

# Citotoksično djelovanje glukozinolata izoliranih iz autohtone vrste raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* L. na stanice raka debelog crijeva

---

**Kossjanenko, Marie Lucia**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:951853>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#) / [Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-27**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Odjel za biologiju

Marie - Lucia Kossjanenko

**Citotoksično djelovanje glukozinolata  
izoliranih iz autohtone vrste raštike *Brassica  
oleracea* var. *acephala* L. na stanice raka  
debelog crijeva**

Završni rad

Split, 2022.

# IZJAVA

kojom izjavljujem punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom „**Citotoksično djelovanje glukozinolata izoliranih iz autohtone vrste raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* L. na stanice raka debelog crijeva**“ izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Željane Fredotović. U radu sam primijenila metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

## **Citotoksično djelovanje glukozinolata izoliranih iz autohtone vrste raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* L. na stanice raka debelog crijeva**

Marie - Lucia Kossjanenko

### **SAŽETAK**

Raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) pripada porodici krstašica (kupusnjača) (lat. *Brassicaceae*) koje se od davnina koriste u ljudskoj prehrani, a poznat su izvor biološki aktivnih spojeva. Istraživanja su pokazala da raštika, kao i ostale vrste porodice krstašica, obiluje sumporom bogatim spojevima glukozinolata, koji povoljno djeluju na ljudsko zdravlje. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati citotoksično djelovanje triju glukozinolata (sinigrina, glukioiberina i progoitrina) izoliranih iz raštike na stanice raka debelog crijeva (HCT116). Sva tri izolirana glukozinolata uspješno su zaustavila rast tumorskih HCT116 stanica. Najveću aktivnost imao je glukioiberin ( $IC_{50} = 51,67 \mu\text{g/mL}$ ), upola slabiju aktivnosti progoitrin ( $IC_{50} = 156,31 \mu\text{g/mL}$ ), a najmanju sinigrin ( $IC_{50} = 1128,67 \mu\text{g/mL}$ ). Rezultati ukazuju na to da testirani glukozinolati imaju značajan citotoksični potencijal što otvara mogućnost daljnjeg istraživanja njihove biološke aktivnosti i mogućeg korištenja u razvoju novih vrsta prirodnih kemoterapeutskih spojeva.

**Ključne riječi:** glukozinolati, rak debelog crijeva, raštika, citotoksično djelovanje

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Splitu.

**Rad sadrži:** 18 stranica, 9 grafičkih prikaza i 25 literarnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor/-ica:** doc. dr. sc. Željana Fredotović

**Ocjenjivači:** doc. dr. sc. Željana Fredotović

izv. prof. dr. sc. Ivica Ljubenković

doc. dr. sc. Ivica Šamanić

## Basic documentation card

University of Split

B. Sc. Thesis

Faculty of science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

### **The cytotoxic effect of glucosinolates derived from domestic species of borecole *Brassica oleracea* var. *acephala* L. on colon cancer cells**

Marie - Lucia Kossjanenko

#### **ABSTRACT**

Borecole (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) belongs to the cruciferous family (lat. *Brassicaceae*), which has been used in human nutrition since ancient times and is a well-known source of biologically active compounds. Research has shown that borecole, like other species of the cruciferous family, is rich in sulfur-containing glucosinolate compounds that have beneficial effects on human health. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of three glucosinolates (sinigrine, glucoiberine, and progoitrine) isolated from borecole on colon cancer cells (HCT116). All three isolated glucosinolates successfully stopped the growth of HCT116 tumor cells. Glucoiberine had the highest activity (IC<sub>50</sub> = 51.67 µg/mL), progoitrine (IC<sub>50</sub> = 156.31 µg/mL) had half the activity, and sinigrine (IC<sub>50</sub> = 1128.67 µg/mL) had the lowest activity. The results suggest that the tested glucosinolates have a significant cytotoxic potential, which opens the possibility of further exploring of their biological activity and using them in the development of new types of natural chemotherapeutic compounds.

**Key words:** glucosinolates, colon cancer, borecole, cytotoxic effect

Thesis deposited in library of Faculty of Science, University of Split.

**Thesis consists of:** 18 pages, 9 graphic figures and 25 references. Original language: croatian.

**Supervisor:** Željana Fredotović, Ph.D. Assistant professor

**Reviewers:** Željana Fredotović, Ph.D. Assistant professor

Ivica Ljubenkov, Ph.D. Associate professor

Ivica Šamanić, Ph.D. Assistant professor

Ovaj rad, izrađen u Splitu 2022. godine pod mentorstvom doc. dr. sc. Željane Fredotović, predan je na ocjenjivanje Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice Biologije.

# ***Zahvala***

*Mentorici, prof. Željani Fredotović, veliko hvala na dugogodišnjoj potpori, neiscrpnom razumijevanju i iznimnom strpljenju.*

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Raštika</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Glukozinolati</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Rak debelog crijeva</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>HIPOTEZA I CILJEVI</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Hipoteza</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Ciljevi</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIJALI</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Izolirani spojevi glukozinolata</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Stanice raka debelog crijeva</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Otopine i puferi</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2</b>	<b>METODE</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Kultivacija i propagacija stanica</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Određivanje metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom</b> .....	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>14</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>16</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>17</b>



# 1 UVOD

## 1.1 Raštika

Raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) dvogodišnja je zeljasta biljka iz porodice kupusnjača tj. krstašica (lat. *Brassicaceae*) ( $2n = 2x = 18$ ) (Slika 1). Ime varijeteta *acephala* dolazi iz grčkog jezika i znači bez glave (*a* – bez, *kephala* – glava). Ima uspravnu nerazgranatu stabljiku koja može narasti do 150 cm visine. Korijen je vretenast i jako dobro razgranat. Listovi su plavozelene boje, mesnati, prema bazi zaokruženi, s izraženom nervaturom i nalaze se na zadebljalim drškama kojima dijelom obuhvaćaju stabljiku. U drugoj godini stvaraju se žuti cvjetovi skupljeni u rahle grozdaste cvatove. Plod je komuška koja sadrži okruglaste, crvenkaste sjemenke. (Gligić, 2010)

Raštika je veoma izdržljiva biljka. Ljeti podnosi visoke temperature i sušu, a zime veoma niske temperature i snijeg. Prilagodljiva je i dostupna tijekom cijele godine. Kao kultivar uzgaja se u vrtovima u priobalnom dijelu Hrvatske, na otocima i u Hercegovini. (Šoš, 2013) Osim u Hrvatskoj, rasprostranjena je u ostalim državama južne Europe, na sjeveru Južne Amerike i na jugu Afrike. (Parsons, 2014)

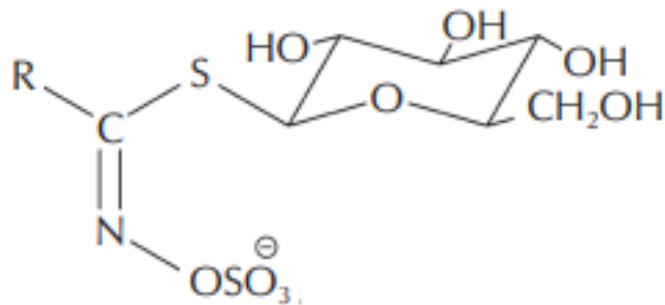
Nutritivne i ljekovite vrijednosti raštike otkrivene su prije svega nekoliko godina. Bogata je vitaminima A, C i K, mineralima kalcija, kalija i mangana te sadrži vlakna korisna za ljudsku probavu. (Encyclopaedia, 2022) Znanstvena istraživanja su pokazala da raštika, kao i ostale vrste porodice *Brassicaceae*, sadrži velike količine glukozinolata, spojeva sa sumporom koji blagotvorno utječu na zdravlje. Dokazano je kako glukozinolati imaju antikancerogena svojstva, a različite sorte kupusnjača mogu biti njihov glavni izvor. (Kalloo, 1993)



Slika 1 Autohtona raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) (Encyclopaedia, 2022)

## 1.2 Glukozinolati

Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti i pripadaju specifičnoj skupini kemijskih spojeva, tzv. „fitokemikalijama“. Po kemijskoj strukturi to su  $\beta$  – tioglukozid – N – hidroksisulfati, kod kojih su glukoza i sulfatna skupina vezani za aglikon nastao iz aminokiselina i njihovih derivata (Slika 2). Međusobno se razlikuju prema strukturi bočnog lanca kojeg određuje aminokiselina. Prema strukturi bočnog lanca dijele se na alifatske, aromatske i indolne glukozinoliate. Zastupljeni su u 16 porodica roda *Capparales* od kojih je za ljudsku prehranu najbitnija porodica *Brassicaceae*. (Blažević, 2020)

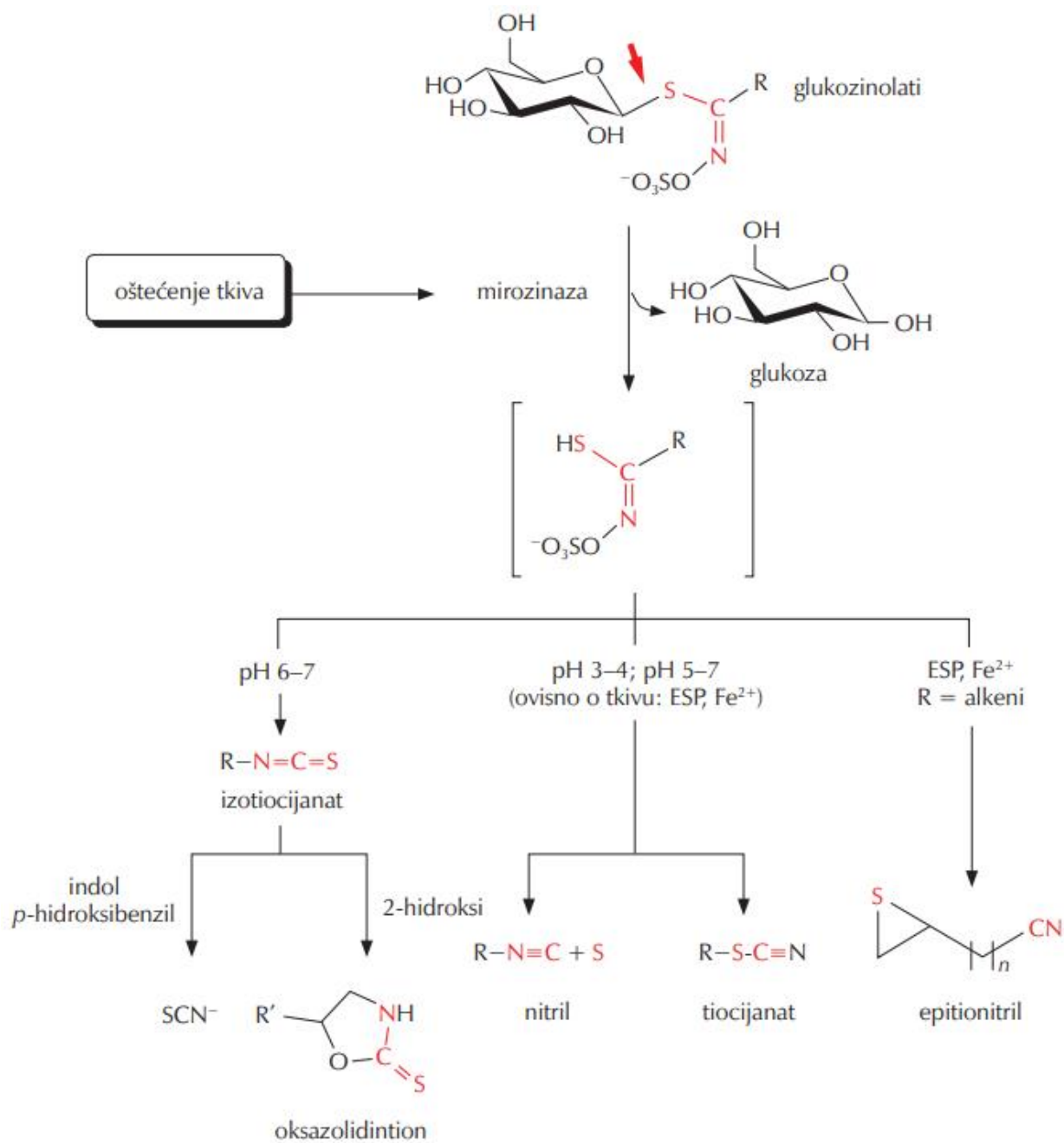


Slika 2 Osnovna struktura glukozinolata, (Blažević, 2020)

Biosinteza glukozinolata može početi deaminacijom početne aminokiseline u 2 – oksokiselinu koja prolazi niz reakcija. Kao produkt nastaje aminokiselina s bočnim lancem produženim za CH<sub>2</sub> skupinu. Potom se aminokiselina s produženim lancem pretvara u međuprodukt aldoksim. Drugi način nastanka aldoksima iz aminokiseline je bez produžetka lanca. U oba slučaja daljnje modifikacije poput oksidacije, hidroksilacije, metoksilacije, sulfatacije i glikozilacije obavljaju enzimi o kojima ovisi koja vrsta glukozinolata će nastati. (Zekić, 2013)

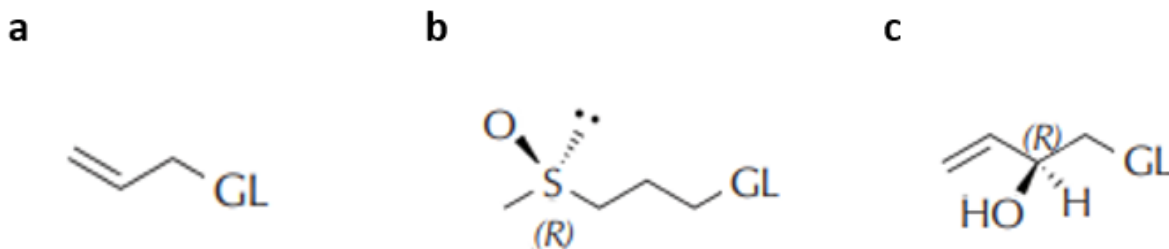
Glukozinolati se razgrađuju enzimom mirozinazom. To je enzim hidrolize koji cijepa tioglikozidnu vezu odcjepljivanjem glukoze, a zatim se s nestabilnog aglikona eliminira sulfat Lossenovom pregradnjom (Slika 3). Struktura nastalih produkata ovisi o vrsti glukozinolata, dijelu biljke gdje se glukozinolati nalaze, tretmanu biljke prije hidrolize kao i uvjetima tijekom hidrolize (najviše o pH). Izotiocijanati obično nastaju pri pH 5-7, dok nitrili uglavnom nastaju prilikom hidrolize u jako kiselim uvjetima. Većina produkata hidrolize su stabilni spojevi, osim β-hidroksiizotiocijanata i indol glukozinolata. (Holst, 2004)

Mirozinazu sadrže sve biljke koje proizvode glukozinolate. Osim u biljkama mirozinaza nalazi se i u bakterijama probavnog trakta čovjeka i životinja. U zdravom biljnom tkivu enzim i glukozinolati odvojeni su što znači da su glukozinolati inaktivni. Tek pri oštećenju tkiva dolaze u kontakt s enzimom pri čemu dolazi do njihove hidrolize i aktivacije. Osim hidrolize potaknute mehaničkim oštećenjem glukozinolati se mogu razgraditi i termičkom obradom odnosno, kuhanjem. Provedeno je više studija koje su istraživale ljekovita svojstva produkata nastalih razgradnjom glukozinolata iz sirovih i kuhanih vrsta kupusnjača. Dokazano je na neki nastali produkti, poput sulforafana i alil – izotiocijanata, imaju jači antioksidativni učinak kada su dobiveni iz sirovih biljaka. (Rouzaud i sur., 2004)



Slika 3 Opća shema razgradnje glukozinolata (Blažević, 2020)

Glukozinolati korišteni u ovom istraživanju su sinigrin (prop – 2 enil – glukozinolat), glukoiberin ((Rs) – 3 – metilsulfinilpropil – glukozinolat) i progoitrin ((2R) – 2 – hidroksibut – 3 – enil – glukozinolat). Po strukturi pripadaju alifatskim glukozinolatima i građeni su od početne aminoksieline metionina (Slika 4). (Blažević, 2020) Sinigrin je najzastupljeniji u sjemenkama crne goruščice, prokulice i u stabljici brokule. Glavni je čimbenik koji tim namirnicama daje gorak okus, a njegova ljekovita svojstva poznata su više od 1000 godina. Stare indijske civilizacije koristile su ulje nastalo iz prešanih sjemenki koje su sadržavale sinigrin. (Mazumder, 2016) Progoitrin je veoma zastupljen u zelenim zeljastim kupusnjačama. Produkt njegove razgradnje je goitrin koji utječe na funkciju štitnjače. (Bischoff, 2021) Glukoiberin je najmanje zastupljen od navedenih glukozinolata. Produkt njegove razgradnje je iberin koji se smatra ključnim faktorom u smanjivanju oksidativnog stresa u stanicama. (Recio, 2017)



Slika 4 Shematski prikaz strukture glukozinolata sinigrina (a), glukoiberina (b) i progoitrina (c)

(Blažević, 2020)

### 1.3 Rak debelog crijeva

Rak debelog crijeva ili kolorektalni karcinom treći je najčešći dijagnosticirani karcinom u svijetu, a četvrti najčešći po smrtnosti. Godišnje od tumora debelog crijeva oboli oko 2 milijuna ljudi, a umre 0,95 milijuna. Trenutno predstavlja jedan od najvećih zdravstvenih problema u visoko razvijenim zemljama prevladavajući pretežito u Sjevernoj Americi, Europi i na istoku Azije. Na Europskoj ljestvici Hrvatska se nalazi na 9. mjestu po pojavnosti raka, a na 2. mjestu po smrtnosti. (Epidemiologija, 2022)

Vjerojatnost razvijanja karcinoma povećava se starenjem. Postoji više faktora koji mogu uzrokovati oboljenje. Veoma čest slučaj su mutacije koje se odvijaju u epitelnim stanicama crijevnih sluznica. Mutacije se mogu dogoditi na onkogenima, tumor supresorskim genima i genima vezanim za mehanizme popravka DNK. Mogu nastati tijekom života ili se prenositi generacijski s roditelja na potomke. Promjenom genetičkog materijala narušavaju se normalne funkcije u stanici. Tako oštećena stanica ne ulazi u proces programirane stanične smrti, tj. apoptoze pa se njihov životni ciklus ne može kontrolirati. Mogu se abnormalno dijeliti i stvarati benigne i maligne nakupine tkiva, tj. polipe. Polipi uglavnom izrastu kao benigne izrasline prema unutrašnjosti crijeva koje kasnije imaju mogućnost pretvoriti se u maligno tumorsko tkivo. U slučaju razvoja tumorskog tkiva, nakon dijagnoze, liječenje se provodi u vidu kirurškog odstranjivanja tkiva ili kemoterapije. (Mármol, 2017)

Na nastanak karcinoma i polipa znatno djeluju i okolišni čimbenici, odnosno prehrana. Namirnice koja sadrže mnogo vlakana - povrće, voće i sl., ne izazivaju izlučivanje žučnih kiselina. Stvara se stolica veće mase, a pokreti crijeva su brži zbog čega se moguće kancerogene tvari razrjeđuju, a njihov dodir sa sluznicom crijeva je kraći i brža je eliminacija sadržaja iz crijeva. Suprotno tome, prehrana temeljena na mastima i proteinima, poput crvenog mesa, uzrokuje jako izlučivanje žučnih kiselina i povišenje pH što povećava rizik od obolijevanja. Namirnice bogate antioksidansima smanjuju mogućnost razvijanja raka. Kupusnjače, poput raštike, koje obiluju glukozinolatima imaju ljekovito i blagotvorno djelovanje na zdravlje probavnog sustava. Daljnjim istraživanjem te skupine spojeva može se potencijalno doći do mogućnosti stvaranja novih prirodnih vrsta kemoterapeutika koji će pomoći u liječenju ove bolesti. (Roth, 2001)

## 2 HIPOTEZA I CILJEVI

### 2.1 Hipoteza

Glukozinolati sinigrin, glucoiberin i progoitrin, izolirani iz autohtone vrste raštike, mogu zaustaviti diobu stanica raka debelog crijeva.

### 2.2 Ciljevi

- Ispitati citotoksično djelovanje spojeva glukozinolata izoliranih iz raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* L. na stanice raka debelog crijeva (HCT116).
- Odrediti  $IC_{50}$  vrijednost pojedinog glukozinolata, odnosno koncentraciju pri kojoj je postignuta 50%-tna smrtnost stanica u funkciji vremena.

## **3 MATERIJALI I METODE**

### **3.1 MATERIJALI**

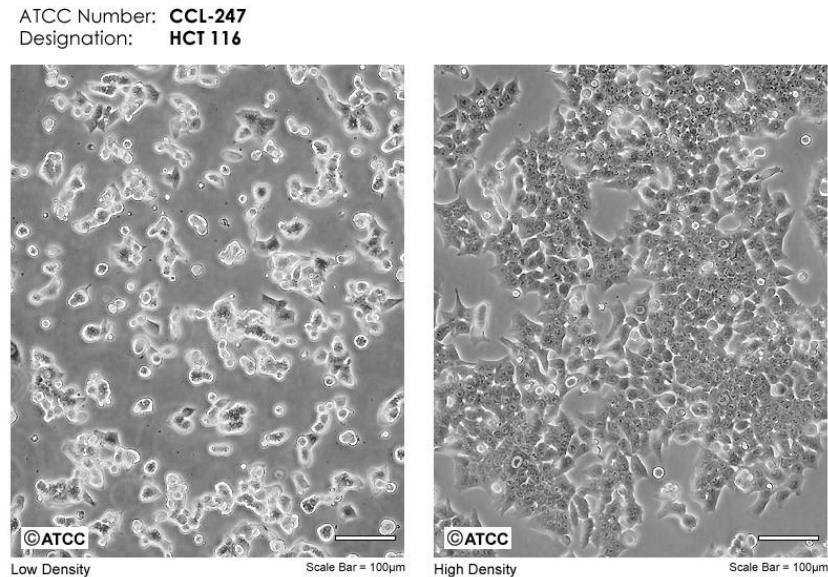
#### **3.1.1 Izolirani spojevi glukozinolata**

Pojedinačni spojevi glukozinolata prethodno su pripremljeni u laboratoriju Odjela za kemiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Splitu u okviru diplomskog rada pod voditeljstvom prof. Ljubenkova. Dobiveni su postupkom ekstrakcije iz liofiliziranog biljnog materijala pri čemu je u svaki uzorak dodano 3 mL metanola. Nakon ekstrakcije, uzorci su desulfatirani pomoću komercijalno dostupnog enzima desulfataze na ionskom izmjenjivaču. Za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih spojeva glukozinolata korištena je standardna metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza (HPCL - ISO 9167-1). Rezultati kromatografske analize obrađeni su softverom TotalChrom Workstation koji služi za upravljanje HPCL uređajem. Iz dobivenih je kromatograma određena vrsta i sadržaj pojedinog glukozinolata prema vanjskom standardu (sinigrin). Čisti spojevi, koji su sakupljeni tijekom kromatografije, čuvani su pri temperaturi od -18°C do korištenja. (Šoš, 2013) Neposredno prije provođenja eksperimenta citotoksičnosti, izolirani spojevi su upareni do suha kako bi se potpuno uklonilo otapalo te su otopljeni u 1% DMSO. Korišteni su spojevi sinigrina početne koncentracije 2000 µg/mL, glukoiiberina koncentracije 100 µg/mL i progoitrina koncentracije 300 µg/mL.



### 3.1.2 Stanice raka debelog crijeva

Eksperiment je proveden na HCT116 staničnoj liniji (Slika 5). Stanice su donacija prof. Janoša Terzića s Medicinskog fakulteta u Splitu. Navedena stanična linija dobivena je izolacijom iz debelog crijeva muškarca koji je bolovao od karcinoma debelog crijeva. Sve stanice imaju mutaciju na kodonu 13 RAS proto - onkogen. (Schroy, 1995)



Slika 3 Mikroskopska slika HCT116 stanica raka debelog crijeva male gustoće nasadenosti (**lijevo**) i velike gustoće nasadenosti (**desno**) (preuzeto i prilagođeno sa stranice ACTT <https://www.atcc.org/products/ccl-247>)

### 3.1.3 Otopine i puferi

DMEM (Dulbecco's modified medium) hranjivi medij

FBS (fetal bovine serum) fetalni goveđi serum

MTS reagens (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)

antibiotik PEN/STREP

Tripsin

DMSO

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Kultivacija i propagacija stanica

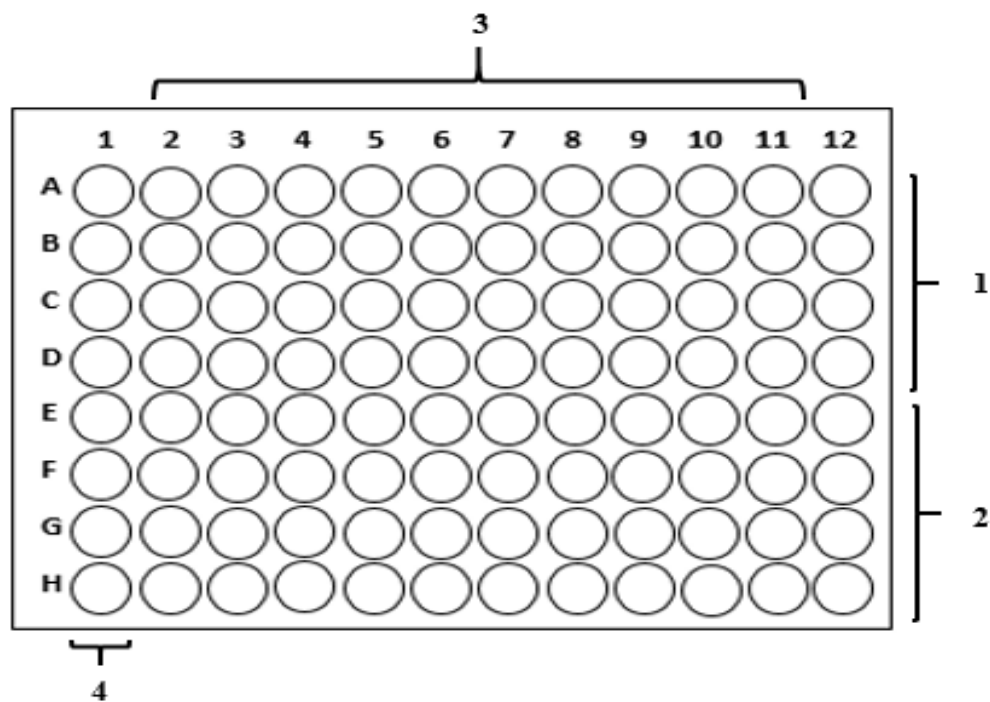
Nakon odmrzavanja, stanična linija HCT116 uzgojena je u vlažnom inkubatoru pri 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, u mediju Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) obogaćenim fetalnim goveđim serumom (FBS) i PEN/STREP (penicilin/streptomycin) antibiotikom. Stanice su se rasađivale svakih 48 h kada bi ploča postigla 80 – 100% konfluentnosti. Prilikom rasađivanja, uklonio se stari medij te se dodatkom tripsina odlijepilo stanice od podloge. Na novu ploču sa svježim medijem nasadile su se stanice te ostavile da rastu idućih 48 sati pri 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Određivanje metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom

MTS proliferacijski test je kolorimetrijska metoda za određivanje citotoksičnog potencijala određenih tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS u obojeni formazanski produkt. Prije nacjepljivanja, stanice se odljepljuju s ploče te prebacuju u falkon epruvetu od 15 mL. Kako bi se odredila koncentracija stanica korišten je brojač stanica (Scepter 3.0 Handheld Cell Counter, Millipore) s nastavkom promjera 60 µm. U eppendorf tubicu od 2 mL prebacuje se 100 µL suspenzije stanica iz falkon epruvete. Zatim se uz pomoć brojača odredi koncentracija stanica u suspenziji. Stanice se razrjeđuju do željene koncentracije od 1 x 10<sup>5</sup> st/mL. Mikrotitarske pločice sa 96 jažica (Slika 6) nacjepljuju se suspenzijom stanica u koncentraciji od 1 x 10<sup>5</sup> st/mL. U prvi stupac jažica dodaje se 100 µl svakog spoja glukozinolata i to redom sinigrina koncentracije 2000 µg/mL, glukioberina koncentracije 100 µg/mL i progoitrina koncentracije 300 µg/mL. 100 µl čistog medija DMEM dodaje se u donje četiri jažice posljednjeg stupca, a u prve četiri 50 µl stanica i 50 µl čistog medija. Iz prvog stupca uzima se 50 µl svakog glukozinolata te se prenese u idući stupac, dobro resuspendira, odpipetira 50 µl i prenese u slijedeći stupac. Postupak se ponavlja sve do predzadnjeg stupca kada se nakon resuspendiranja posljednjih 50 µl odsiše pomoću mikropipete i baci u otpad. Tako pripremljena mikrotitarska ploča ostavi se 48 sati u CO<sub>2</sub> inkubatoru pri 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Po isteku 48 sati inkubacije, doda se 20 µL MTS reagensa u sve

jažice te se mikrotitarska ploča dodatno inkubira 3 sata pri 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Nakon toga se na čitaču mikrotitarskih pločica mjeri apsorbancija pri 490 nm. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih stanica (netretiranih). Preživljavanje stanica odnosno vijabilnost određena je IC<sub>50</sub> vrijednošću.

Eksperiment je proveden tri puta.



Slika 4 Mikrotitarska pločica sa 96 jažica (engl. 96 well plate): 1 – medij (50  $\mu$ L) + stanice (50  $\mu$ L), 2 – čisti DMEM medij, kontrola- “blank” (50  $\mu$ L), 3 – stanice (50 $\mu$ L) + medij u kojem je resuspendiran ekstrakt, 4 – 100  $\mu$ L čistog metanolnog ekstrakta (Bajić, 2019)

## 4 REZULTATI

Podaci dobiveni s čitača mikrotitarskih ploča obrađeni su u programu Excel.  $IC_{50}$  vrijednosti koncentracija glukozinolata iz tri neovisna eksperimenta prikazane su u tablici 1. Pripadajuće srednje vrijednosti i standardna devijacija prikazane su u tablici 2.

Tablica 1  $IC_{50}$  vrijednosti pojedinih glukozinolata triju neovisnih eksperimenata

<b>IC50 vrijednosti pojedinih glukozinolata ( <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> )</b>			
<b>VRSTA GLUKOZINOLATA</b>	<b>1. EKSPERIMENT</b>	<b>2. EKSPERIMENT</b>	<b>3. EKSPERIMENT</b>
<b>SINIGRIN</b>	1100.206	967.9882	1317.828
<b>GLUKOIBERIN</b>	52.5543	38.60283	63.94104
<b>PROGOITRIN</b>	164.3783	116.42	188.13703

Tablica 2 Srednje  $IC_{50}$  vrijednosti i standardna devijacija triju testiranih glukozinolata

<b>VRSTA GLUKOZINOLATA</b>	<b>SREDNJA VRIJEDNOST ( <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> )</b>	<b>STANDARDNA DEVIJACIJA</b>
<b>SINIGRIN</b>	<b>1128.674</b>	<b>144.233</b>
<b>GLUKOIBERIN</b>	<b>51.6998</b>	<b>10.3619</b>
<b>PROGOITRIN</b>	<b>156.3118</b>	<b>29.82879</b>

Prema dobivenim podacima napravljen je graf iz kojeg se jasno uočava da najveću citotoksičnu aktivnost na stanice raka debelog crijeva ima glukoiberin ( $IC_{50} = 51,67 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Nešto slabiju sposobnost inhibicije rasta stanica pokazao je progoitrin ( $IC_{50} = 156,31 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), a najslabiji učinak imao je sinigrin ( $IC_{50} = 1128,67 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Graf 1).



Graf 1 Citotoksična aktivnost glukozinolata sinigrina, glukoiberina i progoitrina izoliranih iz raštike. Prikazane IC<sub>50</sub> vrijednosti su srednje vrijednosti koncentracija dobivenih iz triju neovisnih eksperimenata s pripadajućom standardnom devijacijom (▬)

## 5 RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati citotoksično djelovanje triju glukozinolata, sinigrina, glukoiberina i progoitrina, izoliranih iz autohtone raštike, na stanice raka debelog crijeva. Dobiveni rezultati (prikazani u tablici 1 i 2 te grafu 1) pokazuju da sva tri glukozinolata uspješno inhibiraju rast i dijeljenje kancerogenih stanica, što potvrđuje postavljenu hipotezu. Najjače inhibitorno djelovanje pokazuje glukoiberin koji pri koncentraciji od 51,67 µg/mL uništava 50% stanica. Nešto slabije djelovanje ima progoitrin, dok najslabije djeluje sinigrin.

Snažan citotoksični učinak navedenih spojeva, pogotovo glukoiberina, dokaz je da autohtona raštika kao i ostale vrste krstašica ima iznimnu antiproliferativnu i druge biološke aktivnosti koje dokazano utječu na inhibiciju rasta tumorskih stanica. (Sundaram, 2020) Istraživanja provedena na različitim vrstama krstašica (kupusnjača) otkrila su mehanizam antioksidativnog utjecaja glukozinolata i produkata njihove razgradnje. Supresija rasta tumorskih stanica objašnjava se djelovanjem spojeva na enzime biotransferaze faze 1, enzime detoksifikacije faze 2 te na proces apoptoze. Enzimi biotransferaze faze 1 djeluju na prekancerogene tvari povećavajući reaktivnost hidrofobnih dijelova određenih molekula, a enzimi detoksifikacije faze 2 poboljšavaju topljivost dobivenih spojeva u vodi te na taj način omogućuju njihovu eliminaciju iz stanice, a time i iz organizma. Glukozinolati i razgradni produkti (izotiocijanini) povećavaju aktivnost enzima i djeluju na transkripciju gena koji ih kodiraju. (Higdon, 2005) Također je ustanovljeno da glukozinolati djeluju i na regulatore staničnog ciklusa (cikline i ciklin ovisne kinaze) te gene koji pospješuju migraciju tumorskih stanica. U eksperimentu provedenom na miševima uočeno je smanjenje rasta tumorskog tkiva u kojem je tretman izotiocijanatom inducirao apoptozu stanica. (Zhao, 2016) Sličnim eksperimentom ustanovljeno je inhibitorno djelovanje razgradnog produkta sulforafana na ekspresiju gena zaslužnog za migraciju stanica raka. (Guerrero-Beltrán, 2012)

Reidl i sur. (2008) testirali su djelovanje glukozinolata klica brokule na humanim subjektima. Rezultati istraživanja potvrdili su antioksidativni utjecaj sulforafana na ekspresiju gena koji kodiraju enzime detoksifikacije faze 2. U novijoj studiji, Furdak i sur. (2022) koristili su ekstrakte dobivene iz lisnatog kelja. Ispitivanja su proveli *in vitro* na dvije stanične linije raka jajnika te uspješno dokazali antiproliferativni učinak korištenih glukozinolata.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju u korelaciji su s rezultatima istraživanja Sundarama i sur. (2020). U navedenom istraživanju korištena je metoda nanočestica bakra kojom se testirao antiproliferativni učinak glukozinolata raštike na stanice raka grlića maternice. Eksperimentom je dokazano izvrsno antiproliferativno djelovanje korištenih spojeva na kancerogene stanice.

Rezultati ovog istraživanja nepobitno dokazuju antikancerogeni utjecaj sinigrina, glukoiberina i progoitrina na stanice raka debelog crijeva. Inhibicija rasta HCT116 tumorskih stanica postignuta je pri veoma niskim koncentracijama glukozinolata glukoiberina i progoitrina, što pokazuje njihov snažan citotoksični učinak. Izuzetak je sinigrin, koji je inhibirao rast stanica pri većoj koncentraciji. Dosadašnja *in vivo* istraživanja potvrdila su da živi organizmi uspješno koriste biološka svojstva glukozinolata i njihovih razgradnih produkata. To objašnjava zdravstvenu važnost uvrštavanja raštike i ostalih krstašica (kopusnjača) u svakodnevnu prehranu. Potrebno je provesti dodatna ispitivanja biološke aktivnosti glukozinolata izoliranih iz krstašica kako bi se potvrdio njihov pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Antikancerogeno djelovanje glukozinolata iz autohtone vrste raštike moguće je potvrditi tek nakon provedbe *in vivo* istraživanja i kliničkih ispitivanja što bi omogućilo njihovu primjenu u razvoju novih prirodnih vrsta terapeutika.

## 6 ZAKLJUČCI

- 1) Dodatak čistih spojeva sinigrina, glukoiberina i progoitrina izoliranih iz raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) inhibira rast i diobu stanica raka debelog crijeva (HCT116).
- 2) Glukoiberin pokazuje najveću citotoksičnu aktivnost na stanice raka debelog crijeva (HCT116).
- 3) Slabiji citotoksični učinak na stanice raka debelog crijeva (HCT116) pokazali su glukozinolati progoitrin i sinigrin.



## 7 LITERATURA

1. Anisha Mazumder, A. D. (24.. travanj 2016). Sinigrin and Its Therapeutic Benefits. *Molecules*.
2. Bajić, D. (2019). Djelovanje metanolnih ekstrakata *Allium x cornutum* i *Allium cepa* na preživljavanje HeLa stanica. Split .
3. Birgit Holst, G. W. (2004). A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Natural Products Report Journal*.
4. Blažević, I. (2020). Doprinos istraživanju glukozinolata (2005. - 2020.): Strukturna raznolikost, razgradnja i biološki potencijal. *Kemijska Industrija*, str. 541 - 555.
5. Encyclopaedia, T. E. (23.. lipanj 2022). *Collard*. Dohvaćeno iz Britannica: <https://www.britannica.com/plant/collard>
6. Epidemiologija, S. z. (11.. ožujak 2022). *Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj*. Dohvaćeno iz Hrvatski zavod za javno zdravstvo: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/epidemiologija-raka-debelog-crijeva-u-hrvatskoj/>
7. Furdak, P. (20.. kolovoz 2022.). Extracts of Common Vegetables Inhibit the Growth of Ovary Cancer Cells. *Foods*.
8. Gligić, V. (2010). *Rastika (iz knjige "Etimološki botanički rečnik")*. Dohvaćeno iz Plantea: <https://www.plantea.com.hr/rastika/>
9. Guerrero-Beltrán. (srpanj 2012). Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Experimental and toxicologic pathology*, str. 503-8.
10. Higdon, J. (2005). *Isothiocyanates*. Dohvaćeno iz Linus Pauling Institute, Oregon State University: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates>
11. Inés Mármol, C. S. i sur. (19. siječanj 2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*.
12. Jerry Parsons, S. C. (2014). *Greeks and Romans Grew Kale and Collards*. Dohvaćeno iz Texas A&M AgriLife Extension Service, Texas A&M University System: <https://aggie-horticulture.tamu.edu/archives/parsons/publications/vegetabletravelers/kale.html>
13. Kalloo, G. (1993). Kale: Brassica oleracea L. var. acephala. U G. K. Bergh, *Genetic Improvement of Vegetable Crops* (str. 187. - 190.). Pergamon Press.
14. L.Bischoff, K. (2021). Glucosinolates. U K. L.Bischoff, *Nutraceuticals* (str. 903-909). Academic Press.

15. Marina Zekić (2013). Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb.
16. P C Schroy, S. B. i sur. (1995). Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer*.
17. R.Recio, E. i sur. (2017). Biologically Active Isothiocyanates: Protecting Plants and Healing Humans. U *Studies in Natural Products Chemistry* (str. 167-242). Seville: University of Seville.
18. Reidl, M. A. (2008 ). Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clinical Immunology, Department of Medicine UCLA* .
19. Roth, A. (2001). Colorectal Cancer. *Medicus*, 191-199.
20. Rouzaud, G., i sur. (siječanj 2004). Hydrolysis of Glucosinolates to Isothiocyanates after Ingestion of Raw or Microwaved Cabbage by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*.
21. S. A. McNaughton i sur. (2003 ). Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *British Journal of Nutrition* , str. 687–697.
22. Šoš, S. (2013). *Određivanje vrsta i količine glukoziolata u autohtonim sortama kupusnjača (raštika)*. Split.
23. Soundararajan P. i sur. (15. studeni 2018 ). Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers. *Molecules* .
24. Sundaram, C. S. (6. studeni 2020). Antibacterial and anticancer potential of Brassica oleracea var. acephala using biosynthesised copper nanoparticles. *Medical Journal Malaysia*, str. 677-84.
25. Zhao, Z. (24. veljača 2016). Sulforaphane Attenuates Contrast-Induced Nephropathy in Rats via Nrf2/HO-1 Pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*.