MDA-MB-231

### 4.2.1. EKSTRAKT LISTA RAŠTIKE



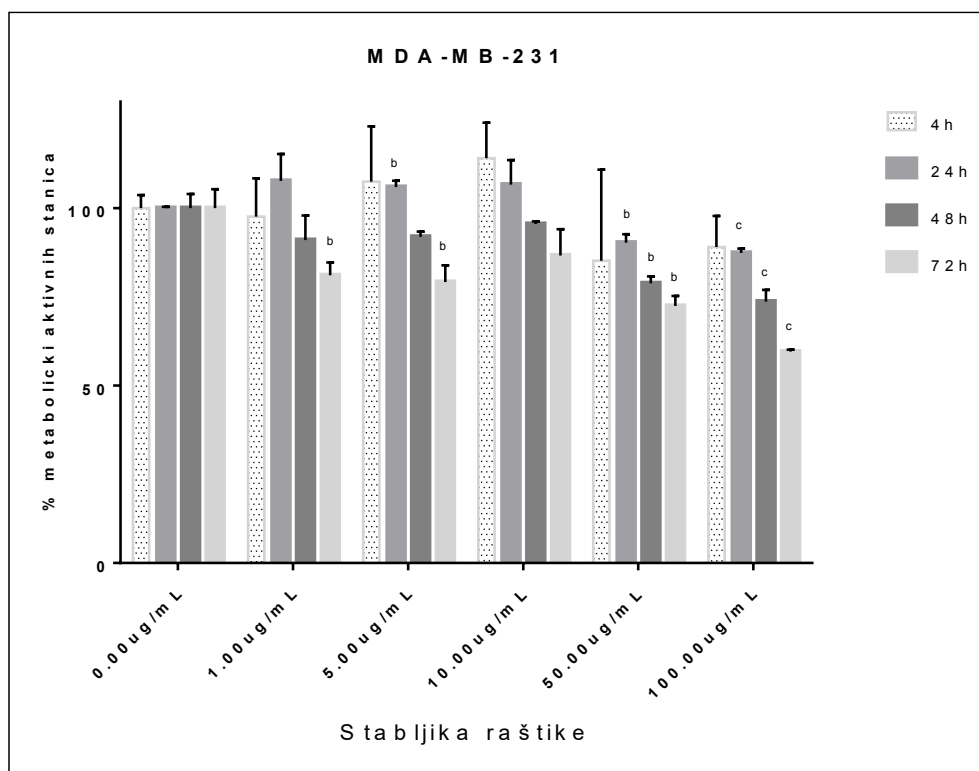
	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	ND	ND	ND	ND

**Slika 18.** Citotoksična aktivnost ekstrakta lista raštike

(IC50=konzentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika:  $P^c < 0,001$ )

Citotoksična aktivnost je ostvarena kod većih koncentracija nakon 72 sata inkubacije, pri čemu je maksimalna pri koncentraciji od 100 µg/mL gdje je postotak metabolički aktivnih stanica pao na oko 70% ( $P < 0,001$ ). Citotoksična aktivnost uočena je i pri koncentraciji od 10 µg/mL nakon samo 4 sata ( $P < 0,001$ ). IC50 vrijednost se nije mogla odrediti.

#### 4.2.2. EKSTRAKT STABLJIKE RAŠTIKE



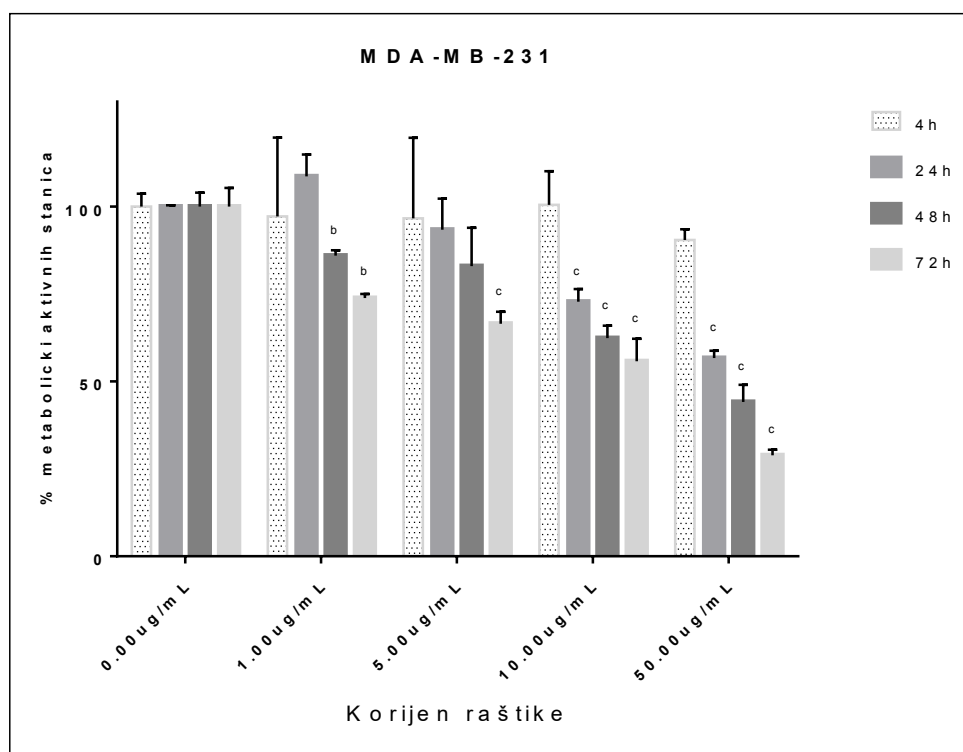
	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	ND	ND	ND	ND

**Slika 19.** Citotoksična aktivnost ekstrakta stabljike raštike

(IC50=konzentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika:  $P^b < 0,01$ ,  $P^c < 0,001$ )

Citotoksičnu aktivnost pokazuju sve koncentracije nakon 48 i 72 sata. Pri koncentracijama od 5 µg/mL, 10 µg/mL i 100 µg/mL postotak metabolički aktivnih stanica opada proporcionalno s vremenom inkubacije, dok je najveća aktivnost zabilježena pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72 sata inkubacije (postotak metabolički aktivnih stanica opada na oko 60%,  $P < 0,001$ ). IC50 vrijednost se nije mogla odrediti.

#### 4.2.3. EKSTRAKT KORIJENA RAŠTIKE



	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	ND	54,05	25,37	11,62

**Slika 20.** Citotoksična aktivnost ekstrakta korijena raštike

(IC50=konzentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika:  $P^b < 0,01$ ,  $P^c < 0,001$ )

Citotoksična aktivnost zabilježena je pri svim koncentracijama nakon 48 i 72 sata. Pri koncentracijama od 5 µg/mL, 10 µg/mL i 50 µg/mL postotak metabolički aktivnih stanica se proporcionalno smanjuje s vremenom inkubacije. Umjerena aktivnost je opažena nakon 24 sata (IC50= 54,05 µg/mL) te nakon 48 sati (IC50=25,37 µg/mL), a najjači učinak se ostvaruje nakon 72 sata pri 50 µg/mL ( $P < 0,001$ ). IC50 iznosi svega 11,62 µg/mL te predstavlja značajnu citotoksičnu aktivnost.

## **5. RASPRAVA**

Karcinom je bolest nekontroliranog rasta stanica i širenja u druge dijelove tijela, a može nastati bilo gdje u ljudskom tijelu. Za razliku od normalnih stanica, one imaju poremećen proces stanične diobe i apoptoze, odnosno programirane stanične smrti. Karakteristike stanica karcinoma koje ih razlikuju od normalnih su nekontrolirani rast neovisan o staničnim signalima za poticanje rasta ili apoptoze, širenje u druge dijelove tijela, otpornost na imunološki sustav organizma te iskorištavanje za njihovu zaštitu, promjena broja kromosoma u stanici (duplikacije i delecije) te upotreba drugačijih nutrijenata za rast.

Karcinom je genetska bolest uzrokovana promjenama u genima uključenih u staničnu funkciju, odnosno rast i diobu stanice. Neki od uzroka genetičkih promjena su pogreške pri staničnoj diobi, oštećenje DNK uzrokovano okolišnim čimbenicima ili je naslijeđeno od roditelja (47).

Karcinom dojke, kao najzastupljenija maligna bolest kod žena te najčešći maligni uzrok smrti u više od 90% zemalja (5), nastaje u epitelnim stanicama kanala (85%) ili lobulama žljezdanog tkiva dojke (15%) (5, 6). 2020. godine zabilježeno je 2,3 milijuna žena kojima je dijagnosticiran karcinom dojke i 685 000 smrti. Prisutno je u svakoj državi u svijetu u žena u bilo kojoj dobi nakon adolescencije s većim brojem slučajeva u starijoj dobi. Određeni čimbenici rizika za nastanak karcinoma dojke su spol (ženski kao najjači čimbenik), dob, pretilost, zlouporaba alkohola, genetska predispozicija, izloženost zračenju, pušenje i hormonska nadomjesna terapija. Govoreći o genetskim promjenama, najznačajnije su mutacije BRCA1, BRCA2 i PALB-2 gena. Postignuća u povećanju preživljenja počela su 80-ih u državama u kojima su se krenili provoditi programi rane detekcije u kombinaciji s različitim metodama terapije (6).

Karcinom mokraćnog mjehura je po incidenciji na petom mjestu malignih tumora kod muškaraca, a najviše u Sjevernoj Americi i Europi (18). Uglavnom nastaje na urotelnim stanicama, koje nalazimo, osim mokraćnog mjehura, i u bubrezima i mokraćnoj cijevi. Većina karcinoma se dijagnosticira u ranom stadiju kada je izlječiv, ali čak i kod uspješnog liječenja moguć je njegov povratak. Čimbenici rizika su pušenje, dob, spol (muškarci), terapija ciklofosfamidom, izloženost kemikalijama, genetska predispozicija te kronična upala mokraćnog mjehura (48).

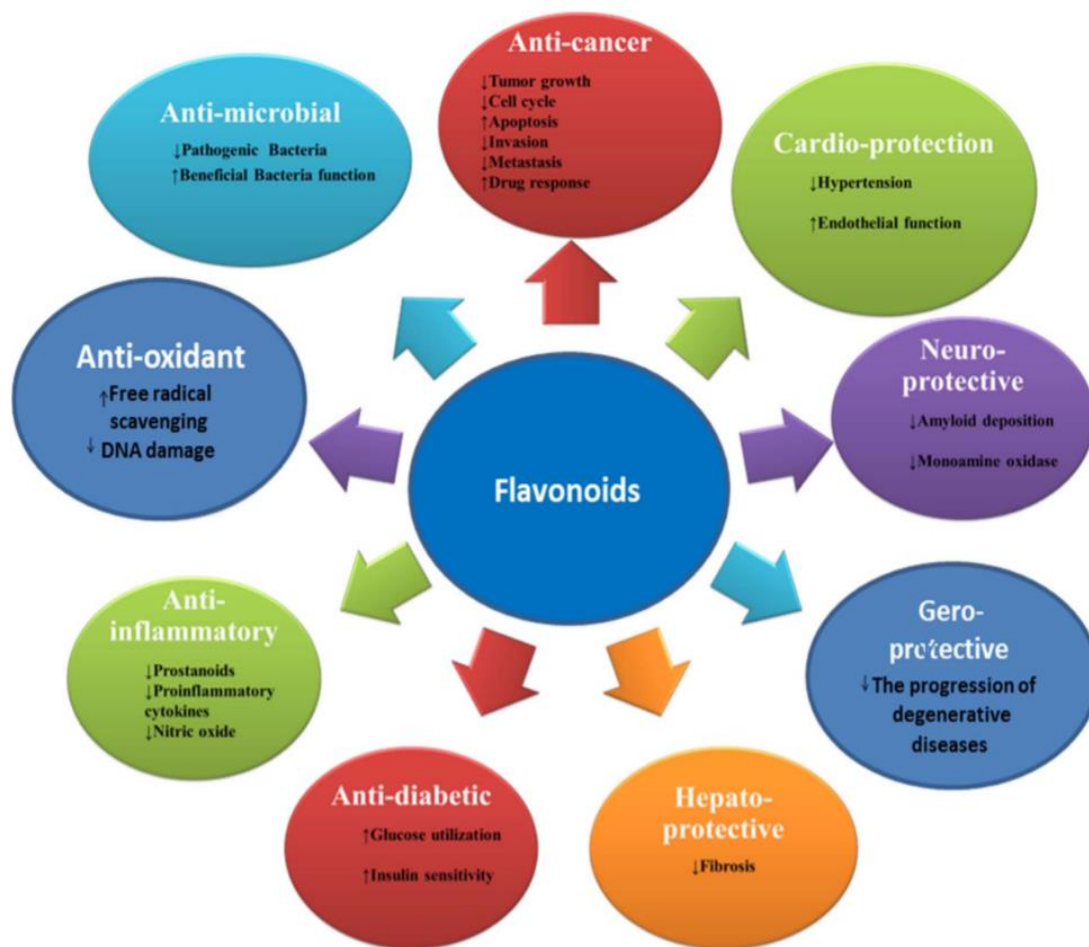
Krstašice ili kupusnjače (lat. *Brassicaceae*) su vrlo raširena i ekonomski značajna biljna porodica reda *Brassicales* s više od 7000 vrsta unutar 865 rodova. Raširena je po svim naseljenim kontinentima, a najrasprostranjenija u gusto naseljenim područjima Europe i

Sjeverne Amerike. Najznačajniji u prehrani je kupus koji se razvio iz divljeg kupusa (*Brassica oleracea*) (49).

Raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*), dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*), ubraja se u jednu od najzdravijih namirnica upravo zbog bogate nutritivne vrijednosti (29). Obiluje vlaknima, vitaminima A, B, C i K te mineralima, kao što su kalcij, željezo, magnezij, kalij, mangan, fosfor i bakar. Proučavano citotoksično, protuupalno i antioksidativno djelovanje proizlazi iz brojnih fitonutrijenata među kojima su najpoznatiji fenoli, flavonoidi, glukozinolati te derivati glukozinolata, izotiocijanati, stoga prehrana bogata ovom namirnicom pokazala je smanjenje rizika brojnih bolesti, kao što su dijabetes, pretilost i srčana oštećenja (31, 32).

Izotiocijanati, produkti hidrolize glukozinolata uslijed oštećenja biljnog tkiva, su fitokemikalije povoljnog terapijskog učinka. *In vitro* i *in vivo* istraživanja dokazala su njihov antitumorski učinak različitim mehanizmima djelovanja uključujući interakciju s proteinima uključenih u proces popravka DNK, inhibiciju staničnog ciklusa i indukciju apoptoze. Brojni proteini, kao što su enzimi biotransformacije prve i druge faze te nuklearni faktori, bivaju inducirani ili inhibirani te se posljedično ostvaruje određeni antitumorski učinak spomenutih spojeva. Značajan je i njihov protuupalni i antioksidativni potencijal različitim mehanizmima inhibicije određenih proupalnih citokina te indukcije citoprotektivnih proteina (39).

Skupinu flavonoida čini šest glavnih podskupina, antocijanidini, flavan-3-oli, flavonoli, flavanoni, flavoni i izoflavoni. Flavonoli su najzastupljeniji u prehrani čovjeka. Njima su bogati zeleno povrće, voće, čokolada te vino i čajevi. Flavonoidi također ostvaruju povoljne učinke na zdravlje (Slika 21). Većina bioaktivnosti je povezana sa sposobnošću modulacije broja stanica uključenih u signalizacijsku kaskadu. Dokazano je njihovo protuupalno, antitrombotsko, antidijabetsko, antitumorsko i neuroprotektivno djelovanje kroz različite mehanizme djelovanja. Brojna randomizirano kontrolirana ispitivanja pokazala su povoljno djelovanje konzumacije flavonoida na kardiovaskularni sustav te na kontrolu glukoze. Ograničen broj opservacijskih ispitivanja ukazuju i na potencijalno antitumorsko djelovanje, pri čemu se smatra da povećan unos izoflavona iz soje može biti povezan sa smanjenim rizikom obolijevanja od karcinoma dojke kod postmenopauzalnih žena i karcinoma prostate kod muškaraca (50).



**Slika 21.** Različiti mehanizmi djelovanja flavonoida

Preuzeto s: Kamboh, A. A., Leghari, R. A., Khan, M. A., Kaka, U., Naseer, M., Sazili, A. Q. i sur. Flavonoids supplementation - An ideal approach to improve quality of poultry products. *World's Poultry Science Journal*, 2018. doi:10.1017/s0043933918000703

Predmet ovog istraživanja su ekstrakti lista, stabljike i korijena raštike (*Brassica oleracea var. acephala*). Ispitivan je njihov potencijalan citotoksičan učinak na stanične linije humanih karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24).

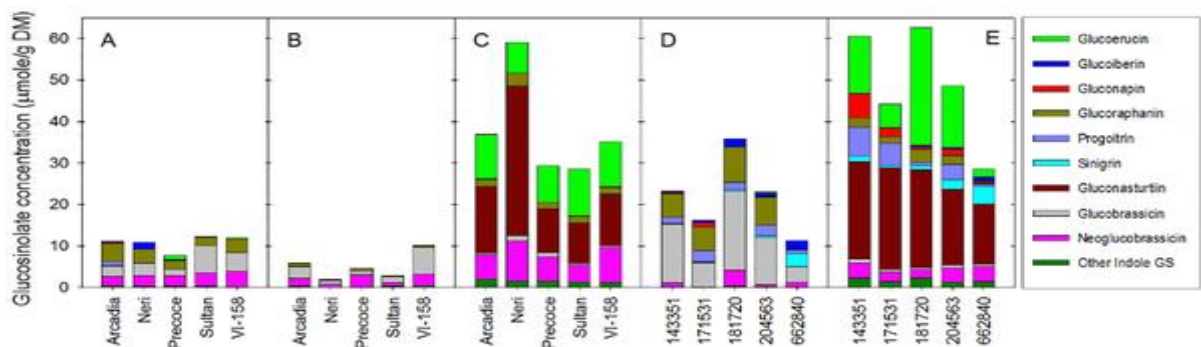
*In vitro* istraživanjem na obe stanične linije uočen je značajan utjecaj koncentracije ekstrakata i vremena inkubacije na citotoksičnu aktivnost, pri čemu su koncentracije od 50 i 100 µg/mL nakon 72 sata inkubacije najdjelotvornije u ostvarivanju citotoksičnog učinka.

Tretiranjem stanica karcinoma mjehura (T24), ekstrakt lista i stabljike pokazuju slabu citotoksičnu aktivnost tek nakon dužeg vremena inkubacije i to tek pri većim koncentracijama, dok je ekstrakt korijena ostvario umjeren citotoksičan učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL

te je nakon 72 sata inkubacije došlo do smanjenja postotka metabolički aktivnih stanica na 30 %.

Kod MDA-MB-231 stanične linije uočen je sličan učinak. Ekstrakt lista pri koncentraciji od 10  $\mu\text{g/mL}$  već nakon 4 sata inkubacije ostvaruje citotoksičan učinak, a ekstrakt stabljike tek nakon 72 sata pri višim koncentracijama. I u ovom slučaju najdjelotvorniji je ekstrakt korijena gdje vidimo i najveću ovisnost citotoksične aktivnosti o vremenu inkubacije, a značajan učinak se ostvaruje pri inkubaciji od 24, 48 i 72 sata pri koncentracijama od 10 i 50  $\mu\text{g/mL}$ . Najjača aktivnost zabilježena je pri koncentraciji od 50  $\mu\text{g/mL}$  nakon 72 sata inkubacije.

Prema dobivenim rezultatima ekstrakt korijena je pokazao najveće citotoksično djelovanje. Moguć razlog tome je prisutnost visoke koncentracije glukozinolata u samom korijenu biljke (Slika 22) (51).



**Slika 22.** Koncentracije različitih glukozinolata u cvjetovima (A), listovima (B) i korijenu (C) brokule te cvjetovima (D) i korijenu (E) raštike

Preuzeto s: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185112>

*In vitro* ispitivanjem dobiveni rezultati pokazuju citotoksično djelovanje raštike na stanične linije tumora dojke i mokraćnog mjehura upotrebom različitih koncentracija njezinih ekstrakata kroz određeni period inkubacije, stoga je glavna hipoteza potvrđena te cilj ispitivanja ostvaren. Također, dokazana je i ovisnost citotoksične aktivnosti, odnosno postotak metabolički aktivnih stanica, o koncentraciji ispitivanih uzoraka i vremenu izlaganja. Iz svega navedenog vidljivo je da ispitivana biljka ima veliki potencijal za daljnja biomedicinska ispitivanja u svrhu liječenja različitih bolesti, stoga su potrebna dodatna *in vivo* ispitivanja



kojima bi se moglo potvrditi njeno citotoksično djelovanje i dovesti do razvoja novih antitumorskih lijekova.

## **6. ZAKLJUČAK**

- 1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) ekstraktima lista, stabljike i korijena biljne vrste *Brassica oleracea var. acephala* dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica, odnosno smanjuje se postotak metabolički aktivnih stanica.
- 2) Ispitivani uzorci većinom pokazuju citotoksičan učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- 3) U nekim slučajevima djelovanje određenih ekstrakata nije proporcionalno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije te dolazi do blagog porasta metabolički aktivnih stanica.
- 4) Djelovanje ispitivanih ekstrakata je slično na obe stanične linije. Ekstrakti lista i stabljike blagi citotoksičan učinak pokazuju pri najvećim koncentracijama nakon 72 sata inkubacije. Značajan citotoksičan učinak ostvaruje ekstrakt korijena u koncentraciji od 50 µg/mL već nakon 24 sata na staničnoj liniji T24, dok je na stanicama MDA-MB-231 takvo djelovanje pri svim koncentracijama nakon 72 sata inkubacije. Najjači učinak zabilježen je pri najvećoj koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 sata.
- 5) Citotoksično djelovanje raštike je potvrđeno prema navedenim rezultatima. Za daljnju analizu i potvrdu dobivenih rezultata potrebna su dodatna *in vivo* ispitivanja na životinjskim modelima.

## **7. LITERATURA**

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 149-152.
2. 1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 164.
3. <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/> Datum pristupa: 3.5.2021.
4. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 183-89.
5. Beketić-Orešković L, Bašić Koretić M, Božina I, Brkljačić B, Čukelj P, Đaković N i sur. Epidemiologija carcinoma dojke. U: Šekerija M, Čukelj M. Karcinom dojke, multidisciplinarno liječenje. Prvo izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 1.
6. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> Datum pristupa: 5.5.2021.
7. Beketić-Orešković L, Bašić Koretić M, Božina I, Brkljačić B, Čukelj P, Đaković N i sur. Epidemiologija carcinoma dojke. U: Šekerija M, Čukelj M. Karcinom dojke, multidisciplinarno liječenje. Prvo izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 1.
8. <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8577.00.pdf> Datum pristupa: 5.5.2021.
9. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 645-649
10. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 655-656
11. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 208
12. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 208-210.
13. <https://www.cancer.gov/types/breast/breast-hormone-therapy-fact-sheet#what-types-of-hormone-therapy-are-used-for-breast-cancer> Datum pristupa: 10. 09. 2021.
14. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 210-211.

15. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 211.
16. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 211-212.
17. <https://www.breastcancer.org/treatment/radiation/metastatic> Datum pristupa: 10. 09. 2021.
18. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 570.
19. <https://emedicine.medscape.com/article/438262-clinical> Datum pristupa: 6.9.2021.
20. <https://emedicine.medscape.com/article/438262-overview#showall> Datum pristupa: 6.9.2021.
21. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 156.
22. <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html> Datum pristupa: 07. 09. 2021.
23. <https://emedicine.medscape.com/article/438262-overview#a8> Datum pristupa: 07. 09. 2021.
24. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 159.
25. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 158.
26. <https://www.nhs.uk/conditions/cystoscopy/> Datum pristupa: 10. 09. 2021.
27. <https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae> Datum pristupa: 17.09.2021.
28. Ramirez D, Abellán-Victorio A, Beretta V, Camargo A, Moreno DA. Functional ingredients from Brassicaceae species: Overview and perspectives. Int J Mol Sci. 2020;21:1998.

29. <https://www.plantea.com.hr/rastika/> Datum pristupa: 17. 09. 2021.
30. <https://www.healthbenefitstimes.com/collard-greens/> Datum pristupa: 17. 09. 2021.
31. [https://www.medicalnewstoday.com/articles/277957#health\\_benefits](https://www.medicalnewstoday.com/articles/277957#health_benefits) Datum pristupa: 18. 09. 2021.
32. <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=138> Datum pristupa: 18. 09. 2021.
33. Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed Sci.* 2014;64:48-59.
34. <https://www.phytochemicals.info/phytochemicals/isothiocyanates> Datum pristupa: 09.09.2021.
35. Soundararajan P, Kim JS. Anti-Carcinogenic glucosinolates in cruciferous vegetables and their antagonistic effects on prevention of cancers. *Molecules.* 2018;23:2983.
36. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med.* 2012;18:337-47.
37. Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res.* 2004;91:137-168.
38. Clarke JD, Hsu A, Yu Z, Dashwood RH, Ho E. Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55:999-1009.
39. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates> Datum pristupa: 09. 09. 2021.
40. Cavell BE, Syed Alwi SS, Donlevy A, Packham G. Anti-angiogenic effects of dietary isothiocyanates: mechanisms of action and implications for human health. *Biochem Pharmacol.* 2011;81:327-336.
41. Guerrero-Beltran CE, Calderon-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol.* 2012;64:503-508.
42. Haristoy X, Angioi-Duprez K, Duprez A, Lozniewski A. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3982-3984.
43. Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules.* 2010;16:251-280.

44. Li S, Wu H, Tollefsbol TO. Combined broccoli sprouts and green tea polyphenols contribute to the prevention of estrogen receptor-negative mammary cancer via cell cycle arrest and inducing apoptosis in HER2/neu mice. *J Nutr.* 2021;151:73-84.
45. Kaur D, Shri R, Kamboj A. Bioactivity-directed isolation, characterization, and quantification of an anxiolytic flavonoid from *Brassica oleracea* L.. *J Food Biochem.* 2021;45:e13608.
46. Guo Y, Sun Q, Wu FG, Dai Y, Chen X. Polyphenol-Containing Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Therapeutic Delivery. *Adv Mater.* 2021;33:e2007356.
47. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> Datum pristupa: 27. 09. 2021.
48. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/bladder-cancer/symptoms-causes/syc-20356104> Datum pristupa: 27. 09. 2021.
49. <https://www.wikiwand.com/sh/Krsta%C5%Alice> Datum pristupa: 28. 09. 2021.
50. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids> Datum pristupa: 30. 09. 2021.
51. Lee Y-S, Ku K-M, Becker TM, Juvik JA. Chemopreventive glucosinolate accumulation in various broccoli and collard tissues: Microfluidic-based targeted transcriptomics for by-product valorization. *PLoS ONE.* 2017;12: e0185112



## **8. SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje raštike (*Brassica oleracea var. acephala*) na humane stanice karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24). Pretpostavka je da će se broj stanica karcinoma, nakon tretiranja ekstraktima različitih dijelova biljke, smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **Materijali i metode:**

Citotoksičnost se ispitivala MTT metodom kojom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon tretiranja ekstraktima lista, stabljike i korijena raštike dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom. Uzorci biljke su pripremljeni u pet različitih koncentracija (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL), a učinak je gledan nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost ekstrakata određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm.

### **Rezultati:**

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

Kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24), svi uzorci pokazuju jači citotoksičan učinak pri većim koncentracijama i dužim vremenom inkubacije. Umjerenu citotoksičnu aktivnost, a ujedno i najjaču, pokazuje ekstrakt korijena koji nakon 72 sata inkubacije pri koncentraciji od 50 µg/mL dovodi do smanjenja metabolički aktivnih stanica na oko 30%.

Kod stanica karcinoma dojke (MDA-MB-231), manje je zastupljena proporcionalnost vremena inkubacije s postotkom metabolički aktivnih stanica upotrebom ekstrakta lista i stabljike, pri čemu su također najjači učinci zabilježeni kod većih koncentracija i dužih vremena inkubacije. I u ovom slučaju najjaču aktivnost pokazuje ekstrakt korijena pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 sata inkubacije. Zabilježena minimalna inhibitorna koncentracija (IC50) koja dovodi do inhibicije 50% stanica nakon 72 sata iznosi samo 11,62 µg/mL što predstavlja jaku citotoksičnu aktivnost.

### **Zaključci:**

*In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) ekstraktima različitih dijelova raštike dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak uglavnom je ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje nije uvijek

proporcionalno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, stoga u nekim slučajevima nakon određenog vremena dolazi do povećanja broja metabolički aktivnih stanica. Najjači citotoksični učinak zabilježen je kod ekstrakta korijena pri najvećoj koncentraciji od 50  $\mu\text{g/mL}$  nakon 72 sata inkubacije. Potencijalan citotoksičan učinak raštike na stanične linije humanih karcinoma, ujedno i hipoteza ovog istraživanja, je potvrđen. Potrebna su daljnja *in vivo* ispitivanja kako bi se potvrdilo djelovanje i na životinjskim modelima.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** The cytotoxic effect of *Brassica oleracea var. acephala* on human cancer cell lines measured by MTT method

**Objectives:**

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of *Brassica oleracea var. acephala* on human breast cancer cells (MDA-MB-231) and bladder (T24). It is assumed that the number of cancer cells, after treatment with extracts of different parts of the plant, will decrease compared to the control group.

**Materials and methods:**

Cytotoxicity was examined by the MTT method, which determines the percentage of metabolically active cells after treatment with extracts of leaves, stems and roots of collard greens obtained by microwave extraction. Plant samples were prepared in five different concentrations (1 µg / mL, 5 µg / mL, 10 µg / mL, 50 µg / mL and 100 µg / mL) and the effect was observed after 4, 24, 48 and 72 hours. The efficiency of the extracts was determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 570 nm.

**Results:**

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

In bladder cancer cells (T24), all samples show a stronger cytotoxic effect at higher concentrations and longer incubation times. Moderate cytotoxic activity, and at the same time the strongest, is achieved by the root extract, which after 72 hours of incubation at a concentration of 50 µg / mL leads to a reduction of metabolically active cells to about 30%.

In breast cancer cells (MDA-MB-231), the incubation time was less proportional to the percentage of metabolically active cells using leaf and stem extract. The strongest effects were also being observed in higher concentrations and longer incubation times. In this case, the strongest activity is also achieved by the root extract at a concentration of 50 µg/mL after 72 hours of incubation. The observed minimum inhibitory concentration (IC50) leading to inhibition of 50% of cells after 72 hours is only 11.62 µg/mL which represents strong cytotoxic activity.

**Conclusions:**

*In vitro* exposure of breast cancer cells (MDA-MB-231) and bladder (T24) to extracts of different parts of the collard greens leads to reduced cell survival rate. The cytotoxic effect is mainly dependent on incubation time and concentration. Activity is not always proportional to the increase in concentration and incubation time, so in some cases after a certain time there is an increase in the number of metabolically active cells. The strongest cytotoxic effect was observed with the root extract at the highest concentration of 50 µg/mL after 72 hours of incubation. The potential cytotoxic effect of collard greens on human cancer cell lines, as well as the hypothesis of this study, has been confirmed. Further *in vivo* studies are needed to confirm the effects in animal models as well.