

Citotoksično djelovanje kapara (Capparis spinosa L.) na različite stanične linije humanih karcinoma

Gabela, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:830858>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
(*Istraživanje i razvoj lijekova*)

Ivana Gabela

**Citotoksično djelovanje kapara (*Capparis spinosa* L.) na različite
stanične linije humanih karcinoma**

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
(*Istraživanje i razvoj lijekova*)

Ivana Gabela

**Citotoksično djelovanje kapara (*Capparis spinosa* L.) na različite
stanične linije humanih karcinoma**

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, Medicinski fakultet
Sveučilište u Splitu

Komentor rada: doc. dr. sc. Ivana Ratkaj, Odjel za biotehnologiju Sveučilište
u Rijeci

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
(*Drug Research and Development*)

Ivana Gabela

**Cytotoxic effects of capers (*Capparis spinosa* L.) on different human
cancer cell lines**

Master's thesis

Rijeka, 2020.

Diplomski rad obranjen je dana 25. 9.2020. pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Sedić
2. izv. prof. dr. sc. Elitza Markova Car
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
4. doc. dr. sc. Ivana Ratkaj

Rad ima 77 stranica, 30 slika, 6 tablica i 40 literaturnih navoda

Prije svega, željela bih se zahvaliti svojim roditeljima, Nataliji i Ivici, koji su uvijek bili uz mene, u sretnim i tužnim, dobrim i teškim trenutcima. Bez njih danas ne bih bila tu gdje jesam. Njihova vječna ljubav i podrška uvijek su me poticala da koračam prema naprijed i bez straha. Moj su životni oslonac, snaga i vjetar u leđa. Također, zahvaljujem se svome bratu Mati čiji me vedar duh i ljubav prate cijeloga života.

Zahvaljujem se momku Antoniju, čija ljubav i podrška su mi olakšali završetak fakultetskog obrazovanja. Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljima čije dobro društvo je uvijek bilo od pomoći.

Zahvaljujem se svim profesorima i kolegama koji su bili uz mene ovih pet godine školovanja i koji su sa mnom dijelili mnoge dobre i loše trenutke.

Jedno veliko hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić, koja mi je omogućila izradu diplomskog rada u mome Splitu. Njena pristupačnost i stručnost su mi olakšali da bez poteškoća napišem svoj diplomski rad. Zahvaljujem joj se na strpljenju i volji koje je uvijek imala za mene i koja je uvijek bila spremna priskočiti mi u pomoć. Zahvalna sam joj na prenesenom znanju koje će mi uvijek biti od koristi.

Posljednjoj, ali ne i manje važnoj, zahvaljujem se svojoj komentorici, doc. dr. sc. Ivani Ratkaj, koja je pristala na suradnju i olakšala mi posljednje korake na putu do diplome.

Hvala Vam za sve!

SAŽETAK

Karcinomi su skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici te posljedično i po načinu liječenja. Progresivno povećanje nekontrolirane stanične diobe razlog je što se karcinom klinički najčešće očituje kao nakupina velikog broja zloćudno preobraženih stanica. Karcinom je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu, a odgovoran je za 9,6 milijuna smrtnih slučajeva u 2018. godini. Karcinom mokraćnog mjehura je deveti najčešći oblik maligniteta i 13. najčešći uzrok smrti od karcinoma diljem svijeta. Rak dojke najčešći je tumor u žena u razvijenim zemljama svijeta. Godišnje u Hrvatskoj oboli oko 2600 žena zbog čega smo u skupini zemalja s visokom incidencijom. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati citotoksično djelovanje kapara (*Capparis spinosa* L.) na staničnim linijama humanog karcinoma dojke (MDA-MB-231) i karcinoma mokraćnog mjehura (T24). Pretpostavka je kako će se broj karcinomskih stanica smanjiti, posljedično izlaganjem stanica ekstraktu kapare koji je dobiven različitim metodama izolacije, u odnosu na kontrolnu skupinu. MTT testom je ispitano citotoksično djelovanje na staničnim linijama MDA-MB-231 i T24. Postotak preživljenja karcinomskih stanica dobili smo uspoređivanjem apsorbancije formazana kod stanica tretiranih ekstraktom *C. spinosa* dobivenim različitim metodama izolacije i apsorbancije netretiranih stanica. Vremena inkubacije za test citotoksičnosti bila su 4, 24, 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani grafički, gdje je prikazana ovisnost vremena inkubacije i postotka metaboličkih aktivnih stanica. Citotoksično djelovanje kapare na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 značajan je pri koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najveći citotoksični učinak imala je kapara s Brača čiji je ekstrakt dobiven mikrovalnom destilacijom pri koncentraciji 50 µg/mL u vremenu inkubacije od 72 sata. Najznačajniji citotoksični učinci ekstrakta kapare na karcinom dojke bili su vidljivi pri većim koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najznačajniji

učinak na staničnu liniju MDA-MB-231 ostvaren je s kaparom s Brača čiji je ekstrakt dobiven mikrovalnom ekstrakcijom pri koncentraciji 10 µg/mL u vremenu 72 h inkubacije. *In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) ekstraktima kapare (*Capparis spinosa* L.) izoliranih različitim metodama izolacije dovodi do smanjenog preživljenja karcinomskih stanica. Ispitivani ekstrakti kapare ostvaruju citotoksičan učinak koji ovisi o koncentraciji i vremenu inkubacije. Citotoksični učinak kapara (*Capparis spinosa* L.) je potvrđen, što je ujedno i hipoteza ovog rada. S obzirom na dobivene rezultate citotoksičnog učinka kapara na MDA-MB-231 i T24 stanične linije, bilo bi od velikog interesa nastaviti istraživanja ovih biljaka na karcinome u *in vivo* pokusima, kako bi pokazala eventualna korisnost ovih biljaka u liječenju karcinoma.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2016-06-1316.

Ključne riječi: kapara, *Capparis spinosa* L., karcinom dojke, karcinom mokraćnog mjehura, citotoksičnost, MTT test

SUMMARY

Cancers are a set of different diseases that differ from each other in their etiology, biology and clinical picture, and consequently in the method of treatment. Cancer is most often clinically manifested as a cluster of a large number of malignant transformed cells whose number is progressively increasing due to uncontrolled cell division. Cancer is the second leading cause of death in the world, and is responsible for 9.6 million of deaths in 2018. Bladder cancer is the 9th most common form of malignancy and the 13th most common cause of death from cancer worldwide. Breast cancer is the most common tumor in women in the developed countries of the world. In Croatia, it is also in first place in terms of incidence, because about 2,600 women get sick in Croatia every year. The aim of this thesis is to examine the cytotoxic effect of capers (*Capparis spinosa* L.) on human breast cancer cell line (MDA-MB-231) and bladder cancer cell line (T24). It is assumed that the number of cancer cells will decrease, consequently by exposing the cells to capers extract obtained by different isolation methods, relative to the control group. The MTT test was performed by a cytotoxic assay on MDA-MB-231 and T24 cell lines. The survival rate of cancer cells was obtained by comparing the absorbance of formazan in cells treated with *C. spinosa* extract obtained by different methods of isolation and the absorbance of untreated cells. Incubation times for the cytotoxicity test were 4, 24, 48, and 72 hours. The presentation of the results is graphical where the dependence of the incubation time and the percentage of metabolically active cells is shown. The cytotoxic effect of capers on T24 bladder cancer cells is significant at concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL. The greatest cytotoxic effect was exerted by a capers from Brač whose extract was obtained by microwave distillation at a concentration of 50 µg/mL during an incubation time of 72 hours. The most significant cytotoxic effects of caper extract on breast cancer were seen at higher

concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL. The most significant effect on MDA-MB-231 cell line was achieved with a caper from Brač whose extract was obtained by microwave extraction at a concentration of 10 µg/mL during the 72h incubation period. *In vitro* exposure of breast cancer cells (MDA-MB-231) and bladder cancer cells (T24) to caper extracts (*Capparis spinosa* L.) isolated by various isolation methods leads to reduced cancer cell survival. The tested caper extracts achieve a cytotoxic effect that depends on the concentration and incubation time. The cytotoxic effect of caper (*Capparis spinosa* L.) has been confirmed, which is also the hypothesis of this paper. Since there is no such study, i.e. the cytotoxic effect of capers on MDA-MB-231 and T24 cell lines, it would be good to repeat the experiment to confirm the results and, if necessary, upgrade the obtained results.

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

Key words: caper, *Capparis spinosa* L., breast cancer, bladder cancer, cytotoxicity, MTT assay

SADRŽAJ

SAŽETAK	6
SUMMARY	8
1. UVOD	12
1.1. KARCINOM	12
1.1.1. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI	13
1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA	16
1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	16
1.2.2. PATOHISTOLOGIJA	17
1.2.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	20
1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA	22
1.2.5. LIJEČENJE	24
1.3. KARCINOM DOJKE	25
1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	25
1.3.2. PATOHISTOLOGIJA	27
1.3.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	32
1.3.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE	34
1.3.5. LIJEČENJE	36
1.4. KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.)	38
1.4.1. FITOKEMIJSKA SVOJSTVA KAPARE	40
1.4.2. FARMAKOLOŠKI UČINCI KAPARE	43
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	45
3. MATERIJALI I METODE	46
3.1. STANIČNE LINIJE	46
3.1.1. POSTUPAK	47
3.2. UZORCI	48
3.2.1. METODE IZOLACIJE	49
3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI	53
3.4. STATISTIČKA ANALIZA	54
4. REZULTATI	55
4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – STANIČNA LINIJA T24	55

4.1.1.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) IZ SPLITA IZOLIRAN MIKROVALNOM DESTILACIJOM	55
4.1.2.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) IZ SPLITA IZOLIRAN MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM	56
4.1.3.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) S BRAČA IZOLIRAN PO CLEVENGERU	57
4.1.4.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) S BRAČA IZOLIRAN MIKROVALNOM DESTILACIJOM	58
4.1.5.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) S BRAČA IZOLIRAN MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM	59
4.2.	KARCINOM DOJKE – STANIČNA LINIJA MDA-MB-231	60
4.2.1.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) IZ SPLITA IZOLIRAN MIKROVALNOM DESTILACIJOM	60
4.2.2.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) IZ SPLITA IZOLIRAN MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM	61
4.2.3.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) S BRAČA IZOLIRAN PO CLEVENGERU	62
4.2.4.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) S BRAČA IZOLIRAN MIKROVALNOM DESTILACIJOM	63
4.2.5.	EKSTRAKT KAPARE (<i>Capparis spinosa</i> L.) S BRAČA IZOLIRAN MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM	64
5.	RASPRAVA	65
6.	ZAKLJUČAK	71
7.	LITERATURA	72
8.	ŽIVOTOPIS	76

1. UVOD

1.1. KARCINOM

Karcinomi su skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici te posljedično i po načinu liječenja. Tumorigeneza je proces koji je zajednički svim vrstama karcinoma jer nastaju od zdravih stanica organizma. Određene promjene uzrokuju gubitak sposobnosti odgovora na brojne signale kojima se njezino ponašanje neprestano usklađuje sa zahtjevima organizma. Posljedica toga je nekontrolirana dioba zloćudno preobraženih stanica kojom nastaje nakupina stanica zvanih karcinom (1). Stanice karcinoma, u odnosu na normalne stanice, ne reagiraju na adekvatan način na signale koji kontroliraju ponašanje normalnih stanica već se nekontrolirano dijele, rastu i šire u normalna tkiva i organe te po čitavom tijelu (2).

Obilježja zajednička svim tipovima karcinoma su: samodostatnost s obzirom na signale rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, zaobilazanje programirane stanične smrti odnosno apoptoze, neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza, sposobnost tkivne invazije i presađivanja, poremećaj metabolizma, sposobnost izbjegavanja imunskog odgovora, genomska nestabilnost te upala (1).

Progresivno povećanje nekontrolirane stanične diobe razlog je što se karcinom klinički najčešće očituje kao nakupina velikog broja zloćudno preobraženih stanica. Međutim, različiti dokazi upućuju na to kako je karcinom monoklonalnog podrijetla, što znači da nastaje zloćudnom pretvorbom samo jedne zdrave stanice. Budući da se odvija u više koraka, sam je proces

nastanka karcinoma od zdravih stanica složen i dugotrajan, a naziva se tumorska progresija (1).

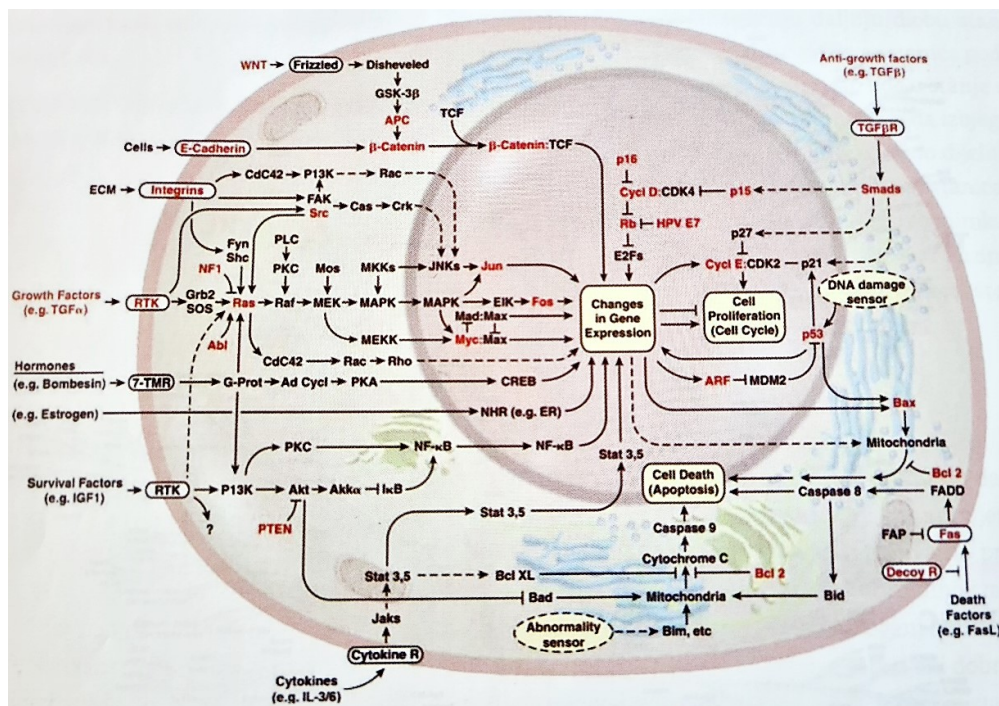
Karcinom nastaje pretvorbom normalnih stanica u tumorske stanice u procesu s više koraka koji općenito napreduje od pretkancerozne lezije do zloćudnog tumora. Takve promjene rezultat su međudjelovanja između genetskih čimbenika i tri kategorije vanjskih uzročnika koji uključuju fizikalne kancerogene tvari, poput ultraljubičastog i ionizirajućeg zračenja, kemijske kancerogene tvari, kao što su azbest, komponente duhanskog dima, aflatoksin (onečišćenje hrane) i arsen (zagađivač pitke vode) te biološki kancerogeni, poput infekcija određenim virusima, bakterijama ili parazitima (3).

Karcinom je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu, a odgovoran je za 9,6 milijuna smrtnih slučajeva u 2018. godini. Dakle, jedna od šest smrti u svijetu posljedica je karcinoma. Otprilike 70% smrtnih slučajeva od raka dogodi se u nisko i srednjerazvijenim zemljama (3). Karcinom predstavlja ozbiljan javnozdravstveni problem i u Hrvatskoj. Drugi je po uzroku smrti iza bolesti krvnih žila i srca. Registar za rak Republike Hrvatske, populacijski registar pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, prati i proučava incidenciju raka u Hrvatskoj (4).

1.1.1. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI

Prvi geni za koje je dokazana ključna uloga u nastanku karcinoma su onkogeni. Promijenjena su inačica normalnih staničnih gena nazvanih protoonkogenima, a sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije. Protoonkogeni sudjeluju u prijenosu signala u stanici i evolucijski su dobro očuvani, što ukazuje na nezamjenjivu ulogu u staničnim procesima. Diferencijacija i preživljenje te stanični rast i dioba usklađuju se s uvjetima u okolišu stanice preko puteva prijenosa signala u stanici. Signali

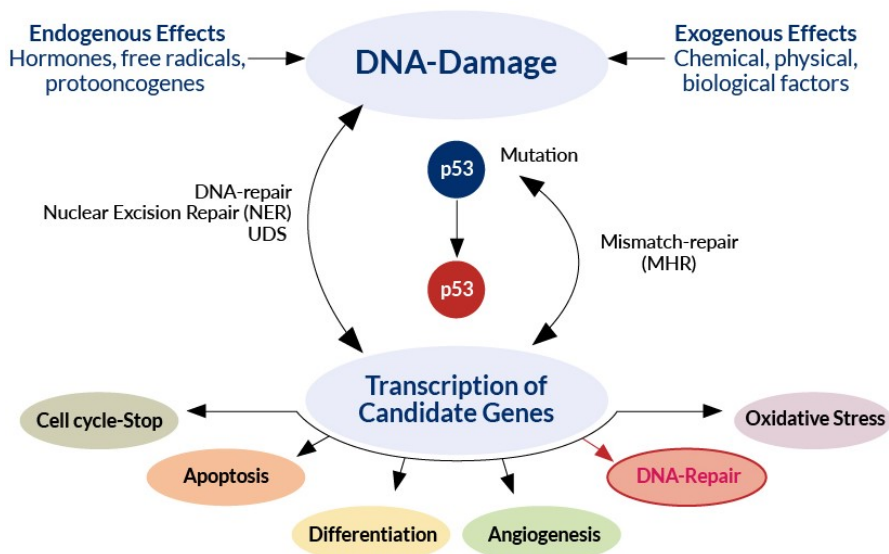
koje stanica prima često su u obliku malih molekula koje se nazivaju čimbenici rasta, a najčešće se vežu za receptore na staničnoj membrani. Na taj način dolazi do aktivacije i prijenosa signala preko mnogobrojnih molekula u stanici sve do transkripcijskih čimbenika koji induciraju ekspresiju pojedinih gena. Putevi prijenosa signala u stanici su vrlo složeni (Slika 1). Onkogeni nastaju pretvorbom protoonkogenata u aktivniji oblik njih samih ili njihovih proteinskih produkata. Taj proces se naziva aktivacija onkogenata. Posljedice aktivacije onkogenata su nekontrolirani rast i dioba stanice, a to neupitno dovodi do nastanka karcinoma. Za učinak onkogenata nužna je promjena u samo jednom alelu. Proteinski produkti onkogenata nazivaju se onkoproteinima. Mutacija u samom genu uzrokuje aktivaciju onkogenata (kod onkogenata *RAS*). Drugi način aktivacije onkogenata je genska amplifikacija odnosno povećanje broja kopija gena (kod onkogenata *ERBB2*, poznat kao *HER2/neu*, kod raka dojke). Još se mogu aktivirati kromosomskom translokacijom pri čemu se dio kromosoma premješta na drugi kromosom (5).



Slika 1. Putevi prijenosa signala u stanici povezani s rakom. Vidi se kako su geni povezani s nastankom raka uključeni u različite korake brojnih međusobno

povezanih puteva prijenosa signala koji su važni za regulaciju niza staničnih procesa kao što su apoptoza, stanični ciklusi i dr. Crvenom bojom označeni su geni za koje je pokazana promjena u stanicama raka. Slika preuzeta iz (6).

Za razliku od onkogeni, čija pojačana aktivnost vodi nastanku karcinoma, tumorsupresorski geni koji gubitkom ili inaktivacijom njih samih tj. njihovih proteinskih produkata potiču nastajanje karcinoma. Tumorsupresorski geni imaju različite uloge u stanici, a njihove mutacije obično imaju recesivni učinak, što znači da je za očitovanje njihova učinka inaktivacija obaju alela nužna. Inaktivacija tumorsupresorskih gena, osim mutacijom, može se dogoditi i epigenetički te metilacijom njihovih promotora. Najpoznatiji tumorsupresorski gen je *P53* koji je nerijetko mutiran kod ljudi s različitim tipovima karcinoma. Oštećena stanična DNA ili drugi poremećaji koji su povezani sa staničnim stresom, aktiviraju proteinski produkt gena *P53*, transkripcijski čimbenik p53 (Slika 2). Zaustavljanje stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivacija popravka oštećene DNA dva su osnovna načina djelovanja aktiviranog p53. Mogućnost pretvorbe stanice u svoju zloćudnu inačicu povećana je zbog oštećene stanične DNA. Prije nego se oštećena DNA replicira, moguć je popravak oštećene DNA uz pomoć p53 koji zaustavlja prolazak stanice kroz stanični ciklus. Djelovanjem tog istog proteina, stanica ulazi u apoptozu i umire ukoliko oštećenja nije moguće popraviti. Na takav način, uklanjanjem stanice, sprječava se potencijalni razvoj karcinoma. Inaktivacijom ili nedostatkom gena *P53*, u diobu ulaze stanice s oštećenom DNA povećavajući vjerojatnost nastanka raka. Inaktivacija p53 u stanicama karcinoma povezana je i s tumorskom angiogenezaom te rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju. Zbog mutacija u spomenutom genu ili mutacija u ostalim onkogenima tj. tumorsupresorskim genima, za nastajanje karcinoma ključno je narušavanje mehanizma apoptoze (5).



Slika 2. Osnovni mehanizam razvoja raka. Slika preuzeta iz (7).

1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom mokraćnog mjehura je na devetom mjestu kao najčešći oblik raka, a na 13. kao najčešći uzrok smrti od karcinoma diljem svijeta (8). Incidencija raka mokraćnog mjehura iznosi 19,8/100000. Godine 2018. zabilježeno je 1005 slučajeva u Republici Hrvatskoj. Rak prijelaznog epitela 3,5 puta je češći kod muškaraca. Prosječna dob bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura u svijetu je 73 godine (9). U razvijenim zemljama u većini slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura najčešći tip je rak prijelaznog epitela dok je u zemljama u razvoju to rak pločastih stanica (10).

Do 80% slučajeva raka mokraćnog mjehura povezano je s izlaganjem određenim faktorima okoliša. Korištenje duhanskih proizvoda daleko je najčešći uzrok karcinoma mokraćnog mjehura, a trajanje i intenzitet pušenja izravno povećavaju rizik. Pušači imaju dva do šest puta veći rizik nego

nepušači. Ovaj rizik ne ovisi o spolu. Povećanom riziku od karcinoma mokraćnog mjehura pridonosi izloženost štetnim tvarima kod velikog broja različitih zanimanja. Incidencija je najizraženija kod radnika koji su izloženi aromatskim aminima, dok je smrtnost najveća kod onih koji su izloženi policikličkim aromatskim ugljikovodicima i teškim metalima. Također, brojna zanimanja koja su povezana s dizelskim ispušnim plinovima, naftnim proizvodima i otapalima imaju povećan rizik, a slično je i s osobama koje rade s organskim kemikalijama i bojama. Nekoliko medicinskih čimbenika rizika je povezano s povećanim rizikom od raka, a neki od njih su zračenje zdjelice, kemoterapija ciklofosfamidom i shistosomijaza (uzrokovana parazitom *Schistosoma haematobium* koji je odgovoran za većinu slučajeva karcinoma pločastih stanica u zemljama u razvoju). Iako se čini kako neki uobičajeni genetski polimorfizmi povećavaju osjetljivost kod profesionalno izloženih osoba, utjecaj nasljednog faktora nije znanstveno dokazan. No, evidentirane su skupine sličnih slučajeva ovog karcinoma (10).

1.2.2. PATOHISTOLOGIJA

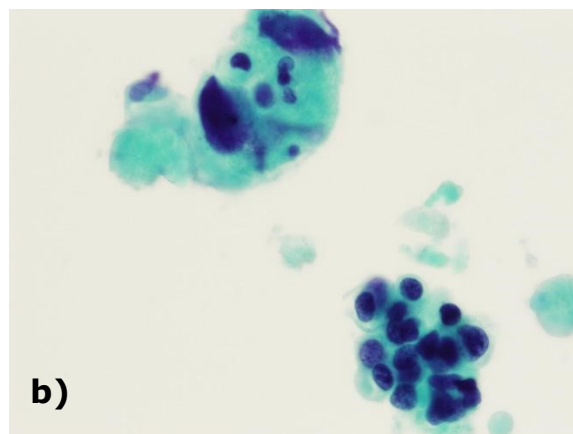
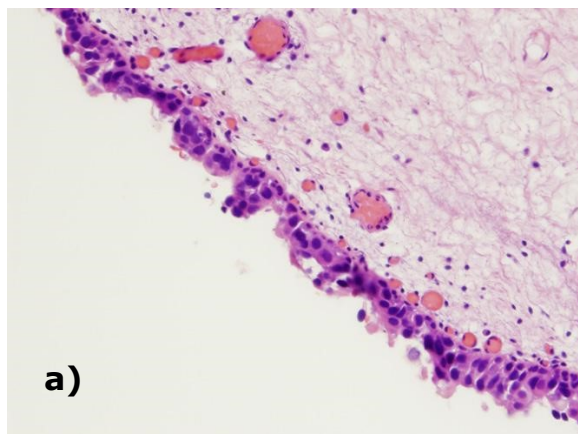
Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization-WHO*), karcinom mokraćnog mjehura se klasificira kao niski stupanj (1. i 2. stupanj) ili visoki stupanj (3. stupanj). Karcinomi su također klasificirani prema obrascima rasta: papilarni (70%), sjedeći ili miješani (20%) i nodularni (10%) (10).

Tri su vrste karcinoma mokraćnog mjehura koji počinju u stanicama sluznice mokraćnog mjehura. Imenovani su prema vrsti stanica koje postaju zloćudne: karcinom prijelaznog epitela (niskog i visokog stupnja), karcinom pločastih stanica i adenokarcinom (11).

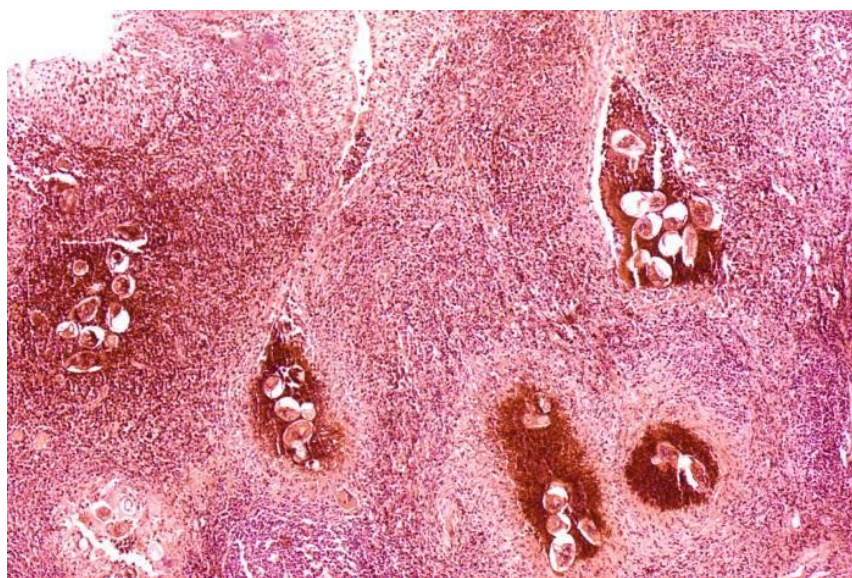
Karcinom prijelaznog epitela odnosno urotelni karcinom nastaje iz stanica prijelaznog epitela. Ovisno o genetskim promjenama koje se događaju, ove stanice mogu slijediti različite puteve u izrazu svog fenotipa, odnosno mogu biti izražene kao karcinom prijelaznog epitela niskog ili visokog stupnja. Najčešći molekularni biološki put za nastanak karcinoma visokog stupnja (Slika 3a i 3b) uključuje razvoj papilarnog tumora koji prolazi kroz lumen mokraćnog mjehura i ako se ne liječi, prodire u bazalnu membranu i dolazi do mišićnog tkiva kroz *laminu propriu*, odakle može metastazirati. Karcinom niskog stupnja je neinvazivan i rijetko se širi u okolno tkivo (10).

Karcinom pločastih stanica mokraćnog mjehura je zloćudna novotvorina koja potječe od prijelaznih stanica epitela mokraćnog mjehura. Ovaj tip karcinoma mokraćnog mjehura je sličan karcinomima pločastih stanica koji nastaju u drugim organima. Dijagnoza ove vrste karcinoma može biti postavljena samo ako je karcinom sastavljen isključivo od pločastih stanica, bez uobičajenih komponenti stanica prijelaznog epitela mokraćnog mjehura. Karcinom pločastih stanica ima manju sklonost nodalnim i vaskularnim metastazama (10). Povezan je s dugotrajnom upalom često uzrokovanom dugotrajnom upotrebom katetera ili prisutnošću kamenaca u mokraćnom mjehuru i infekcijama kao što je shistosomijaza (Slika 4) (2).

Adenokarcinom započinje u žljezdanim (sekretornim) stanicama koje su locirane u sluznici mokraćnog mjehura. Najmanje je zastupljena vrsta karcinoma mokraćnog mjehura (11).



Slika 3. Visoki stupanj raka prijelaznog epitela mokraćnog mjehura. **a)** Velika snaga, Pap mrlja koja pokazuje visoki stupanj urotelijalnog raka na citologiji ispiranja mjehura. **b)** Visoka snaga, H&E mrlja visokog stupnja urotelijalnog raka. Ovaj tumor je sada invazivan u muscularis propria (glatki mišić se vidi u centru slike). Slika preuzeta iz (10).



Slika 4. Rak pločastih stanica mokraćnog mjehura. Histopatologija mokraćnog mjehura pokazuje jajašca *Schistosoma haematobium* okružena intenzivnim infiltratima eozinofila i drugih upalnih stanica. Slika preuzeta iz (10).

1.2.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Kod 90% bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura pojavljuje se bezbolna hematurija, mikroskopska ili makroskopska. Značajan simptom je i učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili simptoma urinarne infekcije. Hidronefroza, opstipacija, limfedem i palpabilna masa u maloj zdjelici znakovi su lokalnog širenja. Pri uznapredovaloj fazi bolesti očekivana je pojava simptoma povezanih s lokacijama metastaza. Trbušni limfni čvorovi, jetra, pluća i kosti mjesta su gdje urotelni rak obično metastazira. (9).

Početna procjena bolesnika sa sumnjom na karcinom mokraćnog mjehura oslanja se na cistoskopiju, procjenu bubrežne funkcije i snimanje gornjih mokraćovoda, po mogućnosti pomoću računalne tomografije (engl. *Computed tomography-CT*) urografije (12). Dijagnostika karcinoma mokraćnog mjehura podrazumijeva sljedeće pretrage urina: biokemijska analiza urina, mikrobiološka analiza urina kako bi se isključila sumnja na infekciju, citologija urina i testiranje urina na tumorske markere (10).

Potrebno je napraviti laboratorijske testove kako bi se procijenila oštećenja bubrega u svih bolesnika za koje se sumnja da boluju od karcinoma mokraćnog mjehura. Potrebno je dobiti informacije o razini ureje i kreatinina u serumu. Pri sumnji na metastatsku bolest, prikladno je napraviti kompletnu krvnu sliku i kompletni metabolički panel, uključujući razinu alkalne fosfataze te jetrenih enzima (12).

Citologija urina je pretraga koja se koristi za uspostavljanje dijagnoze karcinoma mokraćnog mjehura. Svi bolesnici s bezbolnom i mikroskopskom hematurijom trebaju se podvrgnuti cistoskopiji i urinarnoj citologiji. Citologija urina najviše pomaže u dijagnosticiranju tumora i raka visoke razine *in situ* (CIS). Endoskopska biopsija koristi se za postavljanje dijagnoze i utvrđivanje opsega karcinoma. Dokazano je da imunocitologija nadmašuje citologiju urina

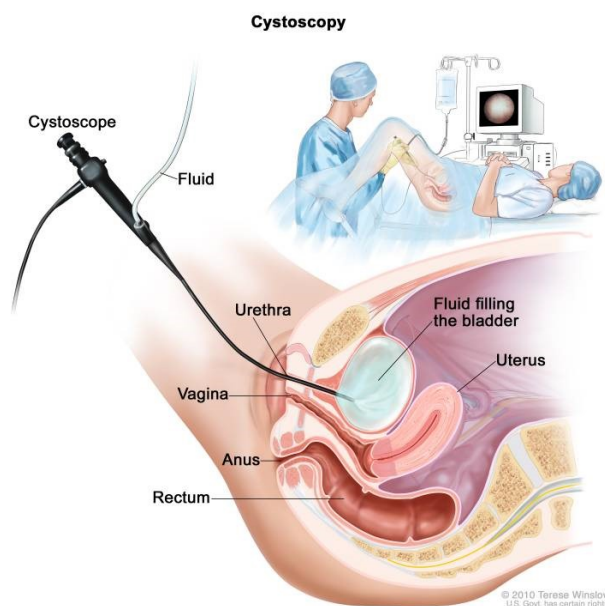
i povećava točnost prediktivnih modela statistički i klinički značajnom razlikom za pacijente s bezbolnom hematurijom (13).

Cistoskopija (Slika 5) se mora obaviti u svih bolesnika s bezbolnom i mikroskopskom hematurijom. Bolesnike s hematurijom i elementima rizika za karcinom mokraćnog mjehura treba podvrgnuti cistoskopiji bez obzira na dob (12). Invazivna je i relativno skupa pretraga, a vidljivost može biti smanjena zbog krvarenja. Citološka analiza izgubljenog urina često se koristi kao pomoćni test koji pomaže u identifikaciji okultnog karcinoma (13). Za bolesnike s abnormalnim nalazima citološkog ispiranja mjehura ili patologije tkiva preporučuje se transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura (TUR). Tim se postupkom dobivaju histopatološke informacije nužne za konačnu dijagnozu, postavljanje i stupnjevanje. Ovaj postupak omogućuje uklanjanje vidljivog tumora i uzorkovanje okolnog mišića radi procjene dubine (12).

Slikovne pretrage gornjih mokraćnih puteva sastavni su dio obrade hematurije. Preporučuje se učiniti CT trbuha i zdjelice s kontrastom (13). Ova metoda ima najveću osjetljivost (95%) i specifičnost (92%) od svih pretraga gornjih mokraćnih puteva, a može procijeniti uroteliju gornjeg trakta kao i otkriti bubrežne novotvorine (12). Dvije najčešće korištene alternativne tehnike su magnetska rezonanca (MRI) i bubrežna ultrasonografija. Nedostatak je što se sitni tumori lako propuštaju na slikama dobivenim CT-om i MRI-om. CIS nije vidljiv na slikama niti jedne trenutne radiografske studije (13).

Noviji molekularni i genetski markeri, uključujući detekciju mutacija u genima RAS, FGFR3, PIK3CA i TP53, i putevi metilacije u mokraćnom sedimentu mogu pripomoći ranoj detekciji i predviđanju urotelnog karcinoma. U ovom trenutku nije pokazan niti jedan urinarni test koji bi učinkovito zamijenio citologiju urina i cistoskopiju, s ili bez biopsije, u slučaju dijagnosticiranja karcinoma

mokraćnog mjehura. Ipak, marker testovi mogu biti korisni dodaci citologije urina i cistoskopiji (13).



Slika 5. Cistoskopija. Cistoskop (tanak instrument sličan cijevi sa svjetlom i lećom za gledanje) ubacuje se kroz uretru u mjehur. Tekućina se koristi za punjenje mjehura. Liječnik pregledava sliku unutarnje stijenke mokraćnog mjehura na monitoru računala. Slika preuzeta iz (11).

1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Prognoza bolesnika i odabir odgovarajuće terapije iziskuju što precizniju procjenu proširenosti bolesti. Izražava se TNM klasifikacijom (Tablica 1) Američkog udruženja za rak (9).

Tablica 1. TNM klasifikacija mokraćnog mjehura. Tablica preuzeta iz (14).

Primarni tumor (T)	
Tx	Primarni se tumor ne može opisati
T0	Nema dokaza primarnog tumora
Ta	Neinvazivni papilarni karcinom
Tis	Karcinom <i>in situ</i> : 'flat tumor'
T1	Tumor invadira subepitelno vezivno tkivo
T2	Tumor invadira mišićni sloj
T2a	Tumor invadira površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)
T2b	Tumor invadira duboki mišićni sloj (vanjska polovica)
T3	Tumor invadira perivezikalno tkivo
T3a	Mikroskopska invazija perivezikalnog tkiva
T3b	Makroskopska invazija perivezikalnog tkiva
T4	Tumor invadira jedno od navedenog: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina, zdjelična stijenka, trbušna stijenka
T4a	Tumor invadira jedno od navedenog: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina
T4b	Tumor invadira zdjeličnu stijenku, trbušnu stijenku
Limfni čvorovi (N)	
Tx	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
Udaljene metastaze (M)	
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze

1.2.5. LIJEČENJE

Stupanj proširenosti bolesti temelj je za liječenje, stoga se razlikuje pristup neinvazivno (površinskom) i mišićno-invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti (9). Postupci unutar svake kategorije uključuju kirurški i medicinski pristup. Smjernice Europskog urološkog društva (engl. *European Association of Urology - EAU*) i Nacionalne sveobuhvatne mreže raka (engl. *National Comprehensive Cancer Network - NCCN*) za neinvazivni mišićni karcinom preporučuju stratificiranje rizika od recidiva i progresije te korištenje tablica rizika za određivanje odgovarajućeg liječenja. Dva glavna načina liječenja mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura su radikalna cistektomija i transuretralna endoskopska resekcija (TUR), praćena istodobnom terapijom zračenja i sistemskom kemoterapijom (trimodalna terapija) (12).

U liječenju visokorizičnog Ta, T1 i CIS urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura koristi se imunoterapija BCG-om (fran. *Bacillus Calmette-Guérin*). Takvo liječenje najučinkovitije je za CIS i T1 tumore, a manje je učinkovito u smanjenju recidiva za niske stupnjeve i niske stadije urotelnog karcinoma. Interferon alfa ili gama korišteni su u liječenju Ta, T1 i CIS urotelnog karcinoma, bilo kao terapija pojedinačnim lijekovima ili u kombinaciji s BCG-om. Njegova uloga prvenstveno je bila u liječenju nakon neuspjeha s BCG-om. Svaki pacijent koji ima trajnu ili ponavljajuću bolest nakon BCG terapije treba razmotriti radikalnu cistektomiju, s obzirom na visoku stopu napredovanja bolesti. Endoskopski TUR prvo je sredstvo za dijagnosticiranje, postavljanje i liječenje vidljivih tumora. Elektrokauterizacija ili laserska fulguracija tumora mokraćnog mjehura dovoljna je za tumore niskog stupnja, malog volumena i papilarne tumore. Bolesnici s velikim, visoko-gradusnim ili multifokalnim tumorima trebaju proći postupak TUR-a dva puta kako bi se osigurala potpuna resekcija i precizna faza liječenja dva do šest tjedana nakon početnog TUR-a. Iako je radikalna cistektomija obično preporučena za

mišićno-invazivnu bolest, također se koristi za liječenje nekih pacijenata s visokorizičnim karcinomom mokraćnog mjehura, uključujući CIS (12).

Radikalna cistektomija temeljni je oblik liječenja invazivnog raka mokraćnog mjehura (T2-T4). Kod muškaraca može se odstraniti mokraćni mjehur, prostata, sjemeni mjehurići i dio uretre, a kod žena maternica, prednja stijenka vagine i uretra. Neoadjuvantna kemoterapija koja se temelji na cisplatini, postala je standard liječenja kod mišićno invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura. Davanje kemoterapije prije radikalne cistektomije može poboljšati preživljenje (12).

Metotreksat, vinblastin, doksorubicin (Adriamycin) i cisplatina (MVAC) standardna su kombinacija za liječenje metastatskog karcinoma mokraćnog mjehura (12). MVAC ima znatnu toksičnost koja se mora odmjeriti s očekivanom dobrobiti. Glavna toksičnost koja ograničava dozu je mijelosupresija. Nove kombinacije terapija manje su toksične od MVAC, a jednako učinkovite. Gemcitabin u kombinaciji s cisplatinom sada se smatra prvom linijom za liječenje raka mokraćnog mjehura. FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) za napredni urotelni karcinom odobrio je terapiju s PDL1 (ligand 1 programirane stanične smrti) inhibitorima (npr. atezolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab, pembrolizumab). Erdafitinib je prvi inhibitor receptora za faktor rasta fibroblasta (FGFR) (15).

1.3. KARCINOM DOJKE

1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Rak dojke najčešći je tumor u žena u razvijenim zemljama svijeta. Hrvatska u ovom slučaju nije iznimka. Godišnje u Hrvatskoj oboli oko 2600 žena zbog

čega smo u skupini zemalja s visokom incidencijom (dobno standardizirana incidencija iznosi 66/100000 žena). Azijske zemlje imaju nešto nižu stopu učestalosti raka dojke u odnosu na zapadnjačke zemlje. Razvijene zemlje imaju incidenciju od 60 do 100/100000 žena, dok manje razvijene zemlje između 20 i 60/100000 žena (16).

Starija životna dob najznačajniji je faktor rizika za razvoj karcinoma dojke. Rijetko se pojavljuje kod žena mlađih od 20 godina dok u dobi od 80 godina od raka dojke oboli 200-300/100000 žena. Značajni razvoj karcinoma dojke raste u dobi od 35 do 40 godina nakon čega incidencija konstantno raste. Pozitivna obiteljska anamneza kod žena povećava rizik za razvoj karcinoma dojke. Osam puta veći rizik za razvoj karcinoma imaju žene čija prva rodbina (majka ili teta) je oboljela od karcinoma dojke. Tek 10% karcinoma dojke moguće je povezati s obiteljskom sklonošću, odnosno genetičkom predispozicijom. Otkrivena su dva supresorska gena, BRCA1 i BRCA2 (*breast cancer gene 1 i 2*), dovedena u neposrednu vezu s nastankom obiteljskih tumora dojke. Tako žene s mutacijom jednog ili obaju gena imaju puno veću vjerojatnost oboljenja od raka dojke (80%, dok kod normalne populacije ta vjerojatnost iznosi tek 10%). Još jedan faktor rizika za razvoj karcinoma dojke je starija životna dob pri prvom porodu. Četiri puta veći rizik za razvoj karcinoma dojke imaju žene koje su prvi put rodile u dobi od 30-35 godina za razliku od žena koje su prvi porod imale u dobi od 20 do 25 godina. Ostali čimbenici rizika za nastanak raka dojke su rana menarha i kasna menopauza, zračenje, debljina, oralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija, dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke i ako je žena nerotkinja (16).

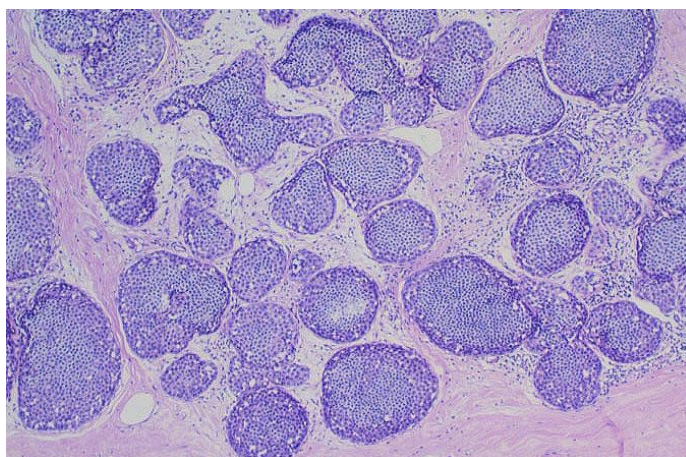
1.3.2. PATOHISTOLOGIJA

Iz žljezdanog parenhima dojke, izvodnih kanalića (duktalni rak) ili žljezdanih lobula (lobularni rak) nastaje karcinom dojke. Dijeli se na *in situ* karcinom (ne probija bazalnu membranu) i invazivni karcinom (tumor koji probija bazalnu membranu). Najčešće dijagnosticirani histološki tipovi karcinoma dojke su invazivni karcinom nespecifičnog tipa (NST) / invazivni duktalni / (70 – 80% svih tumora) i invazivni lobularni karcinom (10 – 15% tumora). Rjeđe su dijagnosticiraju određeni specifični histološki podtipovi raka dojke: tubularni, metaplastični, mucinozni, papilarni, mikropapilarni, karcinom s medularnim karakteristikama. U novije vrijeme, prema imunohistokemijskim i genskim obilježjima, tumor dojke dijeli se na luminalne tumore tipa A (visoka razina estrogenskih i progesteronskih receptora, Ki-67 manji od 20%, HER2 negativnost) i B (razina progesteronskih receptora niža od 20% ili Ki-67 viši od 20%, ili HER2 pozitivnost), HER2 pozitivne i trostruko negativne (nije prisutna pozitivnost na HER2 te receptore estrogena i progesterona). U patohistološkom opisu raka dojke moraju se navesti veličina tumora u dvije dimenzije, stupanj zloćudnosti raka dojke (niski, srednji i visoki), proliferativna aktivnost ili mitotički indeks kroz Ki-67 indeks (udio stanica u mitози), status (pozitivnost) hormonskih receptora (estrogenskih i progesteronskih), status HER2 receptora, odnos tumora prema reznim rubovima kirurškog zahvata (je li tumor u cijelosti uklonjen), broj preglednih i pozitivnih limfnih čvorova aksile te odnos tumora prema krvnim i limfnim žilama (invadira li ih, postoje li tumorski trombi u krvnim i/ili limfnim žilama) (16).

Duktalni karcinom *in situ* (DCIS) je neinvazivni karcinom dojke koji je ograničen na unutrašnjost kanala dojke. DCIS se kategorizira niskim stupnjem (stupanj I), srednjim (II stupanj) ili visokim stupnjem (III stupanj). Stanice DCIS-a niskog i srednjeg stupnja rastu relativno sporom brzinom. Stanice

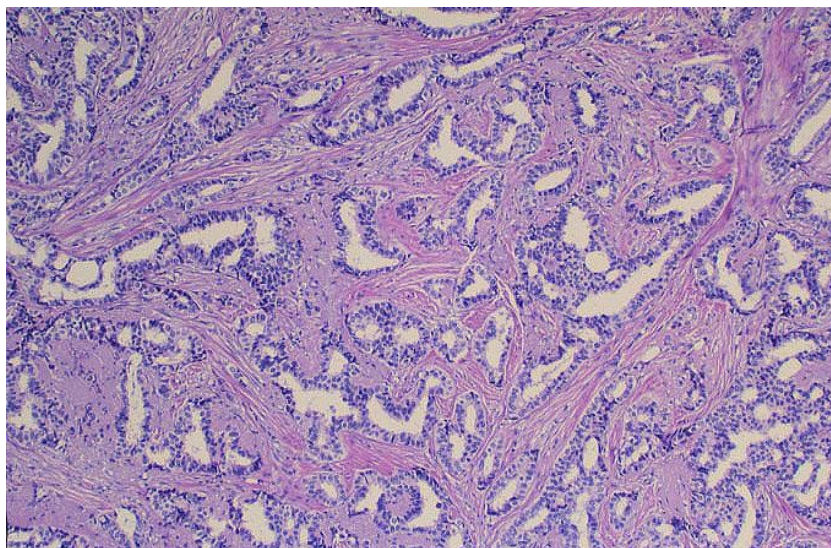
niskog stupnja DCIS-a izgledaju poput normalnih stanica dojke ili atipičnih duktalnih hiperplazija. DCIS stanice stupnja II rastu brže u odnosu na normalne stanice. DCIS stanice visokog stupnja, stupnja III, rastu brzo i imaju najveći rizik od napredovanja ka invazivnom karcinomu (17).

Lobularni karcinom *in situ* (LCIS), koji se ne smatra zloćudnim, nastaje iz lobula na terminalnom kraju kanala i pokazuje prilično difuznu raspodjelu po dojci, što objašnjava njegovo prikazivanje kao nepalpabilnu masu u većini slučajeva (Slika 6) (17).



Slika 6. Rak dojke. Lobularni karcinom *in situ*. Povećanje i širenje lobule monotonom populacijom neoplastičnih stanica. Slika preuzeta iz (17).

Invazivni duktalni karcinom (DCIS) najčešće je dijagnosticiran karcinom dojke i ima tendenciju metastaziranja limfom. Ova lezija, na koju otpada 75% karcinoma dojke, nema posebnih histoloških karakteristika osim invazije kroz bazalnu membranu dojke (Slika 7) (17).



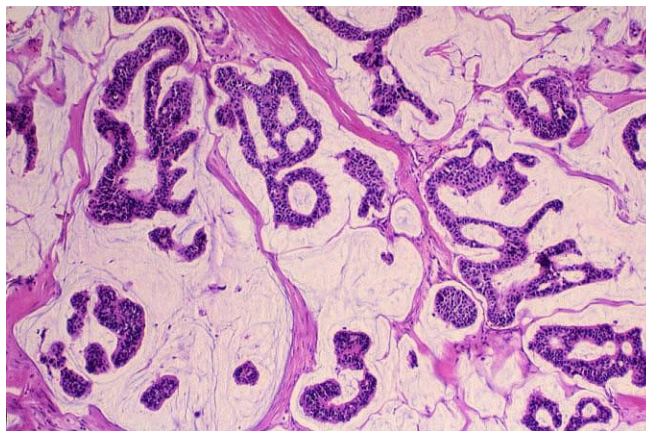
Slika 7. Rak dojke, infiltrirajući duktalni karcinom. Karcinom niskog stupnja s dobro razvijenim žlijezdama koje prodiru u vlaknastu stromu. Slika preuzeta iz (17).

Invazivni lobularni karcinom ima puno nižu incidenciju od infiltracijskog duktalnog karcinoma. Karakteriziran je histološki kao male tumorske stanice. Poput duktalnog karcinoma, infiltracijski lobularni karcinom obično prvo metastazira u aksilarne limfne čvorove (17).

Medularni karcinomi obično se pojavljuju u mlađoj populaciji žena koje imaju mutacije gena BRCA1. U većine pacijenata prisutna je glomazna opipljiva masa s aksilarnom limfadenopatijom (17).

Mucinozni (koloidni) karcinom je još jedan rijedak histološki tip, zabilježen u manje od 5% slučajeva invazivnog karcinoma dojke. Obično se predstavlja kao opipljiva masa ili se mamografski pojavljuje kao slabo definiran tumor s rijetkim kalcifikacijama. Proizvodnja mucina je histološki znak. Javljaju se dva glavna oblika, tipa A i B, s AB lezijama koje imaju svojstva oba. Mucinozni karcinom tipa A predstavlja klasičnu raznolikost s većim količinama izvanstaničnog mucina (Slika 8), dok je tip B različita varijanta s endokrinom

diferencijacijom, pri čemu histologija pokazuje više zrnatu citoplazmu nego karcinom tipa A (17).



Slika 8. Koloidni (mucinozni) karcinom. Gnijezda tumorskih stanica u bazenu izvanstaničnog mucina. Slika preuzeta iz (17).

Tubularni karcinom dojke je neuobičajen histološki tip koji čini 1-2% svih karcinoma dojke. Ova vrsta karcinoma dojke ima nisku učestalost zahvaćanja limfnih čvorova i vrlo visoku ukupnu stopu preživljavanja. Zbog povoljne prognoze, pacijenti se često liječe samo operacijom i lokalnom radioterapijom (17).

Papilarni karcinom dojke obuhvaća spektar histoloških podtipova. Postoje dvije uobičajene vrste: cistični (neinvazivni oblik) i mikropapilarni duktalni karcinom (invazivni oblik). Papilarni karcinomi nalaze se centralno u dojci i mogu uzrokovati krvavi iscjedak iz bradavice. Pokazuju pozitivnost na estrogenski (ER) i progesteronski (PR) receptor. Cistični papilarni karcinom ima malu mitotsku aktivnost, što rezultira indolentnijim tokom i dobrom prognozom. Međutim, invazivni mikropapilarni duktalni karcinom ima agresivniji fenotip, iako oko 70% slučajeva pokazuje ER pozitivnost (17).

Metaplastični karcinom dojke (MBC) čini manje od 1% slučajeva karcinoma dojke, obično se javlja kod starijih žena (prosječna dob je šesto desetljeće). Karakterizira ga kombinacija adenokarcinoma plus mezenhimske i epitelne komponente. MBC obuhvaća širok spektar histoloških obrazaca, uključujući sljedeće: vreteno-stanični karcinom, karcinosarkom, pločasti stanični karcinom duktalnog porijekla, adenoskvamozni karcinom, karcinom s pseudosarkomatskom metaplazijom, karcinom koji proizvodi matriks. U usporedbi s infiltrirajućim duktalnim karcinomom, MBC tumori imaju sljedeće karakteristike: veću veličinu, brži rast, obično ER negativan, PR negativan i HER2 negativan (17).

Filodni tumori su rijetki tumori dojke koji čine manje od 1% tumora dojke. Ovi se tumori mogu smatrati benignim, graničnim ili zloćudnim, ovisno o sljedećim histološkim značajkama: stromalna staničnost, infiltracija na rubu tumora, mitotička aktivnost. Maligni filodni tumori se ponašaju poput sarkoma i poznato je da razvijaju hematogene metastaze. Pojava se najčešće javlja kod žena u predmenopauzi, starosti 40 i 50 godina (17).

Pagetova bolest (*Mammary Paget disease - MPD*) relativno je rijetka i čini 1-4% svih karcinoma dojke. Najviša učestalost pojavljuje se u šestom desetljeću života (prosječna dob, 57 godina). Ovaj adenokarcinom lokaliziran je unutar epiderme kompleksa bradavice-areola i sastoji se od histološkog obilježja Pagetovih stanica unutar bazalne membrane. Paget stanice su velike, blijede epitelne stanice s hiperkromatskim, atipičnim jezgrama, dispergiranim između keratinocita pojedinačno ili kao nakupina stanica. Lezije su pretežno jednostrane, razvijaju se kao ljuskasti, ispućali, osipajući ili eritematski bradavičasti areoli. Retrakcija ili ulceracija bradavice često se primjećuje, zajedno sa simptomima svrbeža, peckanja i boli (17).

Upalni karcinom dojke (*Inflammatory Breast Cancer - IBC*) je vrlo agresivan lokalno uznapredovali karcinom dojke. Zbog svoje agresivne prirode, pacijenti

u vrijeme prezentacije često imaju zahvaćanje limfnih čvorova i udaljene metastatske bolesti. IBC karakteriziraju difuzni eritem i edemi (*peau d'orange* – koža ima izgled poput kore naranče) koji uključuju trećinu ili više kože dojke. Klasični histološki nalaz u upalnom karcinomu dojke je dermalna limfna invazija tumorskih stanica na biopsiju zahvaćene dojke. Te zloćudne stanice formiraju tumorske embolije koje su odgovorne za lokalne znakove i za klinički upalne simptome (17).

1.3.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Rano dijagnosticirani karcinomi dojke mogu biti bez simptoma, a bol i nelagoda nerijetko su prisutni. Ako se otkrije zadebljanje ispod kože, sljedeće može ukazivati na mogućnost karcinoma dojke: promjena oblika ili veličine dojke, udubljenje kože ili promjene na koži, nedavna inverzija bradavice ili promjena na koži ili nepravilnosti bradavica, iscjedak iz jednog kanala, posebno ako je krv u pitanju, aksilarna kvrga (18).

Kao i kod ostalih tumora, uspostavljanje dijagnoze karcinoma dojke započinje anamnezom i kliničkim pregledom. Znakovi raka dojke, vrijeme pojave simptoma i duljina njihovog trajanja pokušavaju se definirati anamnestički. Također, potrebno je definirati izloženosti na pojedine faktore rizika (16). Rak dojke često se prvi put otkriva kao abnormalnost na mamogramu prije nego što to osjeti pacijent ili pružatelj zdravstvene zaštite. Procjena karcinoma dojke uključuje sljedeće: klinički pregled, snimanje i biopsiju iglom. Rano otkrivanje ostaje primarna obrana u prevenciji raka dojke. Modeli uspostavljanja dijagnoze raka dojke su: samopregled dojke, klinički pregled dojke, mamografija, ultrazvuk, MRI. Kombinirana mamografija, klinički pregled i MRI osjetljiviji su od bilo kojeg drugog pojedinačnog testa ili kombinacije ispitivanja (18).

Mamografija je bazirana na rentgenskim zrakama u malim dozama koje se koriste za sliku dojke. To je trenutno najbolja metoda za otkrivanje karcinoma dojke u ranoj fazi. Mamografija se koristi i za *screening*, za otkrivanje raka, kao i za dijagnostičku obradu pacijenta nakon otkrivanja tumora. *Screen* mamografija provodi se kod asimptomatski žena, dok se dijagnostička mamografija izvodi kod simptomatskih žena (tj. kada je prisutan iscjedak iz bradavice ili kada se utvrdi abnormalnost tijekom *screening* mamografije). Mamografija je osjetljiva na mikrokalcifikate koji se razvijaju u tumorima dojke s osjetljivošću manjom od 100 μm . Mamografijom se često otkriju lezije prije nego što ih se opiše kliničkim pregledom dojke i prosječno 1 do 2 godine prije nego što se primijeti samopregledom dojke (19).

Ultrazvuk je postao široko dostupan i koristan dodatak mamografiji. Obično se koristi kao ispomoć u kliničkom ispitivanju sumnjive lezije otkrivene na mamografiji ili fizikalnom pregledu. Ultrazvuk je ograničen nizom čimbenika, od kojih je najpoznatiji njegov neuspjeh u otkrivanju mikrokalcifikata i njegove loše specifičnosti (34%). Međutim, već je dobro utvrđeno da ultrazvuk također daje vrijedne informacije o prirodi i opsegu čvrstih masa i ostalih lezija dojke (19).

U nastojanju za prevladavanje ograničenja mamografije i ultrazvuka, MRI je istražen kao model za otkrivanje karcinoma dojke kod žena visokog rizika i mlađih žena. Nađeno je kako kombinacija T1, T2 i 3-D kontrastno pojačanih MRI tehnika ima visoku osjetljivost (približno 86-100% u kombinaciji s mamografijom i kliničkim pregledom dojke) na zloćudne promjene u dojci (19).

Korištenjem širokog raspona označenih metabolita (npr. fluorirana glukoza [18 FDG]), PET (*positron emission tomography*) može otkriti promjene u metaboličkoj aktivnosti, vaskularizaciji, potrošnji kisika i statusu receptora tumora. Kad se PET kombinira s računalnom tomografijom (CT) radi

pomaganja u anatomske lokalizaciji (PET-CT), skeniranjem se mogu utvrditi aksilarne i neaksilarne metastaze na limfnim čvorovima (19).

Za novodijagnosticiran tumor dojke, preporučuje se dijagnostički pristup pomoću biopsije iglom šireg lumena. Ovaj pristup može umanjiti potrebu za operativnom intervencijom i pružiti preciznu patološku dijagnozu za odgovarajuće liječenje. Ekscizijska biopsija, kao početni operativni pristup, pokazala je da povećava stopu pozitivnih margina (19).

1.3.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE

Nakon definiranja T (procjena primarnog tumora), N (stanje regionalnih čvorova) i M (prisutnost udaljenih metastaza) statusa (Tablica 2), može se definirati stadij bolesti. Različiti stadiji bolesti mogu se definirati prema različitoj vjerojatnosti izlječenja. Viši stadij utječe na manju vjerojatnost izlječenja od raka dojke (16).

Tablica 2. TNM klasifikacija raka dojke i pridruženi stadiji. Tablica preuzeta iz (19).

Tis (DCIS)	Duktalni karcinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Pagetova bolest bradavice nepovezana s invazivnim karcinomom i/ili DCIS u podležućem 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 stijenku 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 (<i>isolated tumour cells</i>)
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 mamarnim limfnim čvorovima, sa ili bez mikroskopske potvrde; s patološki negativnim aksilarni 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 mamarni 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

1.3.5. LIJEČENJE

Cilj liječenja definira se stupnjem proširenosti. Kod proširenog – diseminiranog karcinoma dojke svrha je osigurati maksimalno dug i kvalitetan život, dok je kod lokalnog karcinoma svrha izliječiti bolesnika (16).

Kirurško liječenje invazivnog karcinoma dojke može se sastojati od lumpektomije ili totalne mastektomije. Kod pacijenata s karcinomom dojke koji imaju klinički negativne čvorove, operacija obično uključuje disekciju sentinelnog limfnog čvora (*Sentinel-lymph node - SLN*) radi postavljanja aksile (20). Operacija se smatra primarnim liječenjem raka dojke. Ciljevi podrazumijevaju potpunu resekciju primarnog tumora, s negativnim granicama kako bi se smanjio rizik od lokalnih recidiva, i patološku fazu staničnog tumora i aksilarnih limfnih čvorova kako bi se pružile potrebne prognostičke informacije. Dostupno je nekoliko različitih vrsta operacija (21). Lumpektomija (djelomična ili segmentektomija) definira se kao potpuna kirurška resekcija primarnog tumora s ciljem postizanja široko negativnih margina (u idealnom slučaju 1cm). Može se izvoditi palpacijskim navođenjem ili slikovnim navođenjem i primjenjivo je kod većine bolesnika s invazivnim karcinomom I ili II stupnja. Mastektomija uključuje potpuno uklanjanje dojke (21).

Adjuvantna terapija raka dojke osmišljena je za liječenje mikrometastatske bolesti ili stanica karcinoma dojke koje su pobjegle iz dojke i regionalnih limfnih čvorova, ali još uvijek nisu utvrđene metastaze koje se mogu identificirati (22). Liječenje je usmjereno na smanjenje rizika od budućih recidiva, čime se smanjuje smrtnost od raka dojke. Ovisno o modelu smanjenja rizika, procijenjeno je kako adjuvantna terapija smanjuje smrtnost i to za 35-72% (20). Sredstva koja se koriste u adjuvantnoj sustavnoj terapiji raka dojke su: taksani, antraciklini, pertuzumab, transtuzumab, tamoksifen i aromatazni inhibitori (22).

Svaka bolesnica s karcinomom dojke koja ima pozitivan nalaz na estrogenske ili progesteronske receptore, upućuje se na adjuvantnu hormonsku terapiju (16). Hormonski tretmani djeluju na smanjenje sposobnosti estrogena da stimulira postojeće mikrometastaze ili mirujuće stanice karcinoma. Adjuvantna hormonska terapija može smanjiti relativni rizik od daljnjeg, ipsilateralnog i kontralateralnog recidiva raka dojke do 50% kod tumora s visokom ekspresijom ER. Endokrine terapije odobrene od strane FDA za adjuvantno liječenje raka dojke uključuju tamoksifen i inhibitore aromataze (letrozol, anastrozol i egzemestan). Tamoksifen je selektivni estrogenski receptor modulator (SERM) koji se veže i inhibira signalizaciju estrogenskih receptora u dojci. Tamoksifen ima ER-stimulirajuće djelovanje na ostala tkiva, što ima i korisne i štetne posljedice, u kosti stimulacija rezultira očuvanjem koštane gustoće, a u endometriju dovodi do 2-4 puta povećanog rizika od raka endometrija (22).

Razlog za grupiranje lokalno uznapredovalog karcinoma dojke (*locally advanced breast cancer - LABC*) s upalnim karcinomom dojke (IBC) je taj što obje bolesti imaju malu ili nikakvu šansu za izlječenje od samo lokalne terapije i stoga se smatraju neoperabilnima. Definicija lokalno uznapredovale bolesti sada se proširila i uključuje bolesnike koji su operirani, ali imaju velike primarne tumore (>5 cm). FDA je odobrila pertuzumab za neoadjuvantno

liječenje u kombinaciji s transtuzumabom i docetakselom za pacijente s pozitivnim na HER2, lokalno uznapređovalim, upalnim ili ranom fazom karcinoma dojke (promjerom većim od 2 cm ili pozitivnim čvorovima). Prema smjernicama Američkog društva za kliničku onkologiju (*American Society of Clinical Oncology - ASCO*) zasnovanim na dokazima, lijekovi transtuzumab, pertuzumab i taksan koji reguliraju HER2, trebali bi se koristiti kao terapija prve linije za pacijente s uznapređovalim HER2-pozitivnim karcinomom dojke (osim u bolesnika s kontraindikacijama za taksane). Bolesnici s LABC ili IBC s klinički pozitivnim čvorovima trebaju proći biopsiju sentinelnih limfnih čvorova prije nego što započnu s liječenjem (20).

U liječenju karcinoma dojke u ranom stadiju postiže se znatan napredak, ali mnoge žene i dalje razvijaju metastaze. Pored toga, 5-10% pacijenata s karcinomom dojke ima metastatsku bolest. Iako se liječenje metastatskog karcinoma dojke i dalje poboljšava, još uvijek ne postoji lijek nakon što se razviju udaljene metastaze. Povremeno pacijentice s metastatskim karcinomom dojke imaju koristi od kirurške resekcije za izolirani recidiv. Metastatskom karcinomu dojke mora se pristupiti sistematski, tako da terapijski učinak doseže sva mjesta bolesti. Postoje dvije glavne intervencije: hormonska terapija i kemoterapija (20).

Za liječenje trostruko negativnih tumora (jedina opcija) te za sve ostale tumore primjenjuje se kemoterapija (16).

1.4. KAPARE (*Capparis spinosa* L.)

Ljekovite biljke su se koristile kao terapijska sredstva za liječenje raznih bolesti od davnina. Kao takve, imaju efekt za promicanje zdravlja te sadrže bioaktivne komponente. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, 80%

svjetske populacije uglavnom se oslanja na tradicionalnu medicinu (23). Ljekovite biljke su poznate kao važan izvor bioaktivnih prirodnih produkata kao što su fenoli i flavonoidi. Pored toga, postoje različiti biljni pripravci koji imaju povoljne učinke na ljudsko zdravlje. S obzirom na visoku učinkovitost i niske štetne učinke ljekovitih biljaka i njihovih bioaktivnih sastojaka, mogle bi poslužiti kao važna alternativna terapija za liječenje različitih ljudskih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti i mnoge druge (24).

C. spinosa jedna je od najvažnijih ekonomskih vrsta u obitelji *Capparidaceae* koja ima širok spektar raznolikosti (40-50 rodova i 700-900 vrsta). Poznato je kako su *Capparidaceae* usko povezane s obitelji *Brassicaceae* koja je bogata glukozinolatima i flavonoidima (23).

Kapare su polegnuti grm, a pri dnu imaju raširene, viseće grane duge 0,3-1 m i okomitim korijenom. Naizmjenični, zeleni listovi mogu biti pomalo mesnati, okruglasti su do eliptični, oštri i pretežno s jednom uočljivom bodljom na vrhu (naziv vrste, od lat. *spinosa* = trnovita), goli ili katkada dlakavi, a na licu sjajni. Krupan (promjera 4-5 cm) cvijet (Slika 9a) je dvospolan, mirisan, smješten na dugoj stapci u pazušcu lista i sastavljen od četiri bijele ili ružičastoljubičaste latice te četiri bijela lapa koja su slična laticama. Ružičasti ili bijeli prašnici su mnogobrojni (60-100). Period cvata je od travnja do rujna. Plod (Slika 9b) je crvenkasta boba jajastog oblika na dugoj dršci, s puno bubrežastih i crvenkastih sjemenki (25).

Kapari pogoduju mjesta koja su izložena suncu i zaštićena od jakih vjetrova, ne višim od 60 metara nadmorske visine. Raste samoniklo na zaklonjenim mjestima po zidinama ruševina. Rasprostranjena je na raznim područjima poput Sredozemlja, Kanarskih Otoka, Jugozapadne Azije (25).



Slika 9. Kapara (*Capparis spinosa* L.). Na slikama su prikazani **a)** cvijet **b)** plod.
Slika preuzeta iz (26).

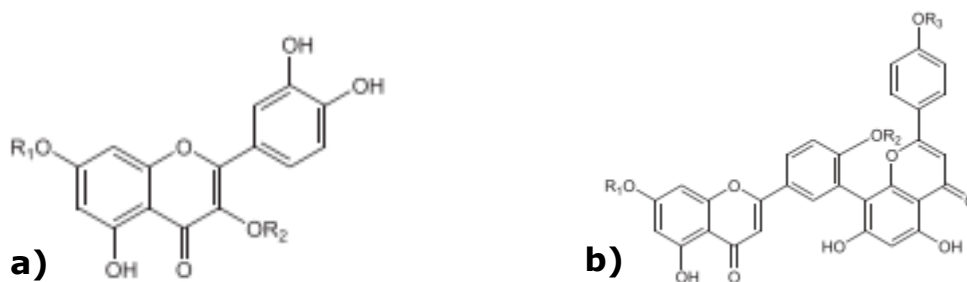
Carstvo: Plantae
 Podcarstvo: Tracheophyta, vaskularne biljke
 Koljeno: Spermatophyta, sjemenjače
 Potkoljeno: Magnoliophyta, kritosjemenjače
 Razred: Magnoliopsida, dvosupnice
 Red: Brassicaceae
 Porodica: Capparidaceae
 Rod: *Capparis* L.
 Vrsta: *Capparis spinosa* L. (27)

1.4.1. FITOKEMIJSKA SVOJSTVA KAPARE

Budući da kapara ima nekoliko pozitivnih učinaka na ljudske bolesti, kemijske i bioaktivne komponente biljke *C. spinosa* u zadnje vrijeme su proučavane u raznim analitičkim studijama. Općenito, *C. spinosa* ima širok spektar bioaktivnih spojeva poput alkaloida, flavonoida, steroida, terpenoida (23). Također, kapare sadrže sastojke kao što su hlapljivo ulje, ligande šećera i glukozne izotiocijanate (28).

Budući da je *C. spinosa* bogata flavonoidima, mnoga su istraživanja identificirala i kvantificirala flavonoide pronađene u *C. spinosa*. Flavonoidi su

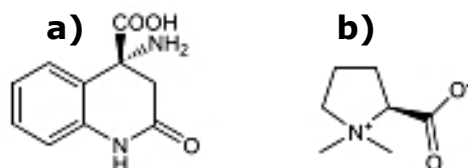
hidroksilirani fenolni spojevi i nalaze se u biljkama. Flavonoidi imaju kostur od 15 ugljika, koji se sastoji od dva benzenska prstena i heterocikličkog piranskog prstena. Flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko skupina na temelju njihovih struktura kao što su flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavonoidi i drugi (23). Zbog različitih farmakoloških učinaka, od antidijabetičkih i protuupalnih do protukancerogenih, flavonoidi su među najbolje proučavanim prirodnim spojevima. Razne flavonoidne podskupine zastupljene su u *C. spinosa*. Jedan od najzastupljenijih flavonoida u prirodi, kvercetin (Slika 10a), izoliran je iz pupova biljke, dok su različiti derivati njegovih glikozida identificirani u plodovima i drugim dijelovima biljke. Najzastupljeniji flavonoid, kako u pupovima, tako i u plodovima, je rutin (Slika 10a). Dva dimerna flavonoida koja su karakteristična za Ginkgo bilobu također su pronađena u *C. spinosa* (Slika 10b) (24).



Slika 10. Kemijske strukture flavonoida u *C. spinosa*. **a)** Struktura u kojoj $R_1=R_2=H$ prikazuje kvercetin, a kada je $R_1=H$, $R_2=rutin$. **b)** Struktura prikazuje dva dimerna flavonoida iz Ginka bilobe. Slika preuzeta iz (24).

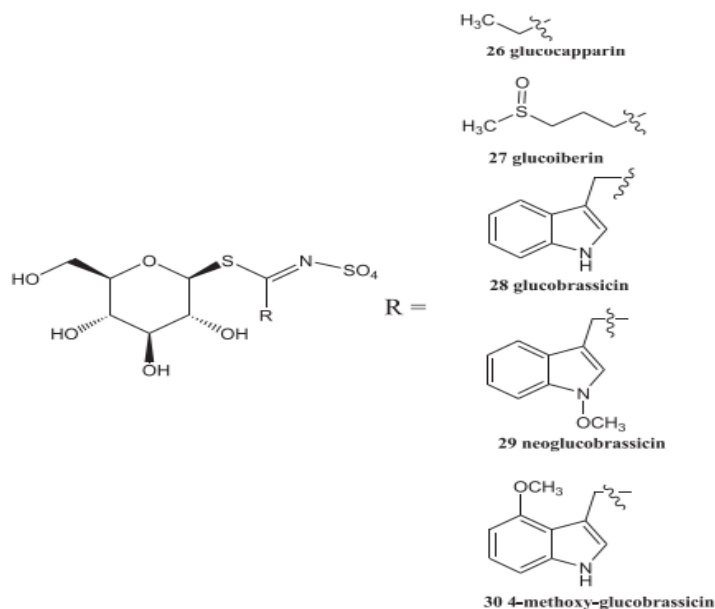
Alkaloidi su raznolika skupina sekundarnih prirodnih metabolita koji u svojoj strukturi sadrže jedan ili više atoma dušika. Među raznim alkaloidima izoliranim iz *C. spinosa* do sada je nova tetrahidrokinolinska kiselina iz stabljika i plodova biljke (Slika 11a). Zapravo se ovaj spoj može smatrati

novom aminokiselinom jer sadrži ugljikov kostur koji nosi amino i karboksilne skupine. Druga modificirana aminokiselina ili alkaloid je izoliran iz voća (Slika 11b). Plodovi kapare također daju visoko polarne, u vodi topive alkaloide (24).

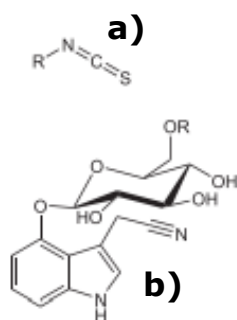


Slika 11. Kemijske strukture alkaloida u *C. spinosa*. Slika preuzeta iz (24).

Glukozinolati su skupina prirodnih spojeva koji sadrže derivate glukoze i aminokiselina. Strukturno su građeni od spojeva s jedinstvenim sumpornim i dušikovim funkcionalnim skupinama, dajući biljkama karakteristične mirise i biološke aktivnosti (Slika 12). Jedna od najvažnijih značajki glukozinolata u biljaka je njihova sposobnost da stvore mnoštvo sekundarnih metabolita, prvenstveno zbog aktivnosti enzima mirozinaze. Izolirani spojevi iz *C. spinosa* uključuju biološki aktivne spojeve male molekulske mase kao što su butil i izopropil izotiocijanati (Slika 13a) i indol-3 acetonitril glikozid (Slika 13b). Butilizotiocijanat i izopropil-izotiocijanat su dva glavna spoja u ulju ploda i korijena (24).



Slika 12. Kemijske strukture glukozinolata iz *C. spinosa*. Slika preuzeta iz (24).



Slika 13. Kemijske strukture izotiocijanata i indol-3 acetonitril glikozida iz *C. spinosa*. a) Gdje je R=butil, prikazana je struktura butil izotiocijanata, a R=izopropil, struktura je izopropil izotiocijanata. b) Prikazana je struktura indol-3 acetonitril glikozida. Slika preuzeta iz (24).

1.4.2. FARMAKOLOŠKI UČINCI KAPARE

Do sada je bilo mnogo znanstvenih dokaza koji pokazuju da kapara ima različite farmakološke učinke, uključujući antioksidativne, antimikrobne, antikancerogene i hepatoprotektivne (24).

Hidrodestilirano eterično ulje iz lišća i cvjetnih pupova kapare i vodena infuzija pripremljena s istim, ispitivane su na antikancerogeni potencijal na HT-29 stanicama humanog kolorektalnog adenokarcinoma. Sastavom esencijalnog ulja dominirao je metil izotiocijanat, proizvod nastao razgradnjom glukokaparina, dok je vodena infuzija bila dobar izvor flavonoida poznatih po antiproliferativnim učincima na stanice raka debelog crijeva. Esencijalno ulje i vodena infuzija vrše smanjenje vremenske i dozne reakcije proliferacije HT-29 stanica, pri čemu prva pokazuje nešto nižu aktivnost od druge (44,3% inhibicije nakon 72 sata nasuprot 54,4%). Također su proučavani učinci na aktivaciju nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B). Eterično ulje i vodena infuzija pokazale su učinak ovisan o dozi na aktivnost NF- κ B, s tim da je drugi opet bio aktivniji od prvog. Esencijalno ulje i vodena infuzija kapara induciraju zaustavljanje G2 faze mitoze na način koji ovisi o dozi. Dokazano je kako oba produkta kapara pokazuju citostatičke, a ne citotoksične učinke na stanice HT-29 (24).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je ispitati citotoksično djelovanje kapara (*Capparis spinosa* L.) na stanične linije humanih karcinoma. Hipoteza potencijalne citotoksične aktivnosti ispitat će se na humanim karcinomskim stanicama mokraćnog mjehura (T24) i humanim karcinomskim stanicama dojke (MDA-MB-231). Metoda istraživanja ovog rada je MTT test koji se provodi na navedenim staničnim linijama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE LINIJE

In vitro ispitivanje citotoksičnog djelovanja kapara (*Capparis spinosa* L.) na humanim karcinomskim stanicama T24 i MDA-MB-231. Tablice (Tablica 3 i 4) prikazuju obilježja navedenih staničnih linija.

Tablica 3. Obilježja T24 stanične linije. Tablica preuzeta iz (29).

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	mokraćni mjehur
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznih stanica
Spol	ženski
Dob	81 godina
Etnička pripadnost	bijele rase
Primjena	pogodan domaćin za transfekciju
Uvjeti pohrane	tekući dušik

Tablica 4. Obilježja MDA-MB-231 stanične linije. Tablica preuzeta iz (30).

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	mliječna žlijezda / dojka; izvedena iz metastatskog mjesta: pleuralni izljev
Stanični tip	epitelna
Format proizvoda	smrznuto

Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherenta
Bolest	adenokarcinom
Spol	Ženski
Dob	51 godina
Etnička pripadnost	bijele rase
Primjena	pogodan domaćin za transfekciju
Uvjeti pohrane	tekući dušik

3.1.1. POSTUPAK

Stanične linije uzgojene su u Dulbecco 'sModifiedEagleMedium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru (Slika 14) na 37°C uz 5% CO₂ nakon odmrzavanja. Aminokiseline, minerali i goveđi serum (FBS) su hranjive tvari koje su potrebne za uzgoj stanice i koje su sadržane u DMEM mediju. Također, sadržava antibiotike i Red fenol indikator (promjena boje u žuto odnosi se na potrebu za promjenom medija).

Stanice adherirane na podlozi, nakon što se uklonio DMEM, tretiraju se enzimom koji cijepa peptidne veze, tripsinom i time se omogućuje njihovo odvajanje od podloge i presađivanje.

Postupak brojanja stanica vrši se tako da se 10 µl stanica pomiješa s 90 µl Trypan Blue boje koja oboji mrtve stanice. Time je omogućeno brojenje živih stanica koje nisu obojene. Jednak broj stanica presađuje se u 96 jažica u 3 replikata i ostave se preko noći kako bi se prihvatile za podlogu.

Sljedeći korak je tretiranje stanica karcinoma prethodno pripremljenim otopinama ekstrakta iz *Capparis spinosa* L. 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. Tri jažice ostavljene u samom mediju predstavljaju kontrolu.



Slika 14. Za uzgoj stanica koristi se vlažni inkubator . Slika preuzeta iz (31).

3.2. UZORCI

Za ispitivanje citotoksičnosti na humanim karcinomskim stanicama korišteno je 5 uzoraka tj. 2 uzorka pri čemu je jedan od uzoraka imao dva, a drugi tri načina izolacije. Korištene su kapare (*Capparis spinosa* L.) iz Splita i Brača. Svi uzorci su pripremljeni u koncentraciji 10 mg/mL (Tablica 5).

Tablica 5. Uzorci i njihova priprema.

UZORAK	METODA IZOLACIJE	MASA (mg)	VOLUMEN (μ L)	KONCENTRACIJA (mg/mL)
Kapare Split (<i>Capparis spinosa</i> L.)	Mikrovalna destilacija	0,49	49	10
	Mikrovalna ekstrakcija	0,36	36	10
	Clevenger	3,2	320	10

Kapare Brač (<i>Capparis spinosa</i> L.)	Mikrovalna destilacija	0,29	29	10
	Mikrovalna ekstrakcija	0,08	8	10

Zbog nedovoljne količine pojedinih uzoraka, u ispitivanju citotoksičnosti nije bilo moguće od svakog uzorka pripremiti otopine koncentracije od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL (Tablica 6).

Tablica 6. Koncentracije otopina: KSD – kapare Split, mikrovalna destilacija; KSE – kapare Split, mikrovalna ekstrakcija; KBC – kapare Brač, Clevenger; KBD – kapare Brač, mikrovalna destilacija; KBE – kapare Brač, mikrovalna ekstrakcija.

UZORCI	KONCENTRACIJE				
	1 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
KSD	+	+	+	+	+
KSE	-	+	+	+	+
KBC	+	+	+	+	+
KBD	-	+	+	+	+
KBE	-	-	+	+	+

3.2.1. METODE IZOLACIJE

3.2.1.1. Mikrovalna ekstrakcija

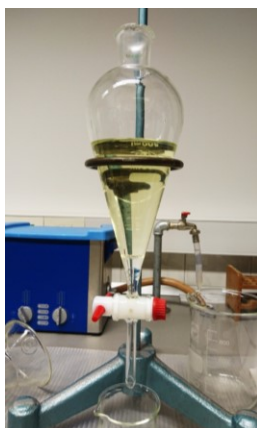
Za mikrovalnu ekstrakciju koristi se aparatura koja je sastavljena od dva dijela što omogućava dvije vrste izolacije biljnog sadržaja. Biljni materijal kapare (Split i Brač) je obrađen na oba načina, mikrovalnom destilacijom i mikrovalnom ekstrakcijom.

Prikazana aparatura (Slika 15) omogućava izolaciju aroma (engl. *flavour*). Ovdje je slučaj mikrovalne ekstrakcije bez dodatka organskog otapala. Uz pomoć mikrovalova i djelovanjem gravitacijske sile, u čaši postavljenoj na dnu aparature, sakuplja se ekstrakt. Uvjeti za mikrovalnu ekstrakciju su snaga od 500 W i temperatura 98°C u trajanju od 35 minuta.



Slika 15. Mikrovalna ekstrakcija uz gravitacijsku silu.

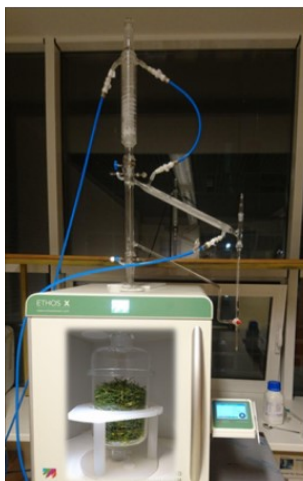
Po završetku ekstrakcije, dobiveni ekstrakt se prelije u lijevak za odjeljivanje te se ekstrahira s 3 puta po 10 mL diklormetana (Slika 16). Diklormetanski sloj se odvoji, ispusti preko pipca te suši bezvodnim natrijevim sulfatom. Konačni ekstrakt prebaci se u prethodno izvaganu bočicu, a višak organskog otapala otkloni se uparivanjem u struji dušika.



Slika 16. Obrada ekstrakta nakon mikrovalne ekstrakcije.

3.2.1.2. Mikrovalna destilacija

Prikazana aparatura (Slika 17) omogućava izolaciju hlapljivih spojeva (engl. *fragrance*). Radi se o procesu mikrovalne destilacije. Za razliku od hidrodestilacije, destilacija potpomognuta mikrovalovima ima znatno kraće vrijeme destilacije i nema upotrebe organskog otapala.



Slika 17. Uređaj za mikrovalnu destilaciju.

U staklenu posudu stavi se usitnjeni biljni materijal nakon čega se posuda zatvori poklopcem. Sustav za refluks i hladilo povežu se na posudu. Voda se puni u desnoj vertikalnoj cijevi. Voda služi kao medij u kojem dolazi do prikupljanja hlapljivih spojeva koji će se završetkom destilacije odvojiti uz pomoć pentana. Uvjeti izvođenja destilacije su snaga od 500 W, temperatura 98°C u vremenskom trajanju od 35 minuta. Po završetku destilacije, sloj pentana i hlapljivih spojeva odvaja se propipetom i prebacuje u čistu čašu, a ostatak vode ispušta se preko pipca. Sadržaj u čaši suši se s bezvodnim natrijevim sulfatom u slučaju prisutnosti zaostale vode. Destilat se prebacuje u bočicu koja je prethodno izvagana, a dio organskog otapala koji je zaostao u uzorku uklanja se uparivačem u struji dušika.

3.2.1.3. Hidrodestilacija

Klasična hidrodestilacija provedena je na uzorcima biljnog materijala kapare Brač. Hidrodestilacija (Slika 18) biljnog materijala se odvijala u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata. Kao trap korištena je smjesa organskih otapala pentana i dietiletera u omjeru 3:1 (6 mL + 2mL). Voda i biljni uzorak u tikvici se zagrijavaju pomoću plamenika do točke vrenja, kada počinje isparavanje. Vodena para i eterična ulja isparavaju, podižu se i ulaze u sustav cijevi aparature. U dijelu aparature s hladionikom vodena para i pare eteričnog ulja se hlade, kondenziraju i prelaze u tekuće stanje. Destilat (eterično ulje) i voda (hidrolat – voda u kojoj se nalaze otopljene bioaktivne tvari koje su topive u vodi) se nakupljaju u radijalnom dijelu cijevi (kruškica) gdje se i razdvajaju na osnovu razlike u specifičnoj masi. Ispuštanjem vode iz aparature pomoću trostranog pipca, destilat se dovodi u kapilaru za očitovanje količine.

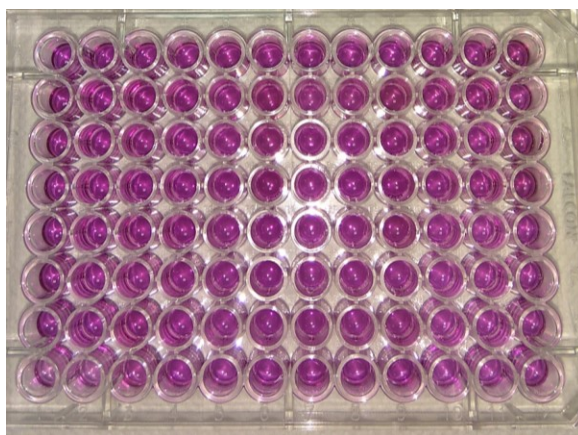


Slika 18. Hidrodestilacija u aparaturi po Clevengeru.

3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

MTT metoda koristi se za mjerenje staničnog metabolizma koji određuje staničnu živost i proliferaciju. Redukcija žutog tetrazolina MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) odvija se u metabolički aktivnim stanicama. Mrtve tj. metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT pa se MTT test koristi za određivanje postotka metabolički aktivnih stanica nakon što su izložene ekstraktu biljaka. MTT pretvara se u formazan, ljubičasto obojen spoj, nakon reakcije s metabolički aktivnim stanicama. Gubitak sposobnosti pretvorbe MTT-a dogodi se kada stanice umru. U mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno je uključena reakcija s NADH-om koji je zadužen za prijenos elektrone do MTT-a. Spektrofotometrija se koristi za mjerenje rezultirajućeg intracelularnog ljubičastog formazana. Novonastali ljubičasti spoj potrebno je otopiti u otopini dimetilsulfoksida (DMSO) kako bi se mogla očitati njegova apsorbancija. MTT se ispiru nakon jednog sata i dodaje se dimetilsulfoksid (Slika 19). Pločice se inkubiraju u vremenu od 10 min na 37°C uz treskanje. Apsorbancija se mjeri na 570 nm (2).

Pokazatelj citotoksične aktivnosti je omjer apsorbancija stanica koje su tretirane otopinama kapara (Brač i Split) i onih stanica koje su netretirane.



Slika 19. Nakon dodavanja DMSO (dimetilsulfoksid) došlo je do ljubičastog obojenja.

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Za statističku analizu korišten je t-test nejednakih varijanci koristeći statistički program GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD) sa statističkom značajnošću $P < 0.05$. Izračunavanje IC50 vrijednosti je također provedeno pomoću GraphPad programa, normalizacijom podataka pomoću tri neovisna mjerenja netretiranih kontrolnih uzoraka.

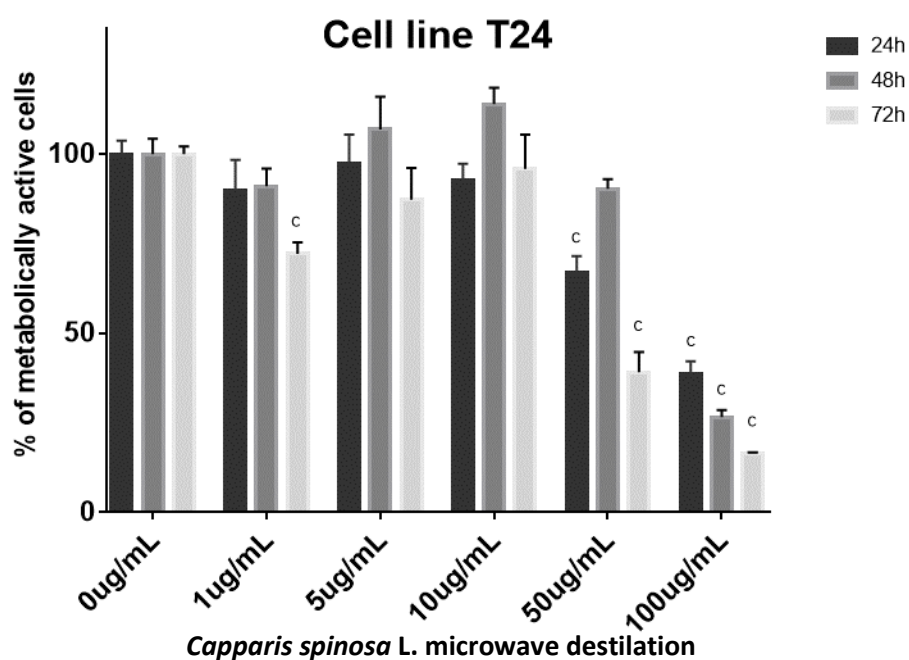
4. REZULTATI

Empirijska obrada:

Kao ograničenje ovog istraživanja uzima se mala serija podataka.

4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – STANIČNA LINIJA T24

4.1.1. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) IZ SPLITA IZOLIRAN MIKROVALNOM DESTILACIJOM

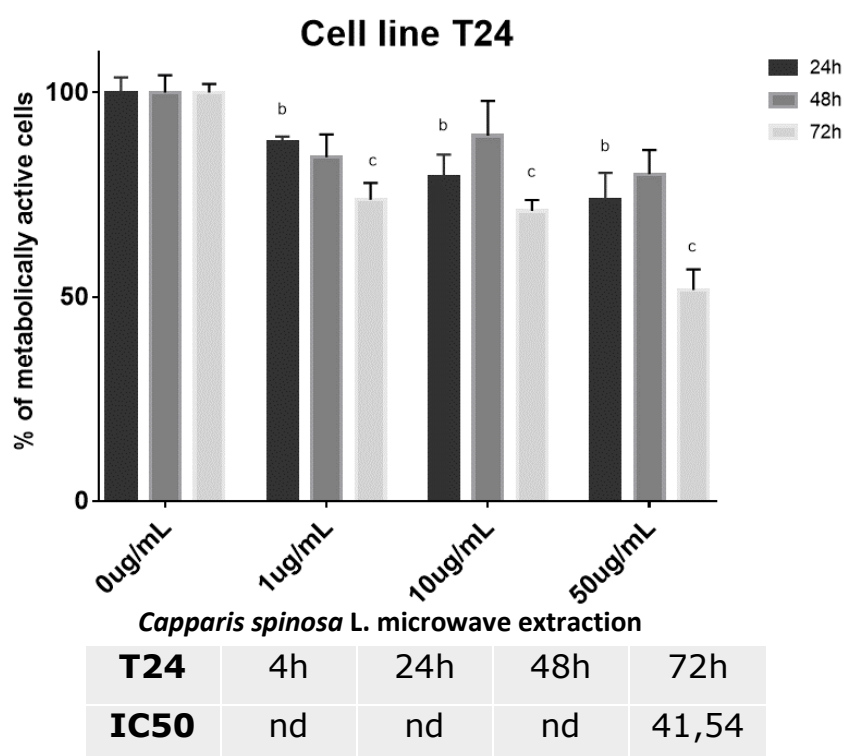


T24	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	81,35	nd	35,16

Slika 20. Citotoksični učinak uzorka kapare iz Splita izolirane mikrovalnom destilacijom na T24 staničnu liniju.

Kapare iz Splita izolirane mikrovalnom destilacijom ostvaruju slab citotoksični učinak pri svim koncentracijama nakon 24h inkubacije. Međutim, vidljiv je značajan citotoksični učinak pri koncentraciji 50 µg/mL i 100 µg/mL u inkubaciji od 72h (IC50 vrijednost 35,16 µg/mL). c, *P* vrijednost < 0,001.

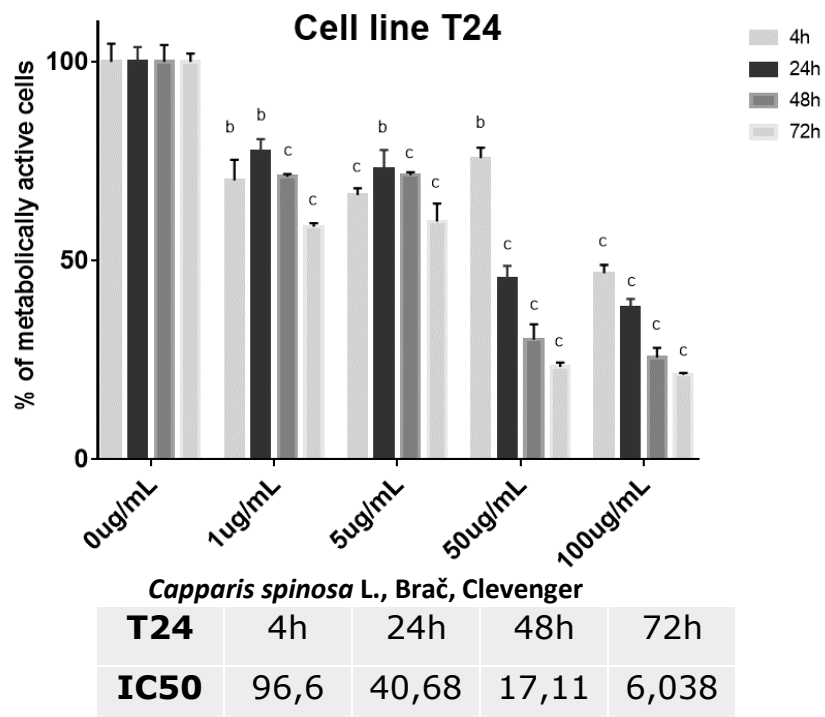
4.1.2. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) IZ SPLITA IZOLIRAN MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM



Slika 21. Citotoksični učinak uzorka kapare iz Splita izolirane mikrovalnom ekstrakcijom na T24 staničnu liniju.

Kapare iz Splita izolirane mikrovalnom ekstrakcijom ne pokazuju citotoksični učinak tj. pri koncentracijama 1 µg/mL, 10 µg/mL i 50 µg/mL u vremenima inkubacije od 4, 24 i 48 sati citotoksični učinak nije bilo moguće definirati. Pri koncentraciji 50 µg/mL nakon 72h inkubacije vidljivo je smanjenje broja metabolički aktivnih stanica (IC50 vrijednost 41,54 µg/mL). b, *P* vrijednost < 0,01; c, *P* vrijednost < 0,001.

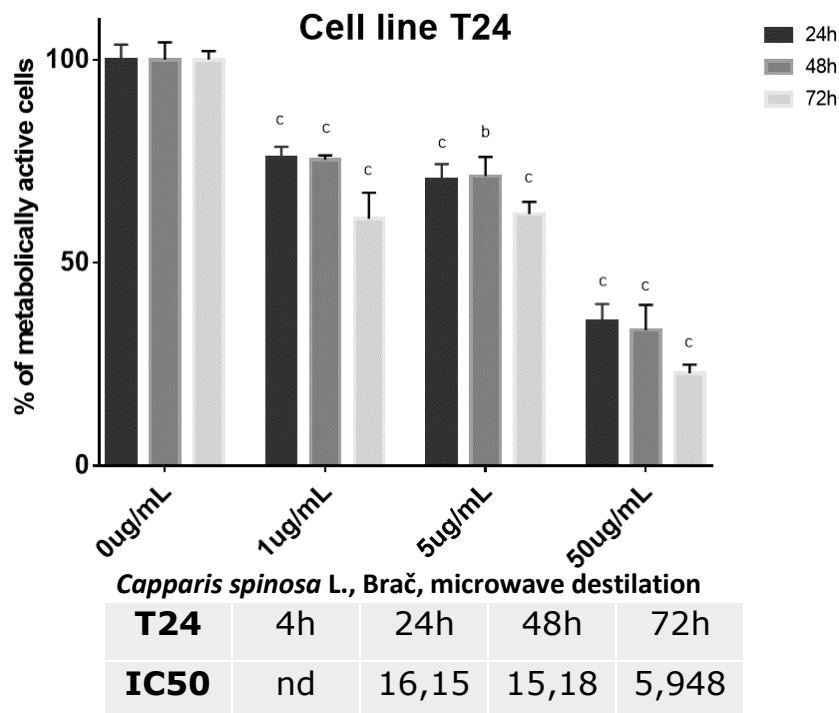
4.1.3. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) S BRAČA IZOLIRAN PO CLEVENGERU



Slika 22. Citotoksični učinak uzorka kapare s Brača izolirane hidrodestilacijom pomoću Clevenger aparature na T24 staničnu liniju.

Kapare s Brača izolirane hidrodestilacijom pomoću Clevenger aparature pokazuju značajan citotoksični učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. IC50 vrijednost za 4h iznosila je 96,6 µg/mL, za 24h 40,68 µg/mL, za 48h 17,11 µg/mL te za 72h 6,038 µg/mL. b, *P* vrijednost < 0,01; c, *P* vrijednost < 0,001.

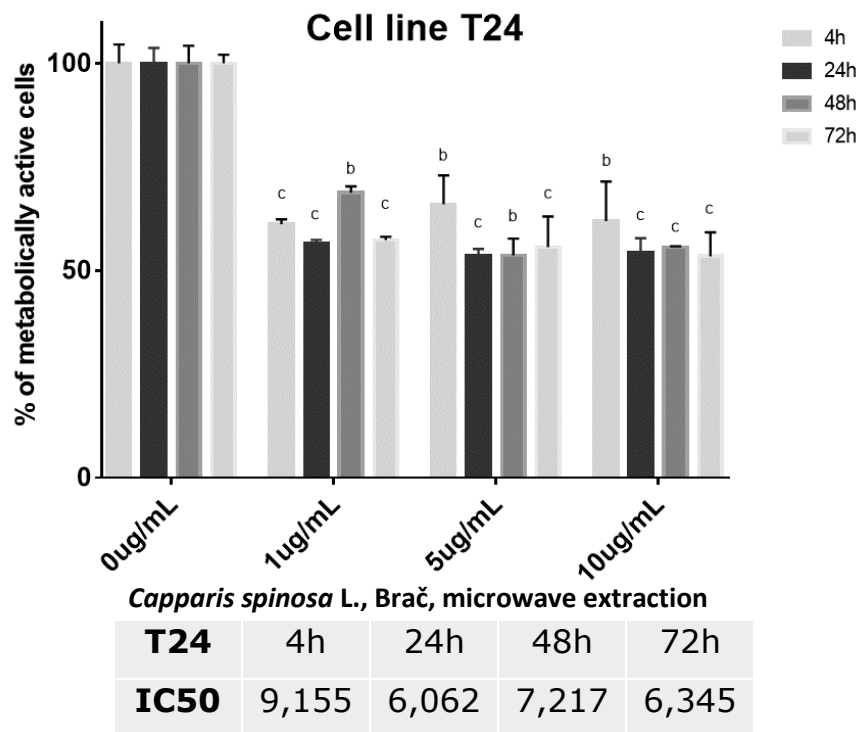
4.1.4. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) S BRAČA IZOLIRAN MIKROVALNOM DESTILACIJOM



Slika 23. Citotoksični učinak uzorka kapare s Brača izolirane mikrovalnom destilacijom na T24 staničnu liniju.

Izolacija mikrovalnom destilacijom kapare s Brača ostvaruje značajan citotoksični učinak pri koncentraciji 50 µg/mL već pri inkubaciji od 24 sata. Broj metaboličkih stanica znatno se smanjuje daljnjom inkubacijom u vremenskom razdoblju od 48 i 72 sata. IC50 vrijednost za 24h iznosila je 16,15 µg/mL, za 48h 15,18 µg/mL te za 72h 5,948 µg/mL. b, *P* vrijednost < 0,01; c, *P* vrijednost < 0,001.

4.1.5. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) S BRAČA IZOLIRAN MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM

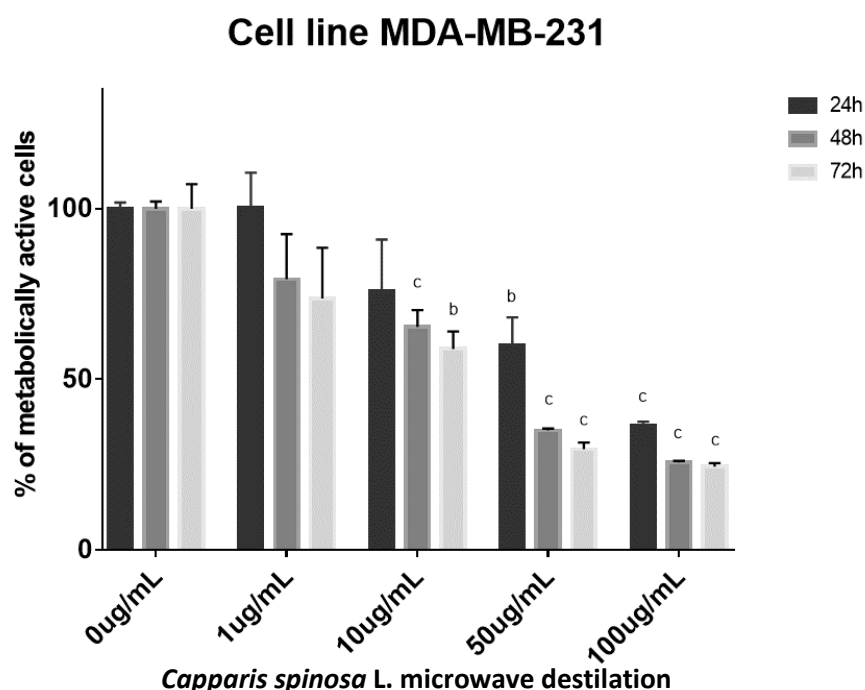


Slika 24. Citotoksični učinak uzorka kapare s Brača izolirane mikrovalnom ekstrakcijom na T24 staničnu liniju.

Kapare s Brača izolirane mikrovalnom ekstrakcijom pokazuju citotoksični učinak pri malim koncentracijama, odnosno pri koncentraciji 5 µg/mL nakon 24h inkubacije. IC50 vrijednost za 4h iznosila je 9,155 µg/mL, za 24h 6,062 µg/mL, za 48h 7,217 µg/mL te za 72h 6,345 µg/mL. b, *P* vrijednost < 0,01; c, *P* vrijednost < 0,001.

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

4.2.1. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) IZ SPLITA IZOLIRAN MIKROVALNOM DESTILACIJOM

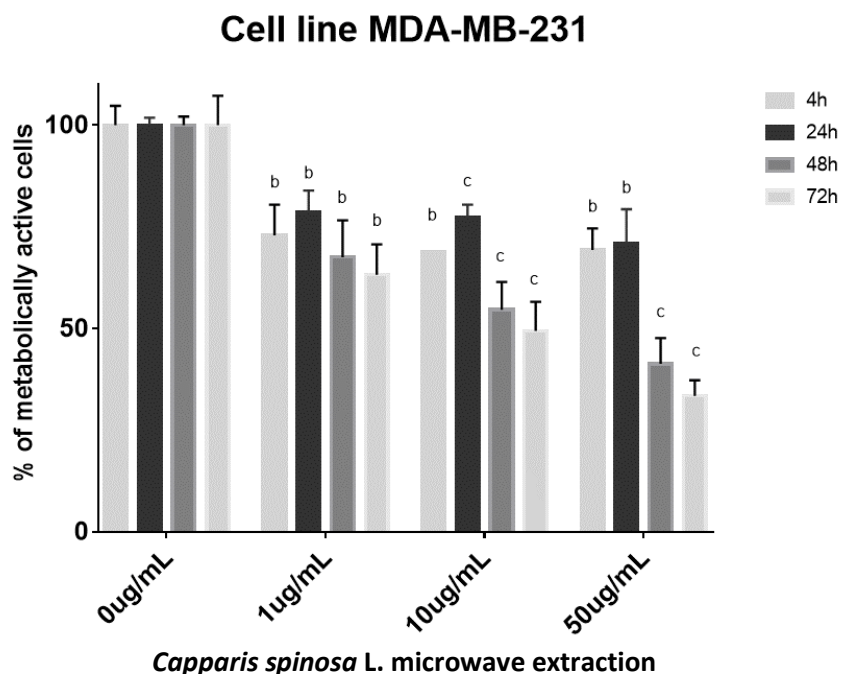


MDA-MB-231	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	65,68	29,67	23,58

Slika 25. Citotoksični učinak uzorka kapare iz Splita izolirane mikrovalnom destilacijom na MDA-MB-231 staničnu liniju.

Kapare iz Splita izolirane mikrovalnom destilacijom ostvaruju značajan citotoksični učinak na staničnu liniju MDA-MB-231 pri koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h inkubacije. Broj metabolički aktivnih stanica daljnjom inkubacijom pri navedenim koncentracijama nastavlja se smanjivati. IC50 vrijednost za 24h iznosila je 65,68 µg/mL, za 48h 29,67 µg/mL te za 72h 23,58 µg/mL. b, *P* vrijednost < 0,01; c, *P* vrijednost < 0,001.

4.2.2. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) IZ SPLITA IZOLIRAN MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM

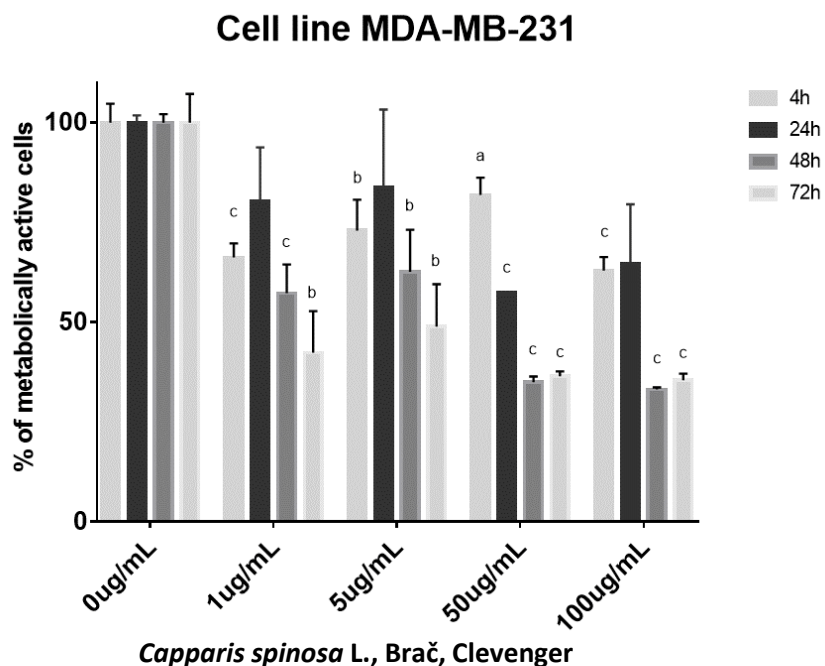


MDA-MB-231	4h	24h	48h	72h
IC50	76,1	90,42	16,71	9,587

Slika 26. Citotoksični učinak uzorka kapare iz Splita izolirane mikrovalnom ekstrakcijom na MDA-MB-231 staničnu liniju.

Izolacija mikrovalnom ekstrakcijom kapara iz Splita ne ostvaruje značajan citotoksični učinak pri koncentracijama 1 µg/mL, 10 µg/mL i 50 µg/mL pri 4h inkubaciji. Inkubacijom u vremenskom razdoblju od 24h broj metabolički aktivnih stanica pri navedenim koncentracijama neočekivano se povećava. Pri koncentracijama 10 µg/mL i 50 µg/mL u vremenu inkubacije od 48 i 72 sata, broj metabolički aktivnih stanica se smanjuje. IC50 vrijednost za 4h iznosila je 76,1 µg/mL, za 24h 90,42 µg/mL, za 48h 16,71 µg/mL te za 72h 9,587 µg/mL. b, *P* vrijednost < 0,01; c, *P* vrijednost < 0,001.

4.2.3. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) S BRAČA IZOLIRAN PO CLEVENGERU

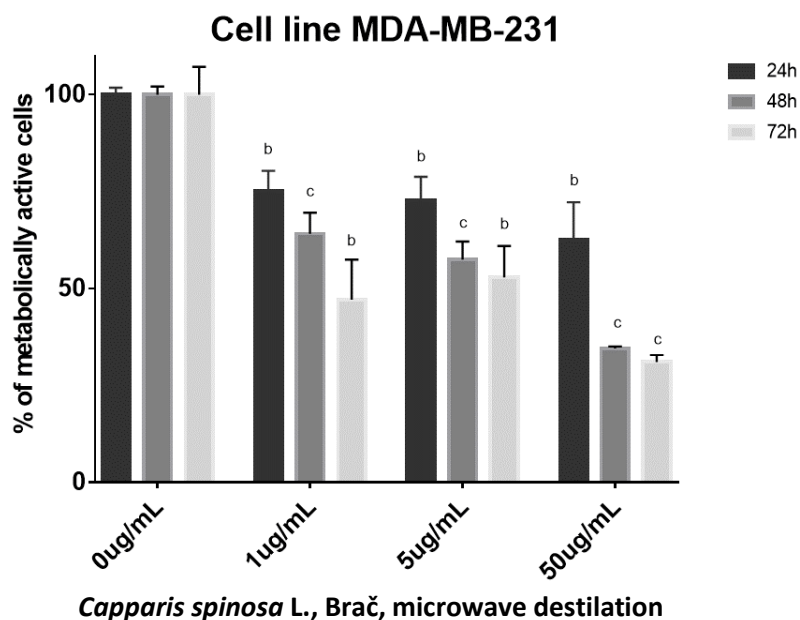


MDA-MB-231	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	99,8	11,97	9,434

Slika 27. Citotoksični učinak uzorka kapare s Brača izolirane hidrodestilacijom pomoću Clevenger aparature na MDA-MB-231 staničnu liniju.

Kapare s Brača izolirane hidrodestilacijom pomoću Clevenger aparature ne pokazuju značajan učinak pri koncentracijama 1 µg/mL, 5 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL 24h inkubacijom. Međutim, vidljivo je smanjene metabolički aktivnih stanica pri navedenim koncentracijama inkubacijom u vremenskom razdoblju od 48 i 72 sata. IC50 vrijednost za 24h iznosila je 99,8 µg/mL, za 48h 11,97 µg/mL te za 72h 9,434 µg/mL. a, *P* vrijednost < 0,05; b, *P* vrijednost < 0,01; c, *P* vrijednost < 0,001.

4.2.4. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) S BRAČA IZOLIRAN MIKROVALNOM DESTILACIJOM

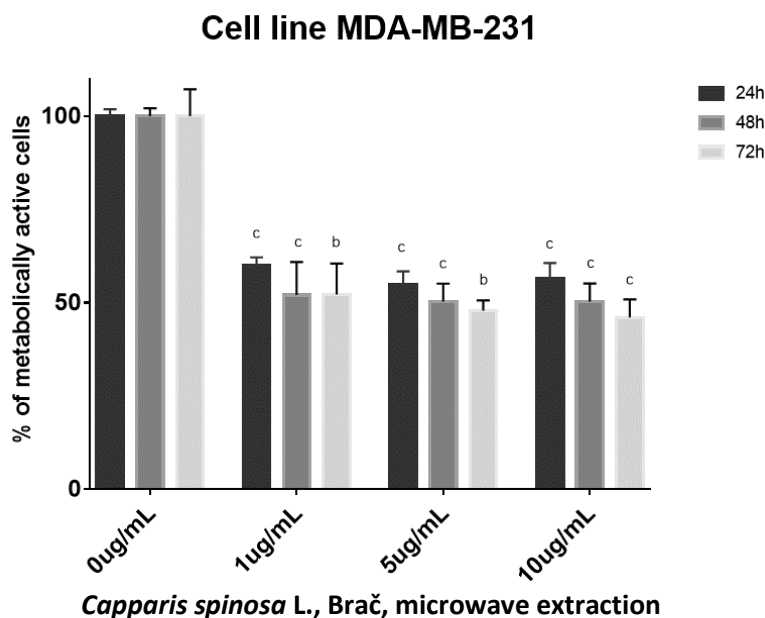


MDA-MB-231	4h	24h	48h	72h
IC50	nd	50,18	8,345	8,739

Slika 28. Citotoksični učinak uzorka kapare s Brača izolirane mikrovalnom destilacijom na MDA-MB-231 staničnu liniju.

Kapare s Brača izolirane mikrovalnom destilacijom pokazuju slab citotoksični učinak pri svim koncentracijama nakon 24h inkubacije u odnosu na inkubacije od 48 i 72 sata gdje je vidljivo značajno smanjenje broja metabolički aktivnih stanica. IC50 vrijednost za 24h iznosila je 50,18 µg/mL, za 48h 8,345 µg/mL te za 72h 8,739 µg/mL. b, P vrijednost < 0,01; c, P vrijednost < 0,001.

4.2.5. EKSTRAKT KAPARE (*Capparis spinosa* L.) S BRAČA IZOLIRAN MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM



MDA-MB-231	4h	24h	48h	72h
IC50	35,5	7,079	4,626	3,814

Slika 29. Citotoksični učinak uzorka kapare s Brača izolirane mikrovalnom ekstrakcijom na MDA-MB-231 staničnu liniju.

Kapare s Brača izolirane mikrovalnom ekstrakcijom pokazuju značajan pad metabolički aktivnih stanica pri koncentraciji od 1 µg/mL već nakon 4h inkubacije. Daljnjom inkubacijom i povećanjem koncentracije nastavlja opadati broja metabolički aktivnih stanica. IC50 vrijednost za 4h iznosila je 35,5 µg/mL, za 24h 7,079 µg/mL, za 48h 4,626 µg/mL te za 72h 3,814 µg/mL. b, *P* vrijednost < 0,01; c, *P* vrijednost < 0,001.

5. RASPRAVA

Kroz naš život, zdrave stanice našeg tijela kontrolirano se dijele i zamjenjuju. Karcinom započinje kada se stanica nekako promijeni tako da započne s nekontroliranim dijeljenjem. Tumor je masa koja se sastoji od nakupine abnormalnih stanica. Većina karcinoma stvara tumore, ali nisu svi tumori kancerogeni. Benigni ili nekancerogeni tumori ne šire se na druge dijelove tijela i ne stvaraju nove tumore. Maligni ili kancerogeni tumori istiskuju zdrave stanice, uzrokuju ometanje tjelesnih funkcija te crpe hranjive tvari iz tjelesnih tkiva (32). Karcinom je drugi vodeći uzrok smrti na globalnoj razini te se procjenjuje 9,6 milijuna smrtnih slučajeva u 2018. godini. Najčešći tip karcinoma u muškaraca je karcinom pluća, prostate, debelog crijeva, a u žena karcinom dojke, kolorektalni, plućni, cervikalni i karcinom štitnjače. Problem na globalnoj razini predstavlja što velik broj oboljelih od karcinoma nema pristup pravovremenom uspostavljanju dijagnoze, a nakon toga i liječenju. U visokorazvijenim zemljama koje imaju razvijene zdravstvene sustave, stope preživljenja mnogih karcinoma poboljšavaju se zahvaljujući dostupnom ranom otkrivanju, kvalitetnom liječenju i skrbi. Izbjegavanje određenih čimbenika rizika može pomoći u prevenciji karcinoma, stoga treba izbjegavati upotrebu duhana, zdravo se hraniti i redovito vježbati, ograničiti upotrebu alkohola, smanjiti izloženost ultraljubičastom zračenju itd. Ljudi u zemljama koje nisu razvijene vjerojatnije će razviti rak kroničnim infekcijama (33).

Karcinom mokraćnog mjehura bio je deveti po učestalosti zloćudnih bolesti u svijetu, s 430000 novootkrivenih slučajeva svake godine. U Europi 2012. godine procijenjeno je ukupno 118000 novih slučajeva i 52000 smrtnih slučajeva. Velika prevalencija karcinoma mokraćnog mjehura, zajedno s njegovom ranjivošću na višestruke recidive dovodi do značajnog opterećenja zdravstvenih usluga. Većina karcinoma mokraćnog mjehura pripada

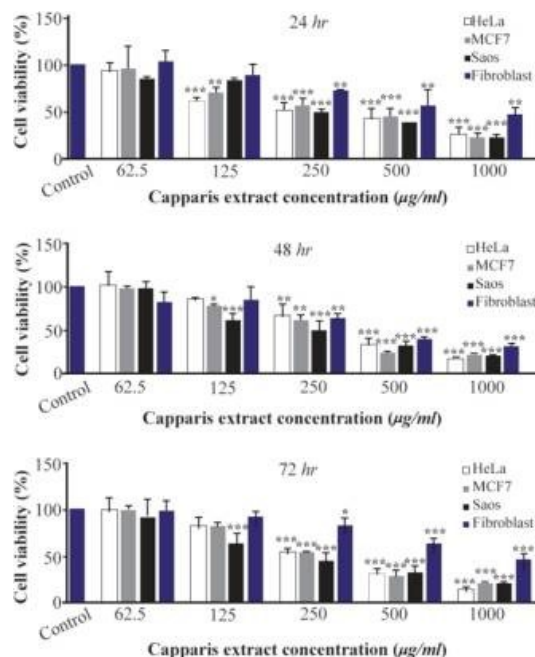
urotelnom karcinomu kao prevladavajući histološki tip u zapadnoj Europi i Sjedinjenim Američkim Državama. Karcinom pločastih stanica mokraćnog mjehura češći je u Africi gdje su infekcije shistosomijazom zastupljenije. Glavni čimbenici rizika za karcinom mokraćnog mjehura uključuje pušenje duhanskih proizvoda, industrijsku izloženost potencijalnim kancerogenima kao što su amini i čađava prašina, dugotrajno konzumiranje vode koja je zagađena arsenom i obiteljska povijest podudarnih karcinoma (34).

Karcinom dojke bio je treći najčešći karcinom s procijenjenih 1,7 milijuna oboljelih u 2016. godini. Izazvao je 535000 smrtnih slučajeva kod žena i 10000 smrtnih slučajeva kod muškaraca, što ga čini petim vodećim uzrokom smrti od karcinoma za oba spola. Globalno, jedna od dvadeset žena tijekom života razvije karcinom dojke (35). Smanjenje incidencije raka dojke vjerojatno će zahtijevati populacijski pristup smanjenju izloženosti promjenjivim čimbenicima rizika i pristup precizne prevencije u prepoznavanju žena s povećanim rizikom i usmjeravanju na specifične terapije, poput lijekova za smanjenje rizika (36).

Capparis spinosa jedna je od najrasprostranjenijih ljekovitih biljaka, koja sadrži širok spektar fitokemijskih sastojaka koji se upotrebljavaju u svijetu kao lijek za mnoge ljudske bolesti. Mnoga istraživanja potvrđuju kako je moguće inhibirati mnoge vrste karcinomskih stanica (37).

Flavonoidi su poznati kao najveća skupina prirodnih spojeva koji su snažni antioksidansi i imaju istaknute učinke u staničnoj biologiji (npr. prikupljanje slobodnih radikala i moguće sprečavanje njihove štetne uloge u karcinogenezi). Istraživanja su pokazala kako flavonoidi imaju važan učinak u sprečavanju genetskih mutacija koje u konačnici dovode do stvaranja karcinoma. *C.spinosa* sadrži obilnu količinu flavonoida, točnije kvercetina koji ima protuupalna, antikoagulativna, antibakterijska, antihipertenzijska svojstva (38).

U istraživanju Moghadamnia i suradnika, MTT test je proveden na staničnim linijama MCF7 (karcinom dojke), HeLa (karcinom grlića maternice) i Saos (osteosarkom) tretiranim *C. spinosa*. Prema rezultatima, hidroalkoholni ekstrakt bio je toksičan na tri stanične linije, stoga se može zaključiti kako ekstrakt *C. spinosa* može spriječiti rast karcinomskih stanica u niskim koncentracijama. Prema istraživanju, najbolja učinkovita doza lijeka za stanice karcinoma u usporedbi s normalnim stanicama bila je 250 µg/mL nakon 72 sata (Slika 30). Visok postotak održivosti stanica karcinoma pokazuje kako je 1000 µg/mL, 500 µg/mL i 250 µg/mL ekstrakta *C. spinosa* imalo minimalni učinak na zdrave stanice. U ovom istraživanju pokazano je kako *C. spinosa* sadrži nehlapljive spojeve koji potencijalno mogu igrati važnu ulogu u prevenciji karcinoma dojke i grlića maternice, inhibirajući proliferaciju stanica karcinoma njihovih tkiva. Kao dominantan spoj otkriven je kvercetin. Ovim istraživanjem zabilježeno je antikancerogeno djelovanje hidroalkoholnog ekstrakta *C. spinosa*, kao dobrog izvora flavonoida (38).



Slika 30. Postotak metabolički aktivnih stanica određen MTT testom za (A) HeLa, (B) MCF7 (C) Saos i (D) stanične linije fibroblasta nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta kapare (*Capparis spinosa*). Slika preuzeta iz (38).

U istraživanju Kulisic-Bilusic i suradnika, učinak eteričnog ulja kapare i vodene infuzije na proliferaciju stanica raka HT-29 (adenokarcinom debelog crijeva) istražen je pomoću MTT testa. Antiproliferativni učinak praćen je nakon 15 i 72 sata inkubacije. Eterično ulje i vodena infuzija kapara utjecali su na smanjenje proliferacije stanica HT-29 u vremensko-doznoj ovisnosti. Vodena infuzija kapara pokazala je veći antiproliferativni učinak na stanice HT-29 od eteričnog ulja kapara nakon 15 sati i nakon 72 sata inkubacije (32,6% i 54,4% inhibicije u koncentraciji od 0,1 g/L vodene infuzije u usporedbi s 29,2% i 44,3% za istu koncentraciju eteričnog ulja kapara). Pri tim koncentracijama pri kojima je inhibiran rast stanica, vodena infuzija kapara i esencijalno ulje nisu pokazivali citotoksične učinke (39).

Kako bi se istražio učinak apigenina (flavonoid) na održivost stanica u četiri stanične linije (WI-38, T-24, HT-1376 i PC-3), metabolička aktivnost stanica određena je pomoću MTT testa u istraživanju Shi M-D i suradnika. Rezultati su pokazali kako je apigenin smanjio metaboličku aktivnost tri stanične linije, T-24, HT-1376 i PC-3 u doznoj ovisnosti. Vrijednosti IC₅₀ apigenina bile su 23,6 µg/mL, 35,2 µg/mL i 40,2 µg/mL. Među tim stanicama, stanice T-24 bile su mnogo osjetljivije na apigenin u usporedbi s ostalim staničnim linijama. Najjača snaga apigenina na citotoksičnost stanica karcinoma bila je prema stanicama raka mokraćnog mjehura T-24, stoga je odabrana stanična linija T-24 za podsekvencijalne eksperimente u ovom istraživanju. Apigenin nije imao značajan citotoksični učinak na staničnu liniju WI-38. Kako bi se testirao osnovni mehanizam koji dovodi do gubitka stanične proliferacije izazvanog apigeninom, promatrao se učinak apigenina na stanice T-24. Stanice T-24 tretirane su s 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL i 50 µg/mL apigenina tijekom 24 sata i podvrgnute protočnoj citometriji. Uočena je prividna nakupina stanica u fazi sub-G1 (hidroploidna faza) od 6,2% do 78,5%. Liječenje apigeninom značajno je smanjilo postotak u G2/M fazi (G2

faza mitoze). Ti su rezultati pokazali da apigenin inhibira proliferaciju T-24 stanica (40).

S obzirom na to da se tek odnedavno počelo istraživati citotoksično djelovanje biljaka na humane karcinomske stanične linije kao novi pristup za tretiranje karcinoma, ne postoji velik broj istraživanja koja potvrđuju navedeno, stoga smo u ovom radu odlučili ispitati citotoksično djelovanje slabo poznate, a prirodnim spojevima bogate kapare (*Capparis spinosa* L.). Dakle, predmet našeg istraživanja bila je kapara iz Splita (mikrovalna destilacija i ekstrakcija) i kapara s Brača (mikrovalna destilacija i ekstrakcija te hidrodestilacija po Clevengeru). Promatran je citotoksični učinak kapara na dvije stanične linije humanih karcinoma: T24 (karcinom mokraćnog mjehura) i MDA-MB-231 (karcinom dojke).

Utjecaj kapare na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 značajan je pri koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najveći citotoksični učinak imala je kapara s Brača čiji je ekstrakt dobiven mikrovalnom destilacijom. Taj učinak bio je vidljiv pri koncentraciji 50 µg/mL u vremenu inkubacije od 72 sata.

U odnosu na gore navedeno istraživanje gdje se proučavalo djelovanje apigenin flavonoida na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 čiji je IC₅₀ iznosio 23,6 µg/mL za 24h inkubaciju, IC₅₀ ekstrakta kapare s Brača dobiven mikrovalnom destilacijom pri 24h inkubaciji iznosio je 16,15 µg/mL. Ovaj rezultat nam govori kako je manji postotak metabolički aktivnih stanica T24 tretiranih ekstraktom kapara s Brača u odnosu na tretiranje T24 stanica s apigeninom 24 inkubacijom.

Istraživanje na stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 pokazalo je kako kapare imaju značajan učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica. To je najviše vidljivo pri većim koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najznačajniji učinak ostvaren je s kaparom s Brača čiji je ekstrakt dobiven

mikrovalnom ekstrakcijom. Taj učinak je vidljiv pri koncentraciji 10 µg/mL u vremenu 72h inkubacije.

Prema vidljivim rezultatima istraživanja može se zaključiti kako ekstrakti kapare bolje djeluju na staničnu liniju MDA-MB-231, u odnosu na MCF7 koja je navedena prethodno. U vremenu inkubacije od 72 sata stanična linija MDA-MB-231 pokazuje manji postotak metabolički aktivnih stanica. Pretpostavka je kako se radi o različitom načinu dobivanja ekstrakta kapare (*Capparis spinosa* L.).

Dobiveni rezultati pokazuju nam kako biljna vrsta *Capparis spinosa* L. posjeduje važna kemoprotektivna i antitumorska svojstva. Njih smo pokazali u našem *in vitro* istraživanju na stanicama karcinoma dojke i mokraćnog mjehura. Citotoksični učinak tj. postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica ovisi o vremenu izlaganja i njihovoj koncentraciji. Dakle, glavna hipoteza istraživanja je potvrđena i cilj je ostvaren. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja koja bi dala širu sliku njihove učinkovitosti. Također, potrebna su *in vivo* ispitivanja koja bi utvrdila pozitivne učinke spojeva iz ove biljne vrste, kako bi se mogli uvrstiti u terapije različitih bolesti.

6. ZAKLJUČAK

In vitro izlaganje stanica karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24) ekstraktima kapare (*Capparis spinosa* L.) izoliranih različitim metodama izolacije dovodi do smanjenog preživljenja karcinomskih stanica. Ispitivani ekstrakti kapare ostvaruju citotoksičan učinak koji ovisi o koncentraciji i vremenu inkubacije. Djelovanje ekstrakta kapare nije u svakom slučaju razmjerno povećanju vremena inkubacije i koncentracije što posljedično dovodi do neobjašnjivog oporavka stanica. Citotoksični učinak kapara (*Capparis spinosa* L.) je potvrđen, što je ujedno i hipoteza ovog rada. Budući da ne postoji ovakvo istraživanje tj. citotoksični učinak kapara na MDA-MB-231 i T24 stanične linije, bilo bi dobro ponoviti eksperiment za daljnju potvrdu rezultata i ovisno o dobivenim rezultatima, ako je potrebno, eksperiment nadograditi. Sljedeći korak bio bi potvrđivanje ovih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma dojke i mokraćnog mjehura kod životinja.

7. LITERATURA

1. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. KLINIČKA ONKOLOGIJA - 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 3-4. str.
2. Katičić M. Citotoksično Djelovanje *Lepidium* spp. na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom. Diplomski rad. [Split]: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet; 2018.
3. Cancer [Internet]. World Health Organization. [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
4. Svjetski dan raka 2020 [Internet]. HRVATSKI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO. [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-raka-2020/>
5. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. KLINIČKA ONKOLOGIJA - 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 4-10. str.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. siječanj 2000.;100(1):57–70.
7. The p53 Gene and Cancer Development [Internet]. DrJockers.com. 2015 [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <http://drjockers.com/p53-gene-cancer-development/>
8. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon AP, Resnick MJ, i ostali. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol*. 01. veljača 2016.;69(2):300–10.
9. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. KLINIČKA ONKOLOGIJA - 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 156-159. str.
10. Bladder Cancer: Practice Essentials, Background, Anatomy. 26. kolovoz 2020. [citirano 27. kolovoz 2020.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/438262-overview#showall>
11. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Bladder Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. U: PDQ Cancer Information Summaries [Internet].

Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66044/>

12. Bladder Cancer Treatment & Management: Approach Considerations, Treatment of Non-Muscle-Invasive Disease (Ta, T1, CIS), Treatment of Muscle-Invasive Disease (T2 and Greater). 26. kolovoz 2020. [citirano 27. kolovoz 2020.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/438262-treatment#showall>

13. Bladder Cancer Workup: Approach Considerations, Complete Blood Count and Chemistry Panel, Urinalysis and Urine Culture [Internet]. [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/438262-workup#c10>

14. Bladder Cancer Staging: TNM Classification for Bladder Cancer. 15. siječanj 2020. [citirano 27. kolovoz 2020.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/2006834-overview>

15. Bladder Cancer Medication: Antineoplastics, Antimetabolite, Antineoplastics, Vinca Alkaloid, Antineoplastics, Anthracycline, Antineoplastics, Alkylating, Antineoplastics, Antimicrotubular, PD-1/PD-L1 Inhibitors, FGFR Inhibitors, Anti-Nectin-4 Monoclonal Antibodies [Internet]. [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/438262-medication>

16. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. KLINIČKA ONKOLOGIJA - 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 203-213. str.

17. Breast Cancer Histology: Overview, Ductal Carcinoma In Situ, Lobular Carcinoma In Situ. 15. siječanj 2020. [citirano 27. kolovoz 2020.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/1954658-overview>

18. Breast Cancer: Practice Essentials, Background, Anatomy. 16. srpanj 2020. [citirano 27. kolovoz 2020.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/1947145-overview>

19. Breast Cancer Workup: Approach Considerations, Breast Cancer Screening, Positron Emission Tomography [Internet]. [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/1947145-workup>

20. Breast Cancer Treatment & Management: Approach Considerations, Treatment of Invasive Breast Cancer, Systemic Adjuvant Therapy for Breast

- Cancer. 16. srpanj 2020. [citirano 27. kolovoz 2020.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/1947145-treatment>
21. Surgical Treatment of Breast Cancer: Practice Essentials, Overview, Lumpectomy. 10. travanj 2020. [citirano 27. kolovoz 2020.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/1276001-overview>
22. Adjuvant Therapy for Breast Cancer: Practice Essentials, Overview, Combination Regimens for Breast Cancer. 16. srpanj 2020. [citirano 27. kolovoz 2020.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/1946040-overview>
23. Zhang H, Ma ZF. Phytochemical and Pharmacological Properties of *Capparis spinosa* as a Medicinal Plant. *Nutrients* [Internet]. 24. siječanj 2018. [citirano 03. rujan 2020.];10(2). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5852692/>
24. Nabavi SF, Maggi F, Daglia M, Habtemariam S, Rastrelli L, Nabavi SM. Pharmacological Effects of *Capparis spinosa* L. *Wiley Online Libr.* 2016.;30(11):1733–44.
25. Kovačić S, Nikolić T, Ruščić M, Milović M, Stamenković V, Mihelj D, i ostali. *Flora jadranske obale i otoka - 250 najčešćih vrsta*. Školska knjiga; 2008.
26. *Flora Croatica Database* : 12481 [Internet]. [citirano 03. rujan 2020.]. Dostupno na: <https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=12481&taxon=Capparis+orientalis+Veill>.
27. *Capparis spinosa* L. [Internet]. [citirano 07. rujan 2020.]. Dostupno na: <https://www.gbif.org/species/6370689>
28. Ji Y-B, Dong F, Ma D-B, Miao J, Jin L-N, Liu Z-F, i ostali. Optimizing the Extraction of Anti-tumor Polysaccharides from the Fruit of *Capparis spinosa* L. by Response Surface Methodology. *Molecules*. 14. lipanj 2012.;17(6):7323–35.
29. T24 ATCC® HTB-4™ *Homo sapiens* urinary bladder transitional [Internet]. ATCC: The Global Bioresource Center. [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-4.aspx>
30. MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™ [Internet]. ATCC: The Global Bioresource Center. [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>

31. NÜVE | EC 160 CO2 [Internet]. NÜVE laboratory & sterilization technology. [citirano 27. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://www.nuve.com.tr/Products/Incubation/ec-160-co2>
32. Basics of Cancer [Internet]. WebMD. [citirano 08. rujan 2020.]. Dostupno na: <https://www.webmd.com/cancer/guide/understanding-cancer-basics>
33. Cancer [Internet]. World Health Organization. [citirano 08. rujan 2020.]. Dostupno na: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cancer>
34. Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, Ng CF. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep*. 18. siječanj 2018.;8(1):1129.
35. Fitzmaurice C, Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 2006 to 2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. *J Clin Oncol*. 20. svibanj 2018.;36(15_suppl):1568–1568.
36. Britt KL, Cuzick J, Phillips K-A. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. kolovoz 2020.;20(8):417–36.
37. (PDF) Nutraceutical Properties of Capparis spinosa as a Mediterranean Medicinal Plant Phyto-chemicals and Ethanobotany [Internet]. ResearchGate. [citirano 08. rujan 2020.]. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/332528270_Nutraceutical_Properties_of_Capparis_spinosa_as_a_Mediterranean_Medicinal_Plant_Phyto-chemicals_and_Ethanobotany
38. Moghadamnia Y, Mousavi Kani SN, Ghasemi-Kasman M, Kazemi Kani MT, Kazemi S. The Anti-cancer Effects of Capparis spinosa Hydroalcoholic Extract. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2019.;11(1):43–7.
39. Kulisic-Bilusic T, Schmöller I, Schnäbele K, Siracusa L, Ruberto G. The anticarcinogenic potential of essential oil and aqueous infusion from caper (*Capparis spinosa* L.). *Food Chem*. svibanj 2012.;132(1):261–7.
40. Shi M-D, Shiao C-K, Lee Y-C, Shih Y-W. Apigenin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human bladder cancer T-24 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Cell Int*. prosinac 2015.;15(1):33.

8. ŽIVOTOPIS

Ivana Gabela

Datum rođenja: 14/09/1996 | Državljanstvo: hrvatsko | Spol: Žensko | (+385)
996767204 | ivanagabela96@gmail.com | Kukuljevićeva 12, 21000, Split, Hrvatska

● OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

01/10/2018 – TRENUTAČNO – Radmile Matejčić 2, Rijeka

Magistra istraživanja i razvoja lijekova; mag.pharm.inv. – Odjel za
Biotehnologiju; Sveučilište u Rijeci

Diplomski rad na temu: Citotoksično djelovanje kapara (*Capparis spinosa* L.) na različite stanične linije humanih karcinoma

01/10/2015 – 10/09/2018 – Ulica Ruđera Boškovića 35, Split, Hrvatska

Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) kemije; univ.bacc.chem. – Kemijsko-
tehnološki fakultet; Sveučilište u Splitu

Završni rad na temu: Elektrokemijsko ponašanje MnO₂ modificirane elektrode of ugljikove paste u svrhu određivanja vodikovog peroksida

● JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: HRVATSKI

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLESKI	B2	C2	B2	B2	B2

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

● DIGITALNE VJEŠTINE

Microsoft Office (Microsoft Word Microsoft Excel Microsoft Powerpoint) | Internet |
Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer)

● RADNO ISKUSTVO

07/2017 – Split, Hrvatska

RAD U LABORATORIJU – Medicinski fakultet Split;

Sveučilište u Splitu; Stručna praksa

2016 – 2020 – Split; Rijeka, Hrvatska

ZAPRIMANJE UPITA, ZAHTJEVA I PRIGOVORA KORISNIKA – Hrvatski Telekom d.d.

2016 – 2020 – Split, Hrvatska

ISPOMOĆ U TRGOVINI – Zara Hrvatska d.o.o.

2015 – 2016 – Split, Hrvatska

POMOĆNIK/POMOĆNICA U TRGOVINI – MULLER TRGOVINA ZAGREB d.o.o.

STIPENDIJE

2018 – 2020

Stipendija grada Splita

2017 – 2018

Državna STEM stipendija

2013 – 2017

Braniteljska stipendija

2012 – 2013

Sportska stipendija grada Splita

● VOZAČKA DOZVOLA

Vozačka dozvola: AM

Vozačka dozvola: B