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

Župić, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:821942

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Mirna Župić

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

Diplomski rad

Akademska godina 2016./2017.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, rujan, 2017. godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje:	Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje:	Farmacija
Nastavni predmet:	Medicinska kemija i biokemija
Tema rada	prihvaćena je na __. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na __.sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i __. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor:	izv. prof. dr. sc. Vedrana ČikešČulić
Pomoć pri izradi:	izv. prof. dr. sc. Vedrana ČikešČulić, doc. dr. sc. Mila Radan

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

Mirna Župić, broj indeksa 73

Sažetak:

Cilj istraživanja je bio ispitati citotoksični učinak određenih izotiocijanata iz porodice kupusnjača na dvije stanične linije humanih karcinoma: T24 i A1235. Korišteni izotiocijanati su: alil-, fenil-, benzil-, 2-fenil etil-, izopropil-, 4-metoksifenil-, 3-metoksifenil-, p-tolil- i 4-(metiltio)-fenil izotiocijanat. Stanice karcinoma mokraćnog mjehura tretirane su izotiocijanatima u koncentraciji od 5μM, 10μM, 0,5mM i 5mM, a stanice glioblastoma koncentracijama od 20 i 10μM. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama izotiocijanata te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj nam je citotoksične aktivnosti korištenih izotiocijanata.Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju T24 pokazao je izopropil izotiocijanat pri koncentraciji od 5mM nakon 72h inkubacije.

Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju A1235 pokazao je benzil izotiocijanat pri koncentraciji od 20μM nakon 24h inkubacije.Ispitivani izotiocijanati pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje izotiocijanata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica.Citotoksični učinak izotiocijanata, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma mokraćnog mjehura i glioblastoma kod životinja.

Ključne riječi: biljke, karcinom, citotoksičnost, MTTmetoda
Rad sadrži: 68 stranica, 35 slika, 12 tablica, 24 reference
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Janoš Terzić	predsjednik
2. doc. dr. sc. Ivana Mudnić	član
3. doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić	član-mentor

Datum obrane: rujan, 2017.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine

Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientificarea:	Biomedical sciences
Scientificfield:	Pharmacy
Course title:	Medical Chemistry and Biochemistry
Thesissubject:	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. __ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. __ and Faculty Council of School of Medicine, session no. __.
Mentor:	Assoc. prof. Vedrana ČikešČulić, PhD
Technicalassistence:	Assoc. prof. Vedrana ČikešČulić, PhD, Assist. prof. Mila Radan, PhD

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

Mirna Župić, index number 73

Summary:

The aim of this research was to examine cytotoxic effects of certain isothiocyanates from the Brassicaceae family of plants on two cell lines of human carcinomas, T24 and A1235. The used isothiocyanates were: allyl-, phenyl-, benzyl-, 2- phenyl, ethyl-, isopropyl-, 4-methoxyphenyl, 3-methoxyphenyl, p-tolyl and 4-(methylthio)phenyl. Urinary bladder cancer cells were treated with isothiocyanates in the concentrations of 5μM, 10μM, 0.5mM and 5mM, while the glioblastoma cancer cells were treated with the 20 and 10μM concentrations. Cytotoxicity was established after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours, using the MTT assay. The ratio of absorbance of cells treated with isothiocyanates in aqueous solutions and the ones not treated showed the cytotoxic activity of used isothiocyanates. The best cytotoxic effect on the cell line T24 was achieved by isopropyl isothiocyanate with the concentration of 5 mM after 72-hour incubation. The best cytotoxic effect on the cell line A1235 was achieved by benzyl isothiocyanate with the concentration of 20 μM after 24-hour incubation. Isothiocyanates tested showed cytotoxic effects dependent on incubation time and concentration. The effectiveness of isothiocyanates was not always correspondent to the increase of concentration and incubation time and in some cases cell recovery occured. The cytotoxic effect of isothiocyanates is confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next step is the analysisof these effects by *in vivo* studies on the models of animal urinary bladder and glioblastoma cancers.

Keywords: plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay
Thesis contains: 68 pages, 35 figures, 12 tables, 24 references
Original in: Croatian

Defence committee:

1. Janoš Terzić, PhD, full prof. — chair person
2. Ivana Mudnić, PhD, assist. prof. — member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD assist. prof. — supervisor

Defence date: September 2017.

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

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. KARCINOM 2
1.1.1. Obilježja karcinoma 2
1.1.2. Onkogeni i tumor-supresorski geni 2
1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA 4
1.2.1. Etiologija i epidemiologija 4
1.2.2. Patohistologija 4
1.2.3. Klinička slika 4
1.2.4. Dijagnostički postupak i određivanje stadija bolesti 5
1.2.5. Klasifikacija tumora 6
1.2.6. Liječenje karcinoma prijelaznog epitela 7
1.3. GLIOBLASTOM 7
1.3.1. Etiologija i epidemiologija 7
1.3.2. Dijagnostički postupak 8
1.3.3. Klasifikacija tumora 10
1.3.4. Liječenje 12
1.3.5. Astrocitomi 13
1.4. KUPUSNJAČE 13
1.5. IZOTIOCIJANATI 15
1.5.1. Metabolizam i bioraspoloživost 15
1.5.2. Biološka aktivnost 16
1.5.3. Očuvanje normalne regulacije staničnog ciklusa 17
1.5.4. Inhibicija proliferacije i indukcija apoptoze 17
1.5.5. Inhibicija histon deacetilaze 17
1.5.6. Protuupalna aktivnost 18
1.5.7. Antibakterijska aktivnost: Helicobacter pylori 18
1.5.8. Prevencija bolesti 18
1.5.9. Izvori izotiocijanata 19
1.5.10. Sigurnost 21
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 24
3. MATERIJALI I METODE 26
3.1. STANIČNE LINIJE 27
3.2. POSTUPAK 28

3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI 30
4. REZULTATI 32
4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – stanična linija T24 33
4.2. GLIOBLASTOM – stanična linija A1235 42
5. RASPRAVA 49
6. ZAKLJUČAK 57
7. LITERATURA 59
8. SAŽETAK 62
9. SUMMARY 64
10. ŽIVOTOPIS 67

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić na prijateljskom pristupu, savjetima i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i Marku što su bili uz mene u svim trenucima i bili mi najveća podrška tijekom studiranja.

Od srca hvala mojim prijateljima: Nikolini, Martini, Ivani, Bernardi, Renati, Andrei, Robertu i ostalim kolegicama i kolegama što su mi razdoblje studiranja učinili nezaboravnim.

1. UVOD

1.1. KARCINOM

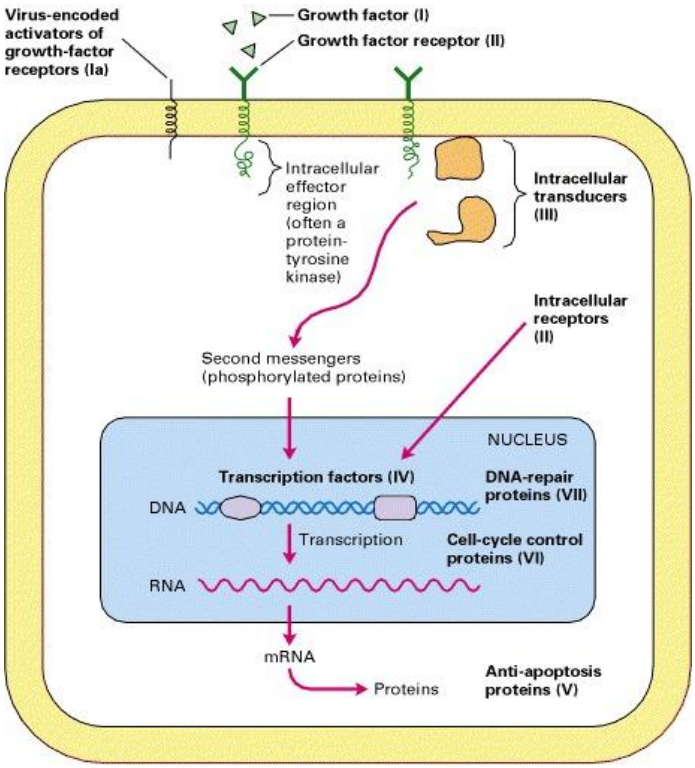
Karcinom je složena bolest u kojoj stanice više ne odgovaraju u cijelosti na signale unutar tkiva u kojem reguliraju staničnu diferencijaciju, preživljenje, proliferaciju i smrt. Kao rezultat toga, ove stanice se nakupljaju unutar tkiva, dovodeći do lokalnog oštećenja i upale. Postoji više od 200 različitih vrsta karcinoma (1).

1.1.1.Obilježja karcinoma

Obilježja karcinoma obuhvaćaju šest bioloških sposobnosti stečenih tijekom njegovog razvoja. Obilježja čine organizacijski princip racionalizacije složenosti neoplastičnih bolesti. Uključuju održavanje proliferativnih signala, izbjegavanje supresora rasta, otpor staničnoj smrti, omogućavajući replikacijsku besmrtnost, angiogeneza i aktivacija invazije i metastaziranja. Temelj ovih obilježja je genetska nestabilnost, koja stvara genetske raznolikosti, i upala, koja potiče više funkcija navedenih obilježja (1).

1.1.2.Onkogeni i tumor-supresorski geni

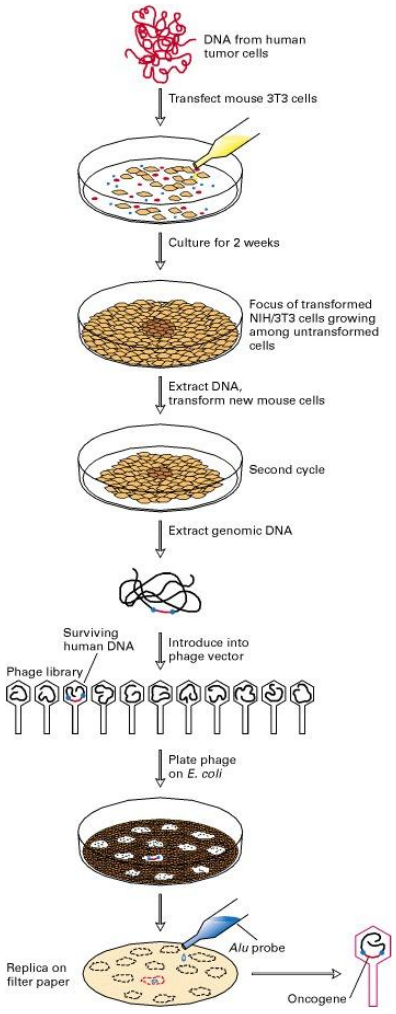
Mutacije koje povećavaju funkciju protoonkogena i one koje smanjuju funkciju tumor-supresorskih gena dovode do nastanka onkogena.



Slika 1. Sedam tipova protein koji sudjeluju u kontroli staničnog rasta (2)

Karcinom može nastati ekspresijom mutiranih formi ovih proteina: faktora rasta (I), receptora faktora rasta (II), proteina za provođenje signala (III), transkripcijskih faktora (IV), pro- i antiapoptotskih proteina (V), proteina za kontrolu staničnog ciklusa (VI) i DNA-popravljačkih proteina (VII). Mutacije koje mijenjaju strukturu ili ekspresiju proteina I-IV, povećavaju aktivnost dominantnih onkogena. Proteini razreda VI su uglavnom tumor-supresorski; mutacije u genima ovih proteina djeluju u oslobađanju stanica iz kontrole i nadzora, što povećava vjerojatnost da će mutirane stanice postati tumorske stanice. Mutacije razreda VII znatno povećavaju vjerojatnost mutacija u drugima razredima. Proteini kodirani virusom koji aktiviraju receptore faktora rasta (Ia) također mogu izazvati karcinom (3).

Aktivacija protoonkogena u onkogene može nastati točkastom mutacijom, amplifikacijom gena i translokacijom. Prvi prepoznati onkogen, v-*src*, identificiran je u Raus-sarkoma virusu, retrovirusu koji uzrokuje karcinom. Prvi identificirani ljudski onkogen kodira aktivni oblik Ras-a, proteina koji provodi signal. Izoliran je iz karcinoma mjehura (Slika 2.).



Slika 2. Izolacija onkogena (4)

Tumor supresorski geni kodiraju proteine koji usporavaju ili inhibiraju napredovanje kroz određenu fazu staničnog ciklusa, kontrolnim proteinima koji zaustavljaju stanični ciklus ako je DNA oštećena ili su kromosomi abnormalni, receptorima za izlučene hormone koji djeluju na inhibiciju stanične proliferacije, proteinima koji promiču apoptozu i enzimima koji popravljaju DNA. Nasljedne mutacije koje uzrokuju retinoblastom, dovele su do identifikacije RB, prvog prepoznatog tumor-supresorskog gena. Nasljeđivanje jednog mutiranog alela mnogih tumor-supresorskih gena (npr. RB, APC, BRCA-1) povećava gotovo 100% vjerojatnost razvoja karcinoma (5).

1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

1.2.1. Etiologija i epidemiologija

Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura iznosi 15/100.000. U Republici Hrvatskoj je 2008. godine zabilježeno 855 slučajeva.Karcinom prijelaznog epitela triput se češće pojavljuje u muškaraca. Prosječna dob bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura iznosi 65 godina.Dokazani čimbenici rizika za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura jesu pušenje, izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, određenim lijekovima (cilofosfamid, fenacetin), kamenci, kronična upala te shistosomijaza (povezana je s karcinomom pločastih stanica) (6).

1.2.2. Patohistologija

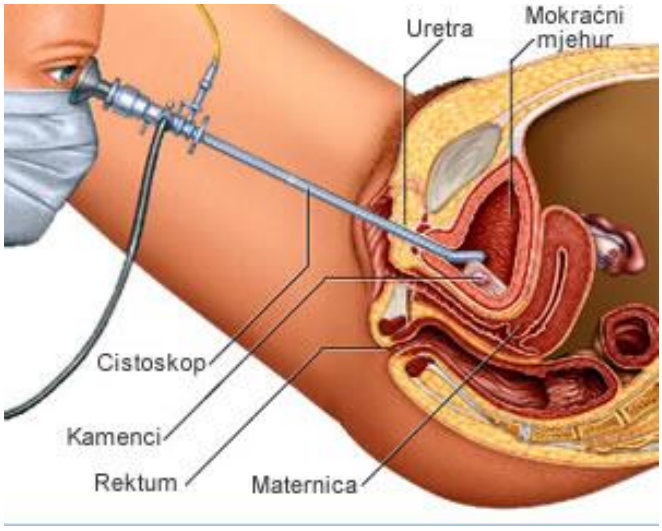
Tumori bubrežne nakapnice, mokraćovoda i mokraćnog mjehura najčešće potječu iz prijelaznog (urotelnog) epitela (90%). Ostali su patohistološki oblici: karcinom pločastih stanica (3%), adenokarcinom (2%) i karcinom malih stanica (1%). Tumori prijelaznog epitela su 50-100 puta češći u mokraćnom mjehuru nego na ostalim dijelovima urotrakta (6).

1.2.3. Klinička slika

U 90% se bolesnika karcinom mokraćnog mjehura očituje bezbolnom hematurijom, mikroskopskom ili makroskopskom. Također, pojavljuje se učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili rjeđe, simptoma urinarne infekcije. Znakovi su lokalnog širenja tumora hidronefroza, opstipacija, limfedem te palpabilna masa u maloj zdjelici. Kod uznapredovale bolesti pojavljuju se simptomi vezani uz sijela presadnica. Urotelni karcinom najčešće metastazira u trbušne limfne čvorove, jetru, pluća i u kosti (6).

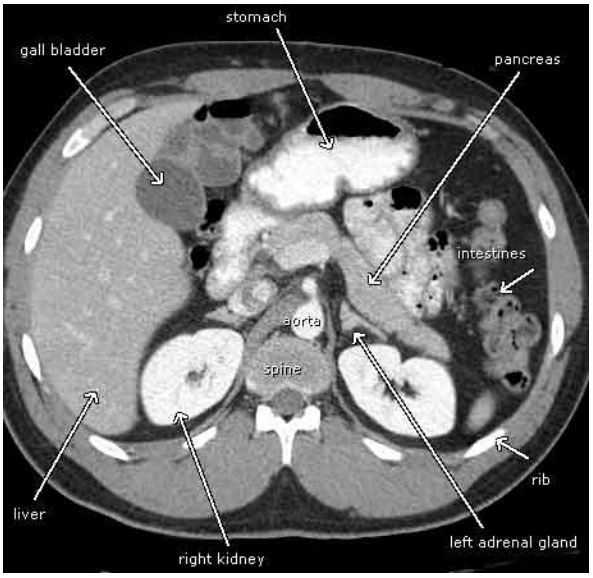
1.2.4. Dijagnostički postupak i određivanje stadija bolesti

Ako se pojavi hematurija, bolesniku je potrebno napraviti intravensku urografiju te cistoskopiju (Slika 3.). Ako cistoskopija pokaže tumor, potrebno je učiniti transuteralnu resekciju tumora u mjehuru. Kao pomoć u dijagnostici služi citološki pregled mokraće. Za procjenu proširenosti bolesti služi MSCT (Slika 4.) ili MR trbuha i male zdjelice (Slika 5.) te RTG-prikaz pluća (6).



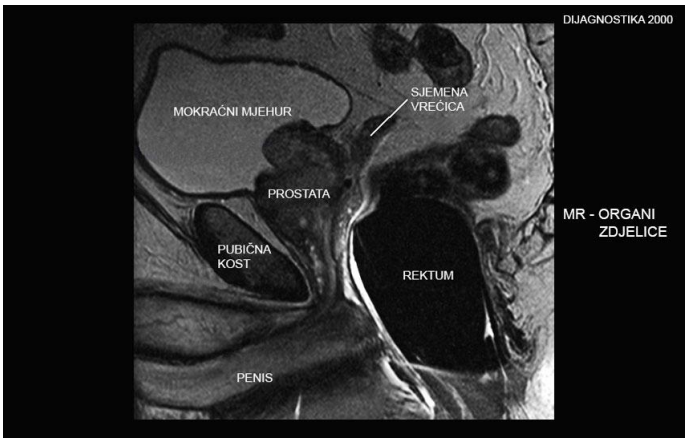
Slika 3. Cistoskopija mokraćnog mjehura

Preuzeto s: http://zdravlje.eu/2012/01/24/radiolosko-ispitivanje-bubrega/cistoskopija-2/



Slika 4. MSCT trbuha i male zdjelice

Preuzeto s: http://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pg=abdominct



Slika 5. MR trbuha i male zdjelice

Preuzeto s: http://www.dijagnostika2000.hr/mr.html

1.2.5. Klasifikacija tumora

Zbog odgovarajućeg izbora terapije te prognoze bolesti potrebna je što točnija procjena proširenosti bolesti. Procjenu proširenosti bolesti najčešće izražavamo TNM-klasifikacijom Američkog udruženja za rak (Slika 6.) (6).

Primary Tumor (T)	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Ta	Noninvasive papillary carcinoma
Tis	Carcinoma in situ: "flat tumor"
T1	Tumor invades subepithelial connective tissue
T2	Tumor invades muscularis propria
pT2a	Tumor invades superficial muscularis propria (inner half)
pT2b	Tumor invades deep muscularis propria (outer half)
T3	Tumor invades perivesical tissue
pT3a	Microscopically
pT3b	Macroscopically (extravesical mass)
T4	Tumor invades any of the following: prostatic stroma, seminal vesicles, uterus, vagina, pelvic wall, abdominal wall
T4a	Tumor invades prostatic stroma, uterus, vagina
T4b	Tumor invades pelvic wall, abdominal wall
Regional Lymph Nodes (N)	
Regional lymph nodes include both primary and secondary drainage regions. All other nodes above the aortic bifurcation are considered distant lymph nodes.	
NX	Lymph nodes cannot be assessed
N0	No lymph node metastasis
N1	Single regional lymph node metastasis in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node)
N2	Multiple regional lymph node metastasis in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node metastasis)
N3	Lymph node metastasis to the common iliac lymph nodes
Distant Metastasis (M)	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

Slika 6. TNM-klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura
Preuzeto s: http://www.onclive.com/publications/special-issues/2015/june-2015/role-of-anti-pd-1-pd-l1-immunotherapy-in-bladder-cancer?p=3

1.2.6. Liječenje karcinoma prijelaznog epitela

Liječenje se temelji na stupnju proširenosti bolesti. Stoga se razlikuje pristup neinvazivnom i invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti (6).

1.2.6.1. Liječenje površinskog karcinoma mokraćnog mjehura

Primarni oblik liječenja površinskog karcinoma mokraćnog mjehura jest transuretralna endoskopska resekcija (TUR). S obzirom na visoku stopu lokalnog povratka bolesti, nakon resekcije potrebno je u tromjesečnim intervalima ponavljati cistoskopiju. Adjuvantno se intravezikalno aplicira imunoterapija ili kemoterapija. U imunoterapiji površinskog karcinoma mokraćnog mjehura primjenjuje se BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), dok se od citostatika najčešće primjenjuje mitomicin C. Rjeđe se primjenjuje doksorubicin (6).

1.2.6.2. Liječenje invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura

Osnovni oblik liječenja invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura jest radikalna cistektomija, s neoadjuvantnom kemoterapijom temeljenom na cisplatinu uz adjuvantnu kemoterapiju ovisno o patohistološkoj slici tumora, statusu regionalnih limfnih čvorova i stadiju bolesti ili bez nje. Rjeđe se primjenjuje parcijalna cistektomija. U izabranih se bolesnika može provesti konkomitantna kemoiradijacija (usporedna aplikacija radioterapije i kemoterapije temeljene na cisplatinu) u svrhu očuvanja mokraćnog mjehura. Bolesnici koji zbog općeg stanja ili znatnog komorbiditeta ne mogu tolerirati kemoradioterapiju, samo se zrače (6).

1.2.6.3. Terapija karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela urotrakta

Terapija izbora je nefroureterektomija. Lokalna ekscizija moguća je kod manjih, površinskih lezija. Uznapredovali slučajevi liječe se kemoterapijom temeljenom na cisplatinu (6).

1.3. GLIOBLASTOM

1.3.1. Etiologija i epidemiologija

Prema podacima Hrvatskoga registra za rak, incidencija tumora središnjeg živčanog sustava (SŽS-a) u 2008. godini iznosila je 11/100000 stanovnika. Najveća je incidencija u starijih osoba, a srednja životna dob pri postavljanju dijagnoze je 55 godina. Ovisno o životnoj dobi,

mijenja se ne samo ukupna već i učestalost pojedinih histoloških tipova tumora, pa se tako u dječjoj dobi najčešće pojavljuju tumori stražnje lubanjske jame (astrocitomi malog mozga i moždanog debla, meduloblastomi i ependimomi) (7).

Može se sa sigurnošću reći da izloženost kemijskim spojevima poput policikličkih ugljikohidrata, sastojaka polivinil-klorida i gume, kao i derivata N-nitrozoureje, prati povećana incidencija zloćudnih tumora središnjeg živčanog sustava. Isto tako, terapijsko ionizirajuće zračenje dobro je poznat čimbenik rizika, a to je jasno uočeno u djece koja su zračena zbog limfoma, leukemija te u bolesnika zračenih zbog tumora glave i vrata.

Svi tumori mozga, dobroćudni i zloćudni, imaju slične kliničke simptome, a mogu svojim rastom uzrokovati smrt. Stoga za dobroćudne tumore središnjeg živčanog sustava kažemo da su zloćudni po lokalizaciji.Rast tumora i edem okolnog, zdravog tkiva dovode do žarišnih neuroloških ispada, porasta intrakranijalnog tlaka i hidrocefalusa.

Porast intrakranijalnog tlaka očituje se kvantitativnim poremećajem svijesti (od somnolencije do kome), mučninom i povraćanjem, glavoboljom (zbog pritiska na bolno osjetljive intrakranijalne strukture poput dure), hipertenzijom, bradikardijom i nepravilnim disanjem. Posljednja tri simptoma nazivaju se Cushingovim trijasom, no sva tri zajedno prisutna su u samo trećine oboljelih. Epilepsija je čest simptom moždanih tumora, osobito dobro diferenciranih glioma (7).

1.3.2. Dijagnostički postupak

Osim detaljne anamneze neurološkog statusa, u bolesnika s moždanim tumorima često su heteroanamnestički podaci važniji jer tumori mozga izazivaju promjene u bolesnikovu mentalnom statusu.

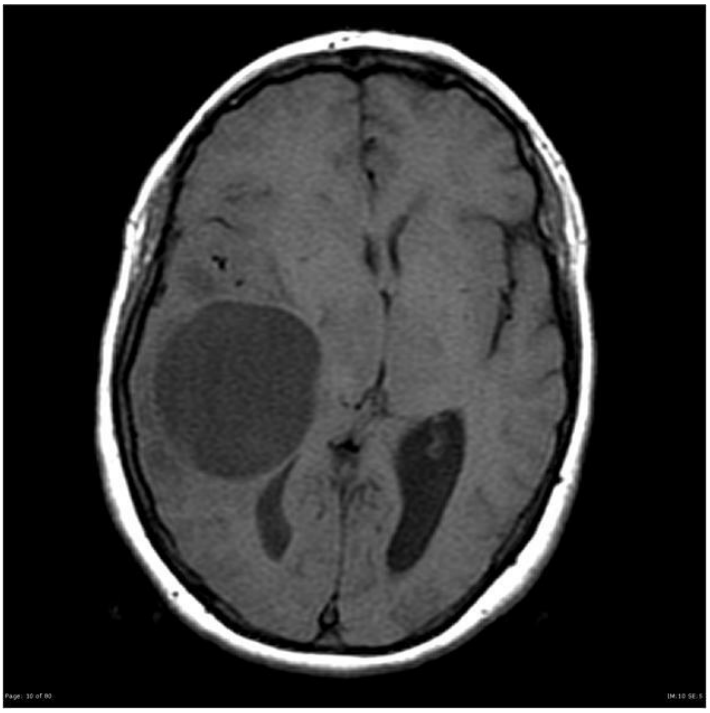
Naime, praktično se svi tumori mozga uočavaju kao ekspanzivni procesi koji se ispunjavaju radiološkim kontrastom uz edem i potiskivanje okolnog zdravog moždanog tkiva. Često su cistični, a katkad uzrokuju hidrocefalus.

Obično se neuroradiološka dijagnostika provodi pomoću CT-a s kontrastom ili MR mozga, uz napomenu da MR ima apsolutnu prednost u prikazu parenhima živčanoga tkiva, omogućuje uočavanje manjih lezija i preciznije prikazuje granice tumora i okolnog edema (7).



Slika 7. CT glioblastoma

Preuzeto s: https://radiopaedia.org/articles/glioblastoma



Slika 8. MR glioblastoma

Preuzeto s: https://radiopaedia.org/cases/glioblastoma-with-a-large-cystic-component-1

U bolesnika s operabilnim tumorima te tipičnom neuroradiološkom slikom određene vrste tumora prije radikalnog kirurškog zahvata najčešće nije potrebno postavljanja patohistološke analize biopsijom. Stereotaksijska se biopsija, radi postavljanja definitivne dijagnoze, provodi u bolesnika u kojih se, zbog specifične pozicije tumora, ne može napraviti otvoreni kirurški zahvat. U iznimnim slučajevima, kad zbog pozicije tumora ili imunokompromitiranosti bolesnika nije moguće napraviti ni biopsiju, a neuroradiološki nalaz jasno upućuje na to o kojoj je vrsti tumora riječ, dolazi u obzir provođenje onkološkog liječenje i bez postavljene cito/patohistološke dijagnoze (7).

1.3.3. Klasifikacija tumora

Najčešće se primjenjuje klasifikacija Svjetske zdravstvene organizcije (SZO) na osnovi histološke slike, te TNM-klasifikacija. Zbog postojanja čak stotinjak različitih patoloških podtipova, histološka klasifikacija SZO-a prikazana je u pojednostavljenom obliku. Najvažnija je skupina glioma (astrocitomi, oligodendrogliomi, ependimomi, miješani gliomi) koji čine više od 50% svih tumora mozga (7).

Patohistološka klasifikacija tumora mozga (WHO) (8)

Neuroepitelni (neuroektodermalni) tumori

Astrocitni tumori (30-35%)

- Astrocitom: policistični astrocitom, fibrilarni astrocitom
- Anaplastični astrocitom
- Glioblastoma multiforme
- Pleomorfni Xantoastrocitom
- Subependilarni astrocitom
- Subependimalni astrocitom gigantskih stanica

Oligodendroglialni tumori (0 -1%)

- Oligodendrogliom
- Anaplastični oligodendrogliom

Miješani gliomi

- Oligoastrocitom
- Anaplastični oligoastrocitom

Ependimalni tumori (10 -15%)

- Ependimom
- Anaplastični ependimom
- Mikropapilarni ependimom
- Subependimom

Tumori pleksusa koriodeusa (2-3%)

- Pleksuspapilom
- Pleksuskarcinom

Neuronalni i mješani neuronalni-glialni tumori

- Gangliocitom
- Disembrioplastični neuroepitelijalni tumor
- Gangliogliom
- Desmoplastični infantilni gangliogliom
- Anaplastični gangliogliom
- Centralni neurocitom

Tumori pinealnog parenhima (2-3%)

- Pineocitom
- Pineoblastom

Embrionalni tumori (15- 20%)

- Meduloblastom
- Primitivni neuroektodermalni tumor
- Atipični teratoidni/rabdoidni tumor

Meningealni tumori (0 – 1%)

- Meningeom
- Hemangiopericitom
- Melanocitni tumor
- Hemangioblastom

Primarni limfomi SŽS-a (<1%)

Tumori zametnih stanica (Keimzeltumori) (3 – 5%)

- Germinom
- Embrionalni karcinom
- Tumor žumanjčane vreće (Dottersacktumor)
- Horiokarcinom
- Teratom
- Miješani tumor zametnih stanica

Tumori područja sele (8 – 10%)

- Adenomi hipofize
- Karcinomi hipofize
- Kraniofaringeomi

Metastaze tumora smještenih izvan SŽS-a

1.3.4. Liječenje

Liječenje tumora mozga uključuje sva tri osnovna modaliteta onkološkog liječenja-kirurški zahvat, radioterapiju i kemoterapiju, te adekvatno potporno liječenje.

Potporno liječenje

Kortikosteroidi (najčešće deksametazon) su lijekovi izbora za smanjivanje moždanog edema, a najčešće se rabe prije i nakon kirurškog zahvata te u ranim fazama provođenja radioterapije.

Kirurško liječenje

Palijativni zahvati poput ventrikulo-peritonealne drenaže ili ugradnje crpkica za dekompresiju tumorskih cista dovode do ublaživanja simptoma zbog smanjenja intrakranijalnog tlaka. Kirurški se mogu uklanjati i moždani sekundarizmi, osobito ako su solitarni.

Katkad su, ovisno o histološkom tipu tumora i njegovoj poziciji, mogui kurativni kirurški zahvati, uklanjanje tumora u cijelosti.

Radioterapija

Indicirana je u većine bolesnika s primarnim tumorima SŽS-a, najčešće nakon kirurškog zahvata, a u neoperabilnih bolesnika provodi se primarna radioterapija. Da bi se osigurao adekvatan oporavak bolesnika, s radioterapijom se najčešće počinje 3-4 tjedna nakon kirurškog zahvata. Najčešće se provodi frakcionirana iradijacija mozga vanjskim snopovima zračenja na linearnom akceleratoru (EBRT, *external-beam radiotherapy*), obično do ukupne tumorske doze od 50 do 60 Gy/1,8-2 Gy na dan.

Kemoterapija

U bolesnika sa slabo diferenciranim tumorima, ordiniranje kemoterapije, obično nakon kirurškog zahvata i radioterapije, produljuje preživljenje. U posljednje vrijeme s uspjehom se primjenjuje konkomitantna radiokemoterapija (temozolomidom). Povećanje preživljenja bolesnika sa slabo diferenciranim gliomima postiže se i aplikacijom lokalne kemoterapije (polimeri BCNU) koja se postavi u područje primarnog tumora za vrijeme kirurškog zahvata.

Preduvjet učinkovitosti citostatika jest njihov prodor kroz krvno-moždanu barijeru (mala molekularna masa, topljivost u lipidima). Najviše se rabe derivati nitrozoureje, temozolomid, vinkristin i prokarbazin (8).

1.3.5. Astrocitomi

Čine oko 80% svih glioma. Histološki stupanj diferencijacije (GI-IV) najvažniji je prognostički čimbenik.

Astrocitomi GI nakon kirurškog se zahvata liječe i radioterapijom samo u slučaju neradikalnog kirurškog zahvata.

Astrocitomi GII najčešće se liječe kirurškim zahvatom i radioterapijom.

U liječenju anaplastičnog astracitoma (GIII) nakon kirurškog se zahvata i radioterapije, primjenjuje i kemoterapija.

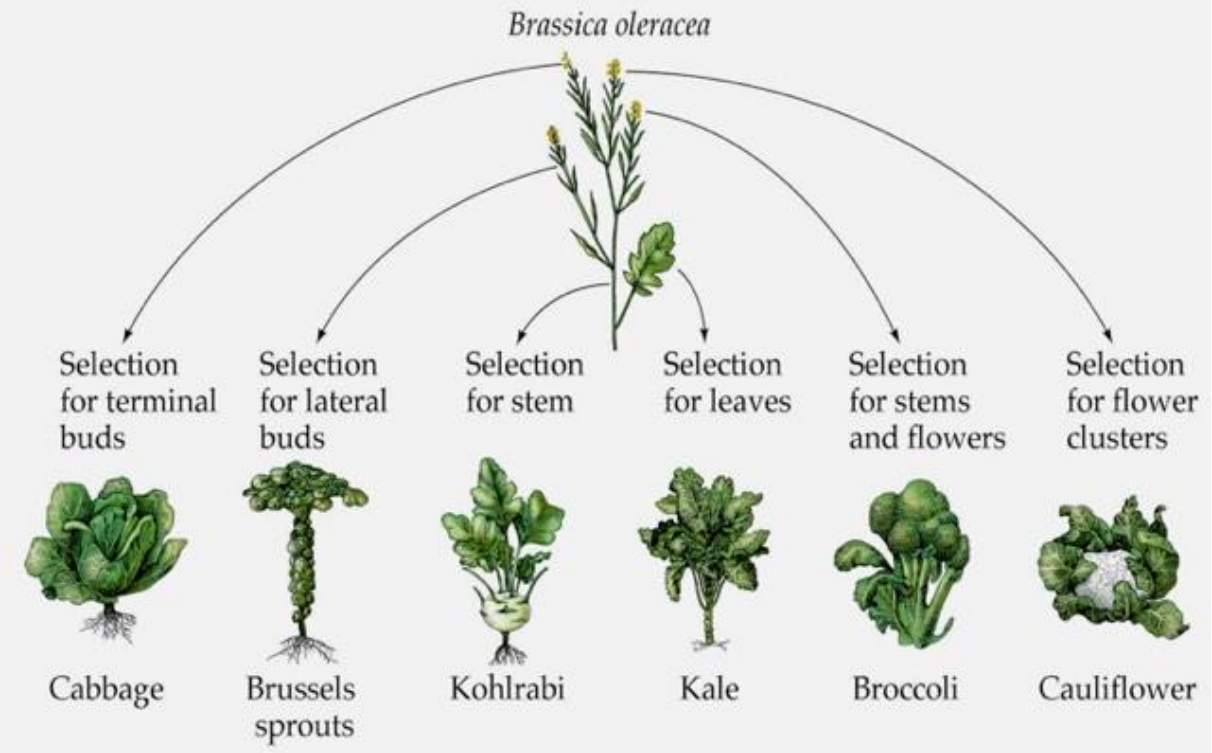
Glioblastom (GIV) čini oko dvije trećine svih astrocitoma., ima najlošiju prognozu uz prosječno preživljenje oko 12 mjeseci. Standardno onkološko liječenje nakon kirurškog zahvata sastoji se od konkomitantne kemoradioterapije (konkomitantno se ordinira temozolomid) te, ako nema progresije bolesti, konsolidacijske kemoterapije temozolomidom (9).

1.4. KUPUSNJAČE

Kupusnjače ili krstašice (*Brasicaceae*, prethodno *Cruciferae*), porodica su cvjetnica (red *Brassicales*) i sadrže 338 rodova i oko 3700 vrsta. Porodica uključuje mnoge ekonomski važne biljke koje su dosta promjenjene i udomaćene od strane ljudi, posebno one roda *Brassica*, koji uključuje kupus, brokulu, prokulice, kelj, korabu, kinesko zelje, repu i hibridnu repu. Drugi važni poljoprivredni usjevi porodice su hren, rotkvica i bijeli senf. Određeni broj vrsta, kao što su Arduinova gromotulja, ognjica i jednogodišnja mjesečnica, se uzgajaju kao ukrasne biljke, a neke se smatraju invazivnim vrstama u područjima nespecifičnim za njihov rast (10).

Biljke iz porodice krstašica su uglavnom zeljaste i mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili trajnice. Listovi su uglavnom jednostavni i naizmjenično raspoređeni, a mnogi su paprenog okusa. Cvjetovi su križni s četiri latice i četiri lapa. Cvjetovi su obično bijeli, žuti ili boje lavande i karakteristična su četiri duga i dva kratka prašnika te dvodijelni tučak smješten iznad ostalih biljnih dijelova. Sjemenke se proizvode u suhim plodovima, često s pregradom između polovica; dugi, tanki plodovi poznati su kao komuške, a kratki zaobljeni kao komušćice (10).

Iako se znatno razlikuje u općem izgledu, kupus, kelj, koraba, cvjetača, brokula i prokulica su svi kultivarivrste *Brassica oleracea*. *Brassica oleracea* se uzgaja najmanje 2000 godina, možda i mnogo više, a razvijenje i velik izbor oblika. *Brassica oleracea* je član porodice kupusnjača (*Brassicaceae*), gdje se također nalaze i repa (*Brassica rapa*) i rotkvica (*Raphanus sativus*). Zajednički naziv kupus dolazi od francuskog *caboche*, što znači „glava“ (11).



Slika 9. *Brassica oleracea*

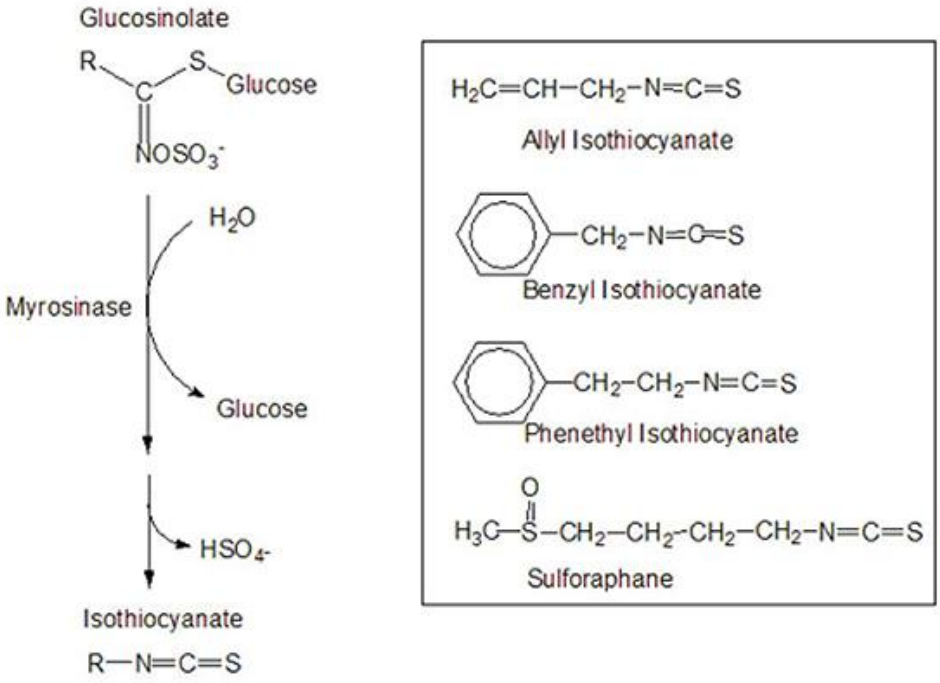
Preuzeto s: http://kottke.org/13/09/the-magical-brassica-oleracea-plant

1.5. IZOTIOCIJANATI

Kupusnjače, kao što su brokula, kupus i kelj, su bogati izvor komponenti koje sadrže sumpor, glukozinolata. Izotiocijanati su biološki aktivni produkti hidrolize glukozinolata. Kupusnjače sadrže razne glukozinolate, od kojih svaki hidrolizom formira različite izotiocijanate. Naprimjer, brokula je dobar izvor glukorafanina, glukozinolatnog prekursora sulforafana (SFN) i sinigrina, glukozinolatnog prekursora alil izotiocijanata (AITC). Potočarka je bogat izvor glukonasturtina, prekursora feniletil izotiocijanata (PEITC), dok je vrtna salata bogata glukotropeolinom, prekursorom benzil izotiocijanata (BITC) (12).

1.5.1. Metabolizam i bioraspoloživost

Mirozinaza, razred enzima koji kataliziraju hidrolizu glukozinolata, fizički je odvojena od glukozinolata u netaknutoj biljnoj stanici. Kad su kupusnjače nasjeckane ili prožvakane, mirozinaza može djelovati na glukozinolate i osloboditi izotiocijanate iz njihovih prekursora (Slika 7.).



Slika 10. Hidroliza glukozinolata katalizirana mirozinazom i kemijske strukture odabranih izotiocijanata

Preuzeto s: http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates#reference4

Žvakanje kupusnjača povećava kontakt između glukozinolata i biljne mirozinaze i povećava količinu apsorbiranih izotiocijanata. Čak i kada je biljna mirozinaza potpuno inaktivirana

toplinom, mirozinazna aktivnost crijevnih bakterija u ljudi omogućuje djelomičnu formaciju i apsorpciju izotiocijanata. Međutim, apsorpcija i ekskrecija izotiocijanata je bitno niža iz kuhanih nego iz svježih kupusnjača. Kroz metabolizam, izotiocijanati se konjugiraju glutationom, što se odvija pomoću obitelji enzima nazvanih glutation-S-transferaze (GST), a zatim se metaboliziraju do merkapturične kiseline. Takvi metaboliti izotiocijanata se mogu mjeriti u urinu i vrlo su povezani s unosom kupusnjača.Postoje također i neki dokazi da metaboliti izotiocijanata doprinose njihovoj biološkoj aktivnosti (12).

1.5.2. Biološka aktivnost

Učinci na biotransformaciju enzima uključenih u metabolizam karcinogena

Biotransformacija enzima igra važne uloge u metabolizmu i eliminaciji različitih spojeva, uključujući lijekove, otrove i karcinogene. Općenito, u fazi I biotransformacije enzimi kataliziraju reakcije koje povećavaju reaktivnost hidrofobnih (topljivih u mastima) spojeva, pripremajući ih za reakcije katalizirane enzimima faze II biotransformacije. Reakcije katalizirane enzimima faze II općenito povećavaju hidrofilnost i pospješuju eliminaciju spojeva iz organizma (12).

1.5.2.1. Inhibicija enzima faze II biotranformacije

Neki protoonkogeni (prekursori onkogena) zahtijevaju biotransformaciju enzimima faze I, kao što su enzimi iz obitelji citokroma P450 (CYP), kako bi postali aktivni onkogeni, koji su sposobni vezati se za DNA i potaknuti mutacije. Inhibicija specifičnih CYP enzima uključenih u aktivaciju onkogena sprječava razvoj karcinoma u životinjskim modelima. Otkriveno je da izotiocijanati, uključujući PEITC i BITC, inhibiraju aktivaciju onkogena CYP enzimima u životinjskim modelima. Ispitivanja na staničnim kulturama su također pokazala da SFN inhibira određene CYP enzime. Malo kliničko ispitivanje kod pušača iznijelo je dokaze da konzumacija 170g/dan potočarke, koja je bogata glukozionolatnim prekursorom PEITC-a, smanjuje aktivaciju protoonkogena pronađenih u cigaretama (12).

1.5.2.2. Indukcija enzima faze II biotranformacije

Mnogi su izotiocijanati, posebno SFN, potentni induktori enzima faze II u kulturama ljudskih stanica. Enzimi faze II, uključujući GST, UDP-glukuronozil transferazu (UGT), kinon reduktazu i glutamat cistein ligazu, igraju važne uloge u zaštiti stanica od oštećenja DNA uzrokovanih onkogenima i reaktivnim spojevima kisika (ROS). Geni za istaknute, ali i druge enzime faze II, sadrže specifičnu sekvencu DNA nazvanu „element odgovora na

antioksidanse“(ARE). Dokazano je da izotiocijanati povećavaju aktivnost enzima faze II povećavajući transkripciju gena koji sadrže ARE.Ograničeni podaci iz kliničkih ispitivanja predlažu da hrana bogata glukozinolatima može povećati aktivnost enzima faze II u ljudi. Ukoliko pušači konzumiraju 170g/dan potočarke, izlučivanje urinom glukuroniranih metabolita nikotina se znatno poveća, što ukazuje na povećanu aktivnost UGT-a. Prokulice sadrže veliki broj glukozinolata, uključujući prekursore AITC i SFN. Konzumacija 300g/dan kelja pupčara kroz tjedan dana bitno povećava razinu GST-a u plazmi i crijevima kod nepušača (12).

1.5.3. Očuvanje normalne regulacije staničnog ciklusa

Nakon diobe stanice, ona prolazi kroz slijed faza poznatih kao stanični ciklus, prije nego što se ponovno podijeli. Nakon oštećenja DNA, stanični ciklus može biti prolazno zaustavljen, kako bi se omogućio popravak DNA, ili, ako se šteta ne može popraviti, aktiviraju se putevi koji vode do stanične smrti (apoptoze). Regulacija neispravnog staničnog ciklusa može dovesti do širenja mutacije koje pridonose razvoju karcinoma. Brojni izotiocijanati, uključujući AITC, BITC, PEITC i SFN, induciraju zaustavljanje staničnog ciklusa u staničnim kulturama (12).

1.5.4. Inhibicija proliferacije i indukcija apoptoze

Za razliku od normalnih stanice, stanice karcinoma se brzo razmnožavaju i gube sposobnost odgovora na signale za staničnu smrt koji iniciraju apoptozu. Izotiocijanati mogu inhibirati proliferaciju i inducirati apoptozu u brojim staničnim linijama karcinoma (12).

1.5.5. Inhibicija histon deacetilaze

U staničnoj jezgri, DNA je omotana oko proteina koji se zovu histoni. Općenito, acetilacija histona histon acetil transferazom čini DNA dostupnijom transkripcijskim faktorima, koji vežu DNA i aktiviraju transkripciju gena. Deacetiliranje histona histon deacetilazom ograničava pristup transkripcijskih faktora. Acetiliranje i deacetiliranje histona važan je stanični mehanizam regulacije transkripcije gena. Međutim, ravnoteža između aktivnosti histon acetil transferaze i histon deacetilaze koja postoji u normalnim stanicama, može biti poremećena u stanicama karcinoma. Spojevi koji inhibiraju histon deacetilazu potencijalno mogu spriječiti razvoj karcinoma inducirajući transkripciju tumor supresorskih gena koji potiču diferencijaciju i apoptozu transformiranih (prekancerogenih) stanica. Metaboliti SFN-a i AITC-a mogu inhibirati aktivnost histon deacetilaze u kulturi stanica karcinoma.

Nadalje, *in vivo* dokaz inhibiranja histon deacetilaze SFN-om pronađen je u mišjem modelu uz korištenje ksenografta raka prostate. Kod ljudi, aktivnost histon deacetilaze je inhibirana u krvnim stanicama nakon ingestije 68g (jedna šalica) mlade brokule bogate SFN-om (12).

1.5.6. Protuupalna aktivnost

Upala potiče proliferaciju stanica i inhibira apoptozu, povećavajući rizik od razvoja karcinoma. SFN i PEITC smanjuju sekreciju upalnih signalnih molekula iz bijelih krvnih stanica; ovi spojevi smanjuju i vezanje DNA i NF-κB, proupalnog transkripcijskog faktora (12).

1.5.7. Antibakterijska aktivnost: Helicobacter pylori

Bakterijska infekcija *H. pylori* je povezana s izrazitim porastom incidencije raka želuca. U epruveti i kulturi tkiva, pročišćeni je SFN inhibirao rast i ubio više sojeva *H. pylori*, uključujući i sojeve rezistentne na antibiotike. U životinjskom modelu, administracija SFN-a pet dana iskorijenila je *H. pylori* u 8 od 11 ksenografta humanog želučanog tkiva ugrađenog u imunokompromitirane miševe. Međutim, u malom kliničkom pokusu, konzumacija do 56g/dan mlade brokule bogate glukurafaninom, kroz tjedan dana, bio je povezan s eredikacijom *H. pylori* u samo 3 od 9 pacijenata s gastritisom. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se potvrdilo jesu li SFN ili namirnice bogate njegovim prekursorom, glukorafaninom, korisne u liječenju infekcije *H. pylori* kod ljudi (12).

1.5.8. Prevencija bolesti

Karcinom

Utvrđeno je da prirodni izotiocijanati i njihovi metaboliti inhibiraju razvoj kemijski induciranih karcinoma pluća, jetre, jednjaka, želuca, tankog crijeva, debelog crijeva i mliječne žlijezde (dojke) u raznim životinjskim modelima. Iako epidemiološke studije pokazuju neke dokaze da je povećan unos kupusnjača povezan sa smanjenim rizikom od karcinoma u ljudi, teško je utvrditi jesu li takvi zaštitni učinci povezani sa izotiocijanatima ili drugim faktorima povezanim s konzumacijom kupusnjača. Ispitivači su pokušali izračunati izloženost ljudi izotiocijanatima bazirajući se na procjenama unosa kupusnjača i mjerenju maksimalne količine izotiocijanata koja može biti oslobođena iz različitih kupusnjača u laboratoriju. Studije koje koriste ovu tehniku otkrile su da je prehrambeni unos izotiocijanata bio znatno niži u Kineskinja i Amerikanaca s dijagnosticiranim karcinomom pluća nego u kontrolnoj skupini bez oboljelih od karcinoma. Ocjenjujući prehrambeni unos kupusnjača ne može se precizno mjeriti izloženost pojedinca izotiocijanatima, jer drugi faktori mogu izmijeniti iznos

formiranih i apsorbiranih izotiocijanata. Mjerenje izlučivanja izotiocijanata i njihovih metabolita može pružiti bolju procjenu izlaganju izotiocijanatima, ali tek je nekoliko je istraživanja ispitivalo povezanost između mokraćnog izlučivanja i rizika od karcinoma. U prospektivnoj studiji, Kinezi sa mjerljivom razinom izotiocijanata u mokraći na početku su imali znatno manji rizik od razvoja raka pluća tijekom sljedećih 10 godina, nego muškarci s nemjerljivom razinom. Studija je otkrila da je urinarna ekskrecija izotiocijanata bila znatno niža u Kineskinja s dijagnosticiranim karcinomom dojke u odnosu na kontrolnu skupinu bez karcinoma.Za razliku od toga, procjena unosa kupusnjača iz upitnika o učestalosti namirnica u istom ispitivanju, nije bila povezana s povećanim rizikom od raka dojke (12).

Genetske varijacije u metabolizmu izotiocijanata i rizik od karcinoma

Glukuronozil-S-transferaze (GST) su obitelj enzima faze II biotransformacije koji potiču metabolizam i eliminaciju izotiocijanata i drugih spojeva iz organizma. Genetske varijacije (polimorfizam gena) koje utječu na aktivnost GST-a su identificirane u ljudi. Null varijante gena GSTM1 i GSTT1 sadrže velike delecije i pojedinci koji naslijede dvije kopije GSTM1-null ili GSTT1-null gena ne mogu proizvesti odgovarajući GST enzim. Niža GST aktivnost u takvih pojedinaca može rezultirati sporijom eliminacijom i duljim izlaganjem izotiocijanatima nakon unosa kupusnjača.U prilog toj ideji nekoliko epidemioloških studija pokazuje da su inverzne povezanosti između unosa kupusnjača i rizika od raka pluća ili raka debelog crijeva izraženije kog GSTM1-null i GSTT1-null pojedinaca. Ovi rezultati ukazuju na zaštitnu ulogu izotiocijanata koja može biti poboljšana u pojedinaca koji ih sporije eliminiraju iz organizma (12).

1.5.9. Izvori izotiocijanata

Izvori iz hrane

Kupusnjače, kao što su kinesko zelje, brokula, prokulice, kupus, cvjetača, hren, kelj, koraba, senf, rotkvica, hibridna repa, repa i potočarka, bogat su izvor glukozinolata, prekursora izotiocijanata. Za razliku od nekih drugih fitokemikalija, glukozinolati su prisutni u relativno visokim koncentracijama u najčešće konzumiranim kupusnjačama. Na primjer, pola šalice sirovih brokula može pružiti više od 25mg ukupnih glukozinolata. Ukupni sadržaj glukozinolata odabranih kupusnjača prikazan je u Tablici 1. Neke kupusnjače su bolji izvori određenih glukozinolata (i izotiocijanata) od drugih. Tablica 2 navodi povrće koje je relativno dobar izvor izotiocijanata koji se trenutno proučavaju zbog svojih kemopreventivnih svojstava. Količine izotiocijanata koji nastaju iz glukozinolata u hrani su promjenjive, a

dijelom ovise o preradi i pripremi hrane. Konzumacija pet ili više obroka tjedno povrća iz porodice kupusnjača povezano je sa značajnim smanjenjem rizika od raka u nekim prospektivnim kohortnim ispitivanjima (12).

Tablica 1. Sadržaj glukozinolata odabranih kupusnjača

Povrće (svježe)	**Količina**	**Ukupni glukozinolati (mg)**
Prokulice	½ šalice (44g)	104
Vrtna salata	½ šalice (25g)	98
Smeđa gorušica	½ šalice, nasjeckana (28g)	79
Repa	½ šalice, kockice (65g)	60
Savojski kupus	½ šalice, nasjeckani (45g)	35
Kelj	1 šalica, nasjeckani (67g)	67
Potočarka	1 šalica, nasjeckana (34g)	32
Koraba	½ šalice, nasjeckana (67g)	31
Crveni kupus	½ šalice, nasjeckani (45g)	29
Brokula	½ šalice, nasjeckana (44g)	27
Hren	1 žlica (15g)	24
Cvjetača	½ šalice, nasjeckana (50g)	22
Kinesko zelje	½ šalice, nasjeckano (35g)	19

Tablica 2. Prehrambeni izvori određenih izotiocijanata i njihovih glukozinolatnih prekursora

Izotiocijanat	**Glukozinolat (prekursor)**	**Povrće**
Alil izotiocijanat (AITC)	Sinigrin	Brokula, prokulice, kupus, hren, senf, rotkvica
Benzil izotiocijanat (BITC)	Glukotropeolin	Kupus, kres salata, dragoljub
Feniletil izotiocijanat (PEITC)	Glukonasturtin	Potočarka
Sulforafan (SFN)	Glukorafanin	Brokula, prokulice, kupus

Količina glukorafanina, prekursora sulforafana, u prokulicama, ostaje više-manje jednaka kako sjeme klija i raste u zrele biljke. Dakle, tri dana stare prokulice su koncentrirani izvori glukorafana i sadrže 10-100 puta više glukorafanina po težini od zrele brokule. Prokulice koje su standardizirane da sadrže najmanje 73 mg glukorafanina (koji se također naziva sulforafanski glukozinolat) po serviranju od 28.35g (1-oz) su dostupne u nekim trgovinama zdrave hrane i prehrambenih namirnica (12).

Učinak kuhanja

Glukozinolati su u vodi topljivi spojevi koji se ekstrahiraju u uzavreloj vodi. Kuhanje kupusnjača 9-10 min rezultiralo je 18-59%-tnim smanjenjem ukupnog sadržaja glukozinolata kupusnjača.Metode kuhanja koje koriste manje vode, kao što je kuhanje na pari ili u mikrovalnoj, može smanjiti gubitke glukozinolata. Međutim neke vrste pripreme kao što su kuhanje, parenje i priprema u mikrovalnoj visoke snage (750-900W), mogu inaktivirati mirozinazu, enzim koji katalizira hidrolizu glukozinolata. Čak i bez aktivnosti biljnih mirozina, aktivnost mirozinaza crijevnih bakterija kod ljudi rezultira hidrolizom nekih glukozinolata. Međutim, nekoliko ispitivanja na ljudima je otkrilo da inaktivacija mirozinaze u kupusnjača znatno smanjuje bioraspoloživost izotiocijanata (12).

1.5.10. Sigurnost

Nuspojave

Nisu prijavljene nikakve ozbiljne nuspojave izotiocijanata kod ljudi. Većina istraživanja na životinjama je otkrila da izotiocijanati inhibiraju razvoj karcinoma kada se daju prije kemijskog karcinogena (preinicijacija). Međutim, vrlo veliki unos PEITC-a i BITC-a (25-250 puta veći od prosječnog prehrambenog unosa izotiocijanata kod ljudi) pospješio je razvoj karcinoma mokraćnog mjehura u štakora kada se da nakon kemijskog karcinogena (postiinicijacijski). Značaj ovih nalaza za karcinom mokraćnog mjehura kod ljudi nije jasan, budući da je najmanje jedna prospektivna kohortna studija otkrila da je konzumacija kupusnjača obrnuto proporcionalna riziku od karcinoma mokraćnog mjehura kod muškaraca (12).

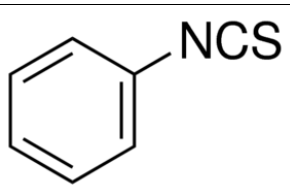
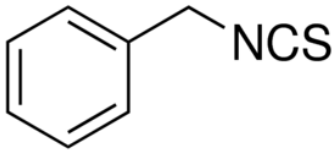
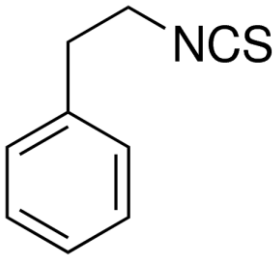
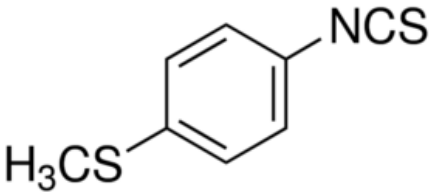
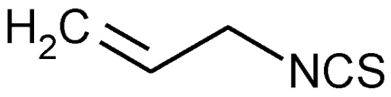
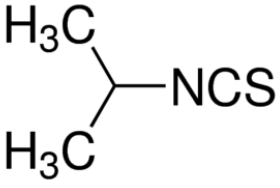
Trudnoća i dojenje

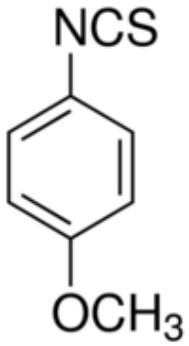
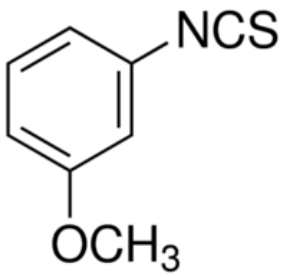
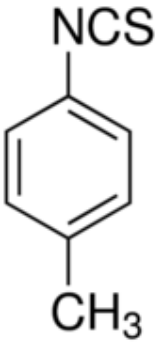
Iako visoki prehrambeni unosi glukozinolata iz kupusnjača nisu povezani sa štetnim učincima tijekom trudnoće i dojenja, nema informacija o sigurnosti pročišćenih izotiocijanata ili dodataka koji sadrže visoke doze glukozinolata i/ili izotiocijanata tijekom trudnoće ili dojenja u ljudi (12).

Interakcije lijekova

Nije poznato da izotiocijanati stupaju u interakcije s bilo kakvim lijekovima. Međutim, potencijal izotiocijanata da inhibiraju različite izoforme CYP enzima, povećava mogućnost za interakcije s lijekovima koji su supstrati CYP enzima (12).

Tablica 3. Kemijske strukture pojedinih izotiocijanata

Fenil-izotiocijanat	
Benzil-izotiocijanat	
2-feniletil-izotiocijanat	
4-(metiltio)fenil-izotiocijanat	
Alil-izotiocijanat	
Izopropil-izotiocijanat	

4-metoksifenil-izotiocijanat	
3-metoskifenil-izotiocijanat	
p-tolil-izotiocijanat	

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi mogu li se spojevi izolirani iz biljaka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) - izotiocijanati, koristiti u liječenju pojedinih vrsta karcinoma. Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnosti ispitivat će se na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura T24 i staničnim linijama glioblastoma A1235.

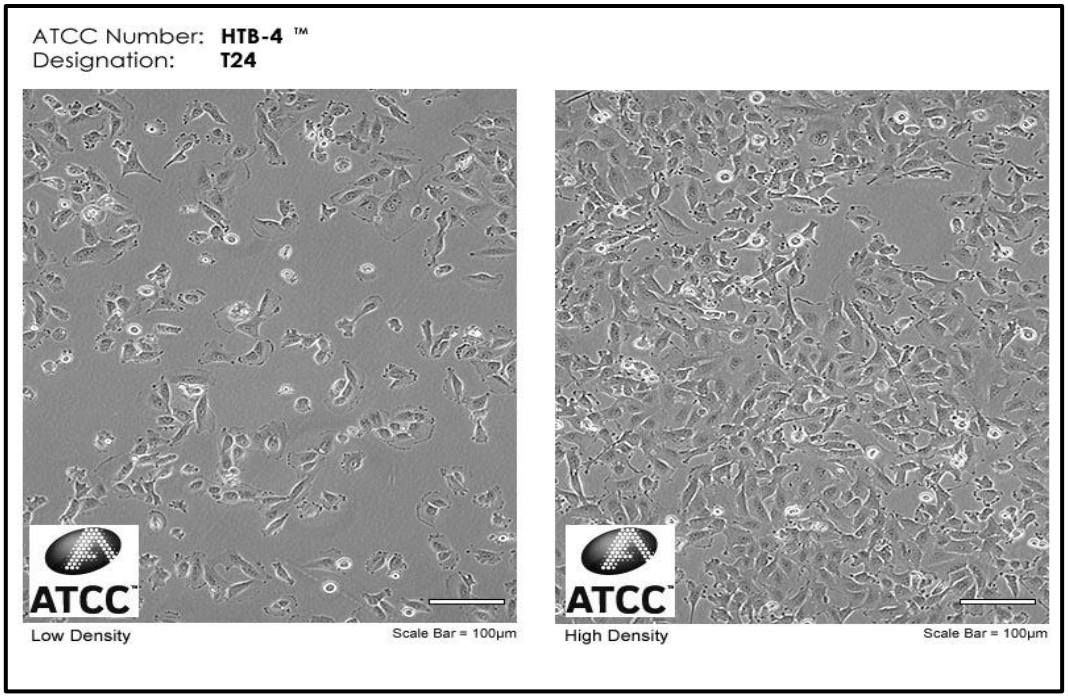
3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE LINIJE

In vitro istraživanje ispitivanja djelovanja izotiocijanata se provodilo na karcinomskim stanicama T24 i A1235. Obilježja tih staničnih linija su prikazana u tablicama.

Tablica 4. Obilježja T24 stanične linije (preuzeto s:http://www.lgcstandards-atcc.org)

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	Mokraćni mjehur
Forma proizvoda	Smrznuto
Morfologija	Epitelna
Obilježje kulture	Adherentna
Bolest	Karcinom prijelaznih stanica
Dob i spol	81 godina, žena

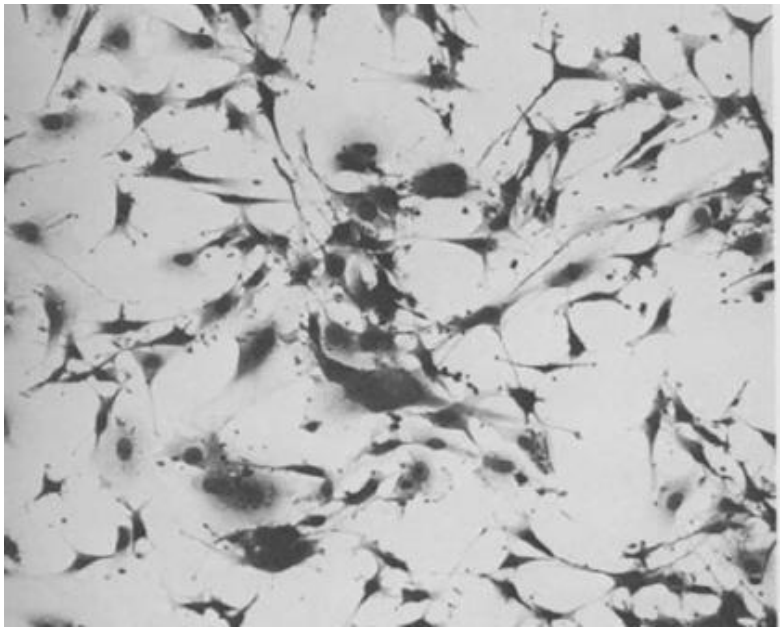


Slika 11. Karcinomske stanice T24 stanične linije

Preuzeto s: http://www.lgcstandards-atcc.org

Tablica 5. Obilježja A1235 stanične linije (preuzeto s: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698499)

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	Mozak
Forma proizvoda	Smrznuto
Bolest	Glioblastoma
Genetska specifičnost	EGFR gen; EGFR divlji tip



Slika 12. Karcinomske stanice A1235
Preuzeto s: http://jnci.oxfordjournals.org.gate2.inist.fr/content/51/5/1417.short

3.2. POSTUPAK

Stanične linije su nakon odmrzavanja uzgojene u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru na 37^{o}C uz 5% CO_2. DMEM medij sadrži potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline, minerali i FBS (goveđi serum). Osim toga, u njemu se nalaze i antibiotik, te Red fenol indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti.

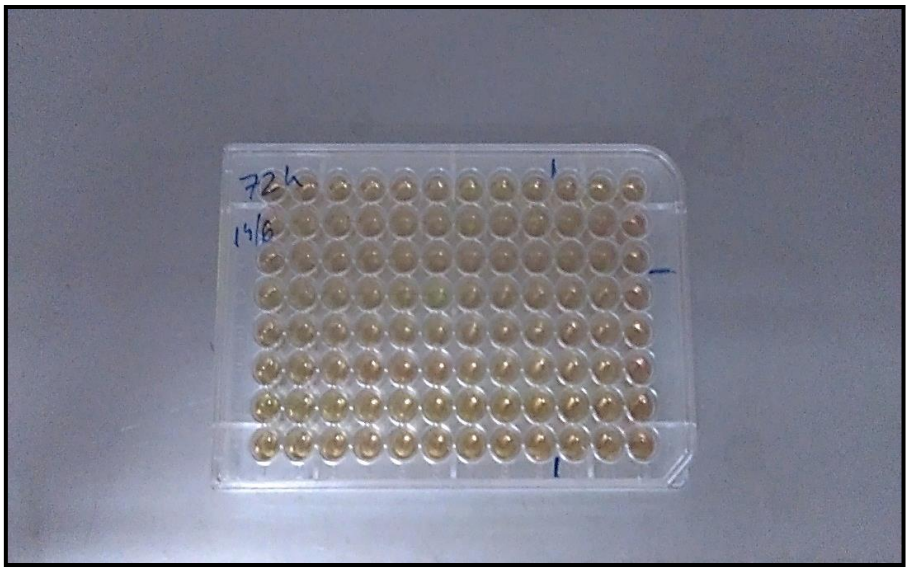
Stanice koje su adherirale na podlogu, nakon uklanjanja DMEM-a, tretiraju se tripsinom, enzimom koji cijepanjem peptidnih veza omogućuje odvajanje stanica od podloge te njihovo presađivanje.

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

U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim vodenim otopinama izotiocijanata iz porodice kupusnjača u koncentracijama 5µM, 10µM, 0,5mM i 5mM i 10µM i 20µM tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice koje predstavljaju kontrolu su ostavljene u samom mediju, te u njih nisu dodane otopine izotiocijanata.



Slika 13. Vlažni inkubator za uzgoj stanica (preuzeto s: http://www.nuve.com.tr/)

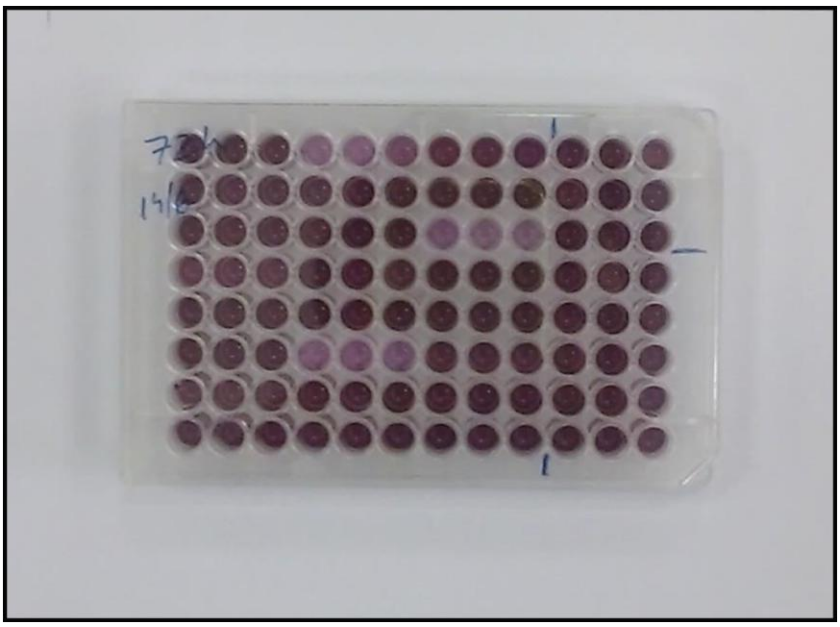


Slika 14. Karcinomske stanice presađene u 96 jažicai izložene različitim koncentracijama izotiocijanata (prije dodavanja MTT-a).

3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Stanična živost i proliferacija određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu. Žuti tetrazolin MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) se reducira u metabolički aktivnim stanicama. MTT testom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja jednom od ekstrakata biljaka, jer mrtve, odnosno metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a Rezultirajući intracelularni ljubičasti formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski. Da bi se mogla očitati apsorbancija (na 570 nm) novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid). Nakon jednog sata MTT je ispran i dodan je DMSO. Pločice su inkubirane 10 min na 37°C uz treskanje. Apsorbancija je mjerena na 570 nm (signal) i 690 nm (pozadina).

Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama izotiocijanata te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih izotiocijanata.



Slika 15. Ljubičasto obojenje (biljeg živih stanica) nakon dodavanja DMSO-a (koji otapa neotopljeni ljubičasti spoj formazan) u otopinu MTT-a



Slika 16. Spektrofotometar

4. REZULTATI

Empirijska obrada: Kao ograničenje istraživanja uzima se zanemarivanje vremenskog aspekta. Razlog je premala serija podataka.

4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – stanična linija T24

Tablica 6. Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih izotiocijanatima nakon **4h inkubacije**.

	10 uM	% A*	5 µM	% A*
ALIL	0,682	**0,92831216**	0,669666667	**0,911524501**
FENIL	0,724	**0,985480944**	0,680666667	**0,926497278**
BENZIL	0,724666667	**0,986388385**	0,748666667	**1,019056261**
2-FENIL ETIL	0,693333333	**0,943738657**	0,725666667	**0,987749546**
IZOPROPIL	0,690666667	**0,940108893**	0,663333333	**0,902903811**
4-METOKSIFENIL	0,731	**0,995009074**	0,694333333	**0,945099819**
3-METOKSIFENIL	0,729333333	**0,992740472**	0,715333333	**0,973684211**
p-TOLIL	0,657	**0,894283122**	0,738333333	**1,004990926**
4-(METILTIO)-FENIL	0,548	**0,745916515**	0,667333333	**0,908348457**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,734666667

	5 mM	% A*	0,5 mM	% A*
ALIL	0,112333333	**0,222002635**	0,212666667	**0,420289855**
FENIL	0,064666667	**0,127799736**	0,256666667	**0,507246377**
BENZIL	0,064333333	**0,127140975**	0,126666667	**0,250329381**
2-FENIL ETIL	0,053	**0,104743083**	0,113666667	**0,224637681**
IZOPROPIL	0,134666667	**0,266139657**	0,264333333	**0,522397892**
4-METOKSIFENIL	0,1225	**0,242094862**	0,232333333	**0,459156785**
3-METOKSIFENIL	0,143333333	**0,283267457**	0,154333333	**0,305006588**
p-TOLIL	0,076333333	**0,15085639**	0,193	**0,381422925**
4-(METILTIO)-FENIL	0,137333333	**0,27140975**	0,123	**0,243083004**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,506

Tablica 7. Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih izotiocijanatima nakon **24h inkubacije.**

	10 µM	**% A***	**5 µM**	**% A***
ALIL	0,451	**0,763113367**	0,501333333	**0,848279752**
FENIL	0,532666667	**0,901297236**	0,533666667	**0,902989284**
BENZIL	0,318	**0,538071066**	0,461333333	**0,780597857**
2-FENIL ETIL	0,224	**0,379018613**	0,484666667	**0,820078962**
IZOPROPIL	0,497333333	**0,841511562**	0,532	**0,900169205**
4-METOKSIFENIL	0,537666667	**0,909757473**	0,536333333	**0,90750141**
3-METOKSIFENIL	0,528333333	**0,893965031**	0,56	**0,947546531**
p-TOLIL	0,530666667	**0,897913142**	0,546666667	**0,9249859**
4-(METILTIO)-FENIL	0,403333333	**0,682459109**	0,493666667	**0,835307389**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,591

	5 mM	**% A***	**0,5 mM**	**% A***
ALIL	0,055666667	**0,176160338**	0,051	**0,161392405**
FENIL	0,070333333	**0,22257384**	0,090666667	**0,286919831**
BENZIL	0,075333333	**0,238396624**	0,048666667	**0,154008439**
2-FENIL ETIL	0,06	**0,189873418**	0,042666667	**0,135021097**
IZOPROPIL	0,061333333	**0,194092827**	0,069666667	**0,220464135**
4-METOKSIFENIL	0,076166667	**0,241033755**	0,079333333	**0,251054852**
3-METOKSIFENIL	0,076666667	**0,242616034**	0,056	**0,17721519**
p-TOLIL	0,061	**0,193037975**	0,042	**0,132911392**
4-(METILTIO)-FENIL	0,137666667	**0,435654008**	0,055666667	**0,176160338**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,316

Tablica 8. Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih izotiocijanatima nakon **48h inkubacije.**

	10 µM	**% A***	**5 µM**	**% A***
ALIL	0,426666667	**0,804020101**	0,455666667	**0,858668342**
FENIL	0,459666667	**0,86620603**	0,444666667	**0,837939698**
BENZIL	0,197	**0,371231156**	0,42	**0,791457286**
2-FENIL ETIL	0,110666667	**0,208542714**	0,474666667	**0,894472362**
IZOPROPIL	0,440666667	**0,83040201**	0,415666667	**0,783291457**
4-METOKSIFENIL	0,452	**0,851758794**	0,431333333	**0,81281407**
3-METOKSIFENIL	0,460666667	**0,868090452**	0,479333333	**0,903266332**
p-TOLIL	0,434333333	**0,818467337**	0,505333333	**0,952261307**
4-(METILTIO)-FENIL	0,346	**0,65201005**	0,466	**0,878140704**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,530666667

	5 mM	**% A***	**0,5 mM**	**% A***
ALIL	0,033333333	**0,165289256**	0,033	**0,163636364**
FENIL	0,037	**0,183471074**	0,052333333	**0,259504132**
BENZIL	0,053666667	**0,266115702**	0,034	**0,168595041**
2-FENIL ETIL	0,041666667	**0,20661157**	0,044333333	**0,219834711**
IZOPROPIL	0,026333333	**0,130578512**	0,050333333	**0,249586777**
4-METOKSIFENIL	0,039	**0,19338843**	0,074	**0,366942149**
3-METOKSIFENIL	0,071	**0,352066116**	0,048	**0,238016529**
p-TOLIL	0,041333333	**0,204958678**	0,041666667	**0,20661157**
4-(METILTIO)-FENIL	0,069666667	**0,345454545**	0,047333333	**0,234710744**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,201666667

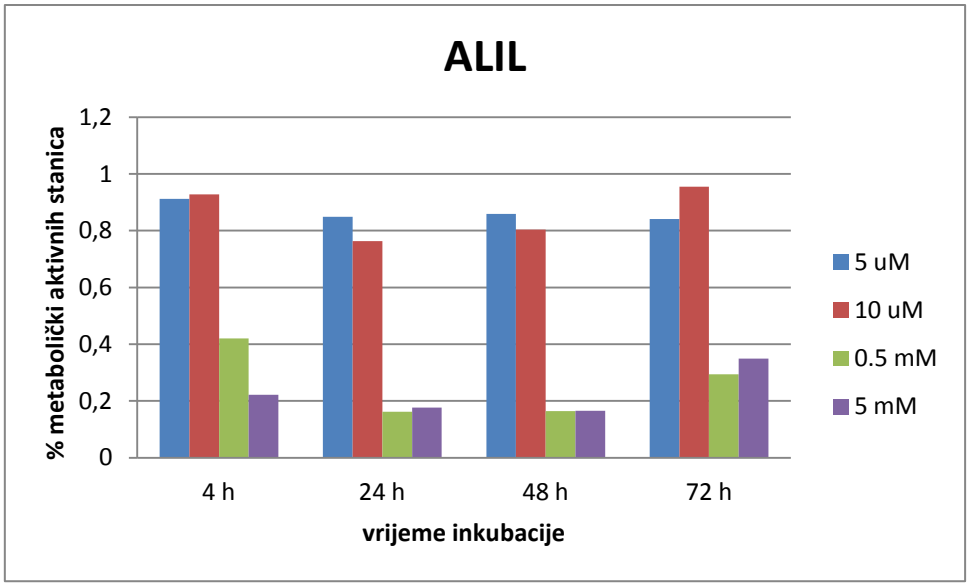
Tablica 9. Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih izotiocijanatima nakon **72h inkubacije.**

	10 µM	**% A***	**5 µM**	**% A***
ALIL	0,304666667	**0,955067921**	0,268333333	**0,841170324**
FENIL	0,312333333	**0,979101358**	0,256333333	**0,803552769**
BENZIL	0,080666667	**0,252873563**	0,273	**0,855799373**
2-FENIL ETIL	0,037	**0,115987461**	0,317666667	**0,995820272**
IZOPROPIL	0,261	**0,818181818**	0,267333333	**0,838035528**
4-METOKSIFENIL	0,312833333	**0,980668757**	0,274666667	**0,861024033**
3-METOKSIFENIL	0,263666667	**0,826541275**	0,272	**0,852664577**
p-TOLIL	0,237	**0,742946708**	0,328333333	**1,029258098**
4-(METILTIO)-FENIL	0,222666667	**0,698014629**	0,296	**0,927899687**

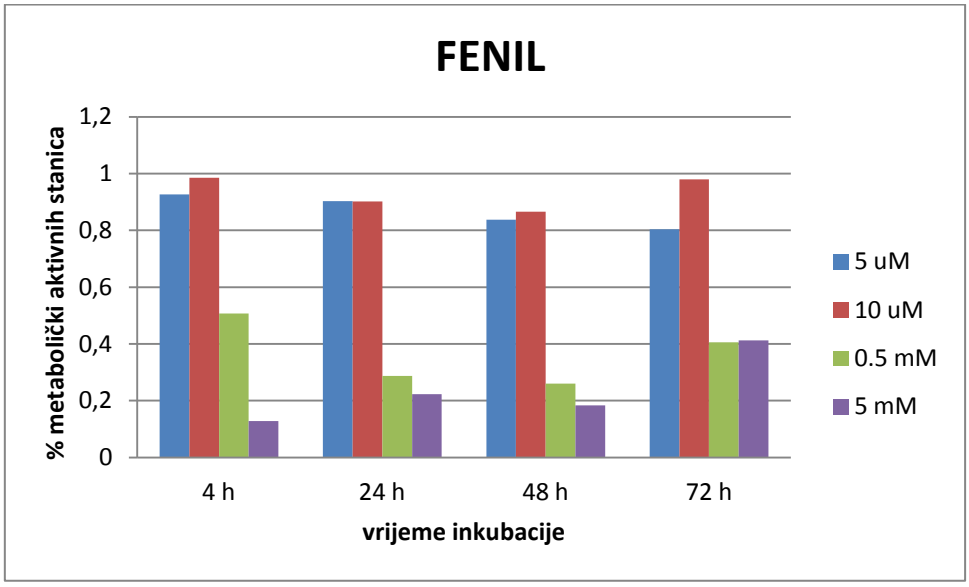
*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,319

	5 mM	**% A***	**0,5 mM**	**% A***
ALIL	0,016666667	**0,34965035**	0,014	**0,293706294**
FENIL	0,019666667	**0,412587413**	0,019333333	**0,405594406**
BENZIL	0,022666667	**0,475524476**	0,016666667	**0,34965035**
2-FENIL ETIL	0,013666667	**0,286713287**	0,019333333	**0,405594406**
IZOPROPIL	0,004666667	**0,097902098**	0,025333333	**0,531468531**
4-METOKSIFENIL	0,016166667	**0,339160839**	0,027333333	**0,573426573**
3-METOKSIFENIL	0,049666667	**1,041958042**	0,022666667	**0,475524476**
p-TOLIL	0,016666667	**0,34965035**	0,019333333	**0,405594406**
4-(METILTIO)-FENIL	0,043666667	**0,916083916**	0,021	**0,440559441**

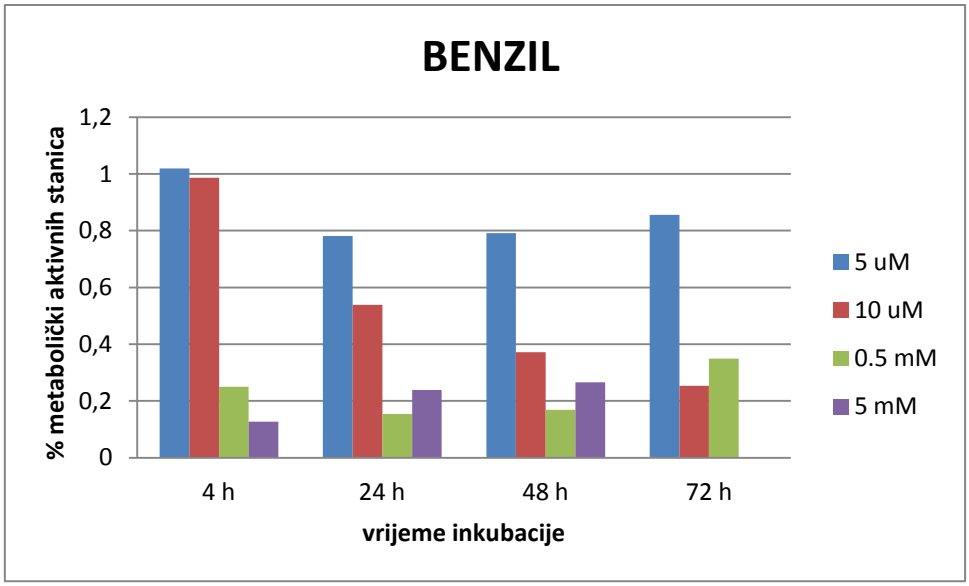
*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,047666667



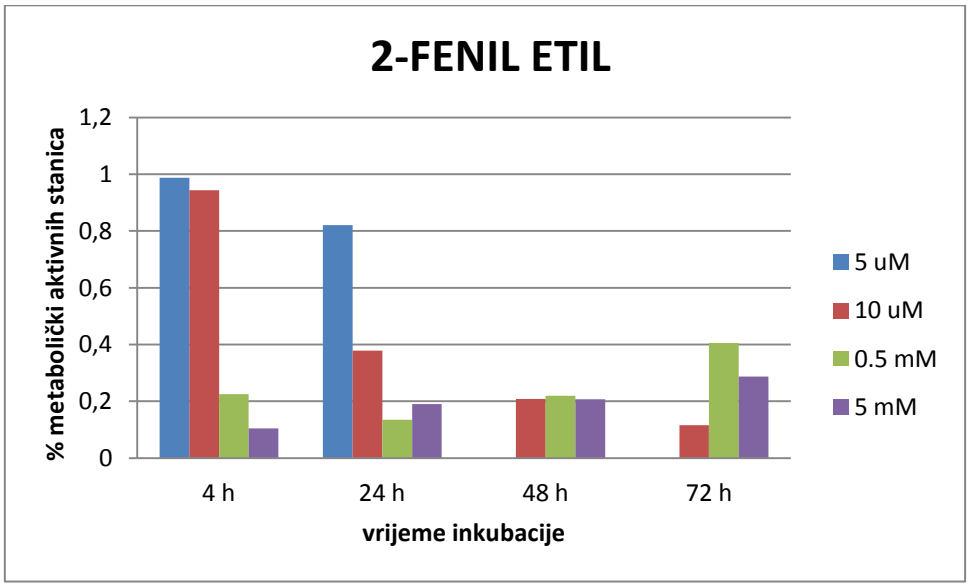
Slika 17. Alil izotiocijanatpokazuje značajni citotoksični učinak pri većim koncentracijama (0,5 i 5mM). Najmanje metabolički aktivnih stanica je uočeno pri koncentraciji od 0,5mM, nakon 24h inkubacije, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica.



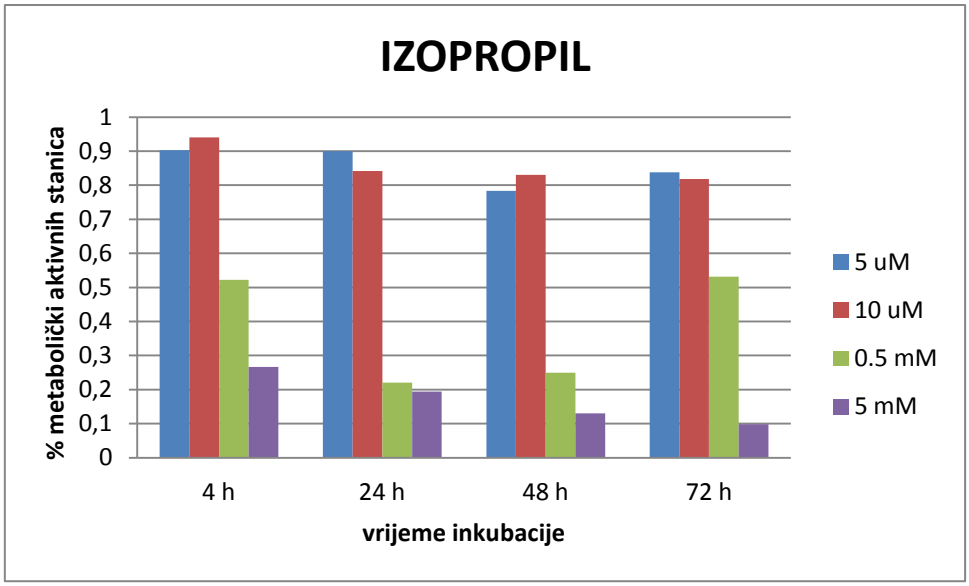
Slika 18. Fenil izotiocijanat u koncentraciji od 5mM već nakon 4h inkubacije pokazuje značajan citotoksični učinak, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica.



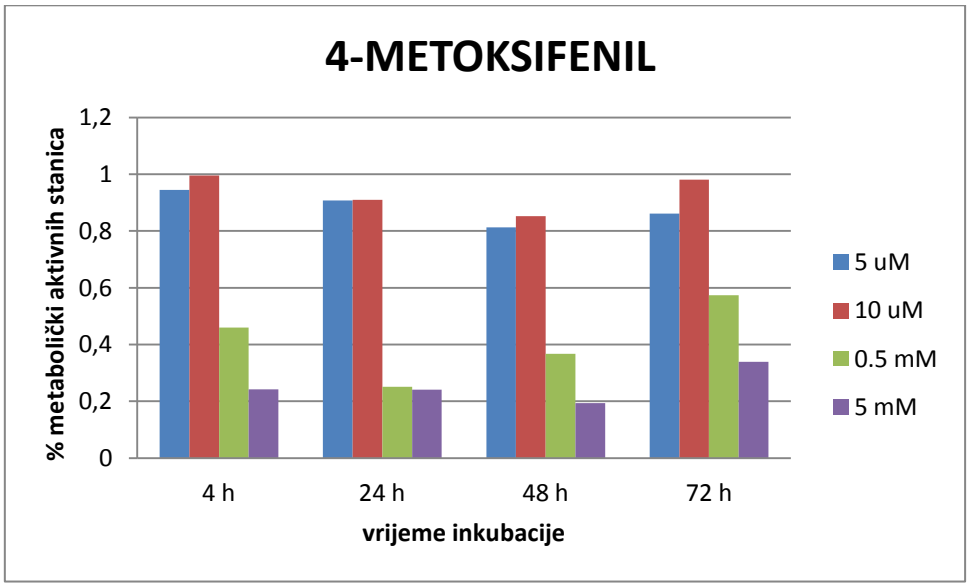
Slika 19. Benzil izotiocijanat najveći učinak ima pri koncentraciji od 5 mM, nakon 4h inkubacije.



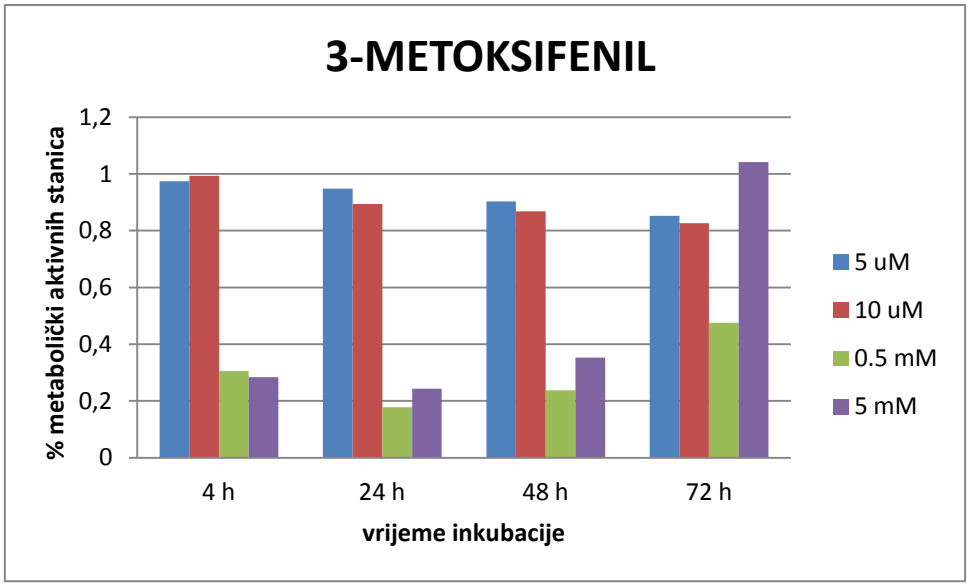
Slika 20. 2- fenil etil izotiocijanatu koncentraciji od 5mM ostvaruje svoj najveći citotoksični učinak nakon 4h inkubacije stanica, nakon čega dolazi do oporavka. Koncentracija od 10µM nakon 72h značajno smanjuje postotak metabolički aktivnih stanica.



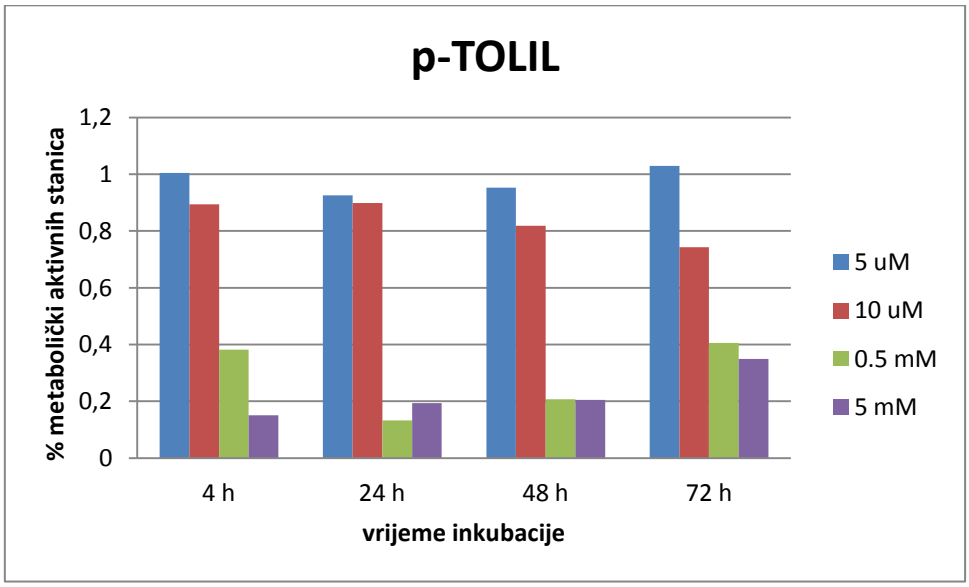
Slika 21. Izopropil izotiocijanat nakon 72h ostvaruje značajni učinak pri koncentraciji od 5mM.



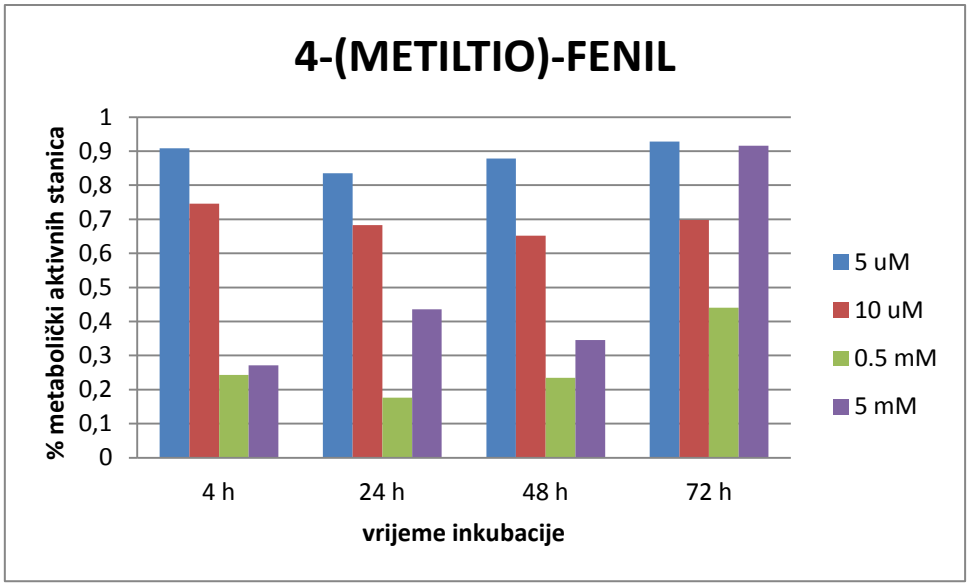
Slika 22. 4-metoksifenil izotiocijanat u koncentraciji od 5mM nakon 48h ima najmanji postotak metabolički aktivnih stanica.



Slika 23. 3-metoksifenil izotiocijanat nakon 24h u koncentraciji od 0,5mM ima najveći citotoksični učinak.



Slika 24. P-tolil izotiocijanat nakon 4h značajni učinak postiže u koncentraciji od 5mM, ali maksimalni postiže pri koncentraciji od 0,5mM nakon 24h.



Slika 25. 4-(metiltio)-fenil izotiocijanatje najučinkovitiji nakon 24h inkubacije pri koncentraciji od 0,5mM.

Općenito, svi izotiocijanati bolji učinak ostvaruju pri višim koncentracijama od 0,5 ili 5mM, pri različitim vremenima inkubacije.Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica ima **izopropil izotiocijanat** pri koncentraciji od 5mM nakon 72h inkubacije, pri čemu je apsorbancija stanica A=0,004666667, a postotak apsorbancije stanica %A=0,097902098.

4.2. GLIOBLASTOM – stanična linija A1235

Tablica 10. Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih izotiocijanatima nakon **4h inkubacije**.

	20 uM	% A*	10µM	% A*
ALIL	0,378666667	**0,427067669**	0,635666667	**0,716917293**
FENIL	0,678666667	**0,765413534**	0,65	**0,733082707**
BENZIL	0,659666667	**0,743984962**	0,513333333	**0,578947368**
2-FENIL ETIL	0,549	**0,619172932**	0,578	**0,651879699**
IZOPROPIL	0,426	**0,480451128**	0,677333333	**0,763909774**
4-METOKSIFENIL	0,663	**0,747744361**	0,681666667	**0,768796992**
3-METOKSIFENIL	0,598666667	**0,67518797**	0,664666667	**0,74962406**
p-TOLIL	0,616666667	**0,695488722**	0,666	**0,75112782**
4-(METILTIO)-FENIL	0,567666667	**0,640225564**	0,659	**0,743233083**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,886666667

Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih izotiocijanatima nakon **24h inkubacije**.

	20 uM	% A*	10µM	% A*
ALIL	0,546333333	**0,900549451**	0,586666667	**0,967032967**
FENIL	0,522333333	**0,860989011**	0,567333333	**0,935164835**
BENZIL	0,061666667	**0,101648352**	0,527333333	**0,869230769**
2-FENIL ETIL	0,595666667	**0,981868132**	0,596	**0,982417582**
IZOPROPIL	0,548	**0,903296703**	0,595	**0,980769231**
4-METOKSIFENIL	0,483666667	**0,797252747**	0,574	**0,946153846**
3-METOKSIFENIL	0,587666667	**0,968681319**	0,569	**0,937912088**
p-TOLIL	0,542	**0,893406593**	0,602	**0,992307692**
4-(METILTIO)-FENIL	0,421666667	**0,695054945**	0,432	**0,712087912**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,606666667

Tablica 11. Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih izotiocijanatima nakon **48h inkubacije**.

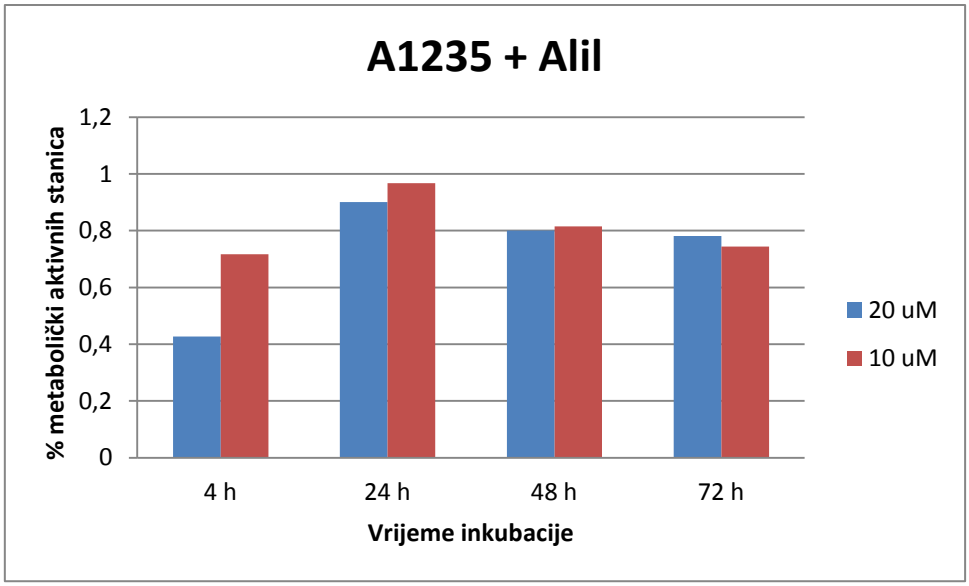
	20 uM	% A*	10µM	% A*
ALIL	0,483333333	**0,799779371**	0,492666667	**0,815223387**
FENIL	0,477	**0,789299504**	0,506	**0,837286266**
BENZIL	0,484333333	**0,801434087**	0,369	**0,610590182**
2-FENIL ETIL	0,474	**0,784335356**	0,53	**0,876999448**
IZOPROPIL	0,507333333	**0,839492554**	0,544666667	**0,901268616**
4-METOKSIFENIL	0,455	**0,752895753**	0,55	**0,910093767**
3-METOKSIFENIL	0,494	**0,817429675**	0,552	**0,913403199**
p-TOLIL	0,522666667	**0,864864865**	0,532	**0,88030888**
4-(METILTIO)-FENIL	0,395333333	**0,654164368**	0,498	**0,824048538**

*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,604333333

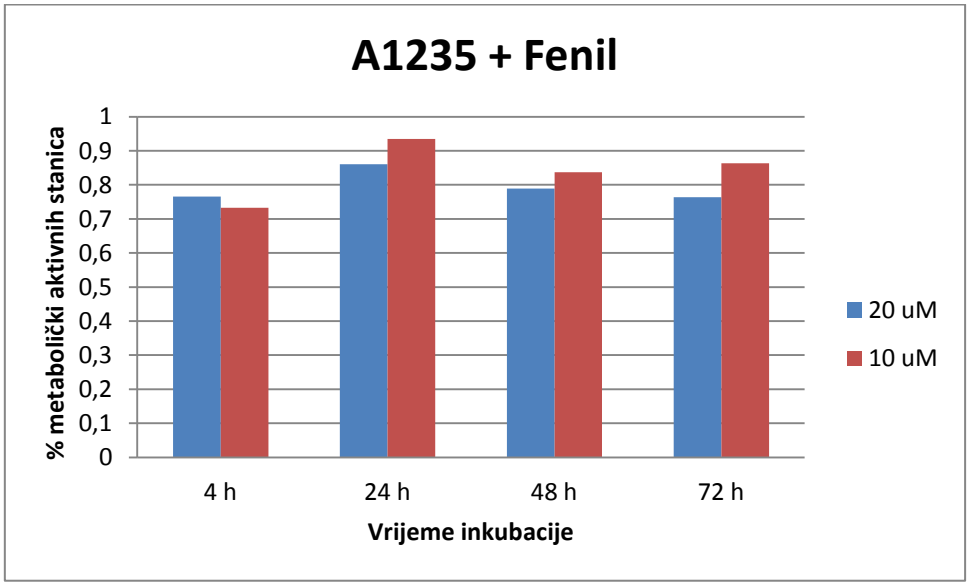
Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih izotiocijanatima nakon **72h inkubacije**.

	20 uM	% A*	10µM	% A*
ALIL	0,476	**0,781609195**	0,453333333	**0,74438971**
FENIL	0,465333333	**0,764094143**	0,526	**0,863711002**
BENZIL	0,446333333	**0,732895457**	0,339666667	**0,557744937**
2-FENIL ETIL	0,437	**0,717569787**	0,564	**0,926108374**
IZOPROPIL	0,516666667	**0,848385331**	0,567333333	**0,931581828**
4-METOKSIFENIL	0,500666667	**0,822112753**	0,583666667	**0,958401752**
3-METOKSIFENIL	0,591	**0,97044335**	0,613666667	**1,007662835**
p-TOLIL	0,488333333	**0,801860974**	0,614333333	**1,008757526**
4-(METILTIO)-FENIL	0,366	**0,600985222**	0,572333333	**0,939792009**

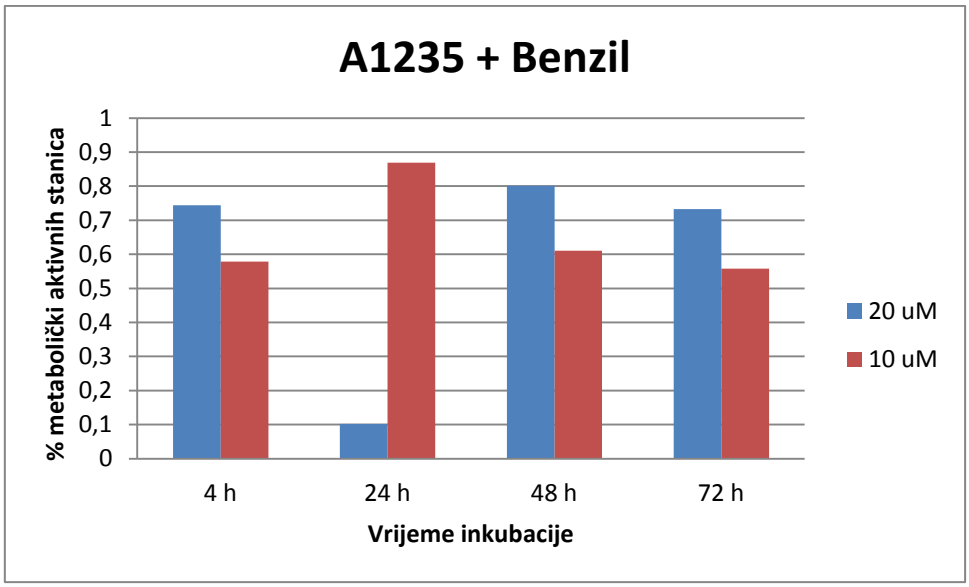
*%A= A(izotiocijanata)/A(kontrole); A(kontrole)=0,609



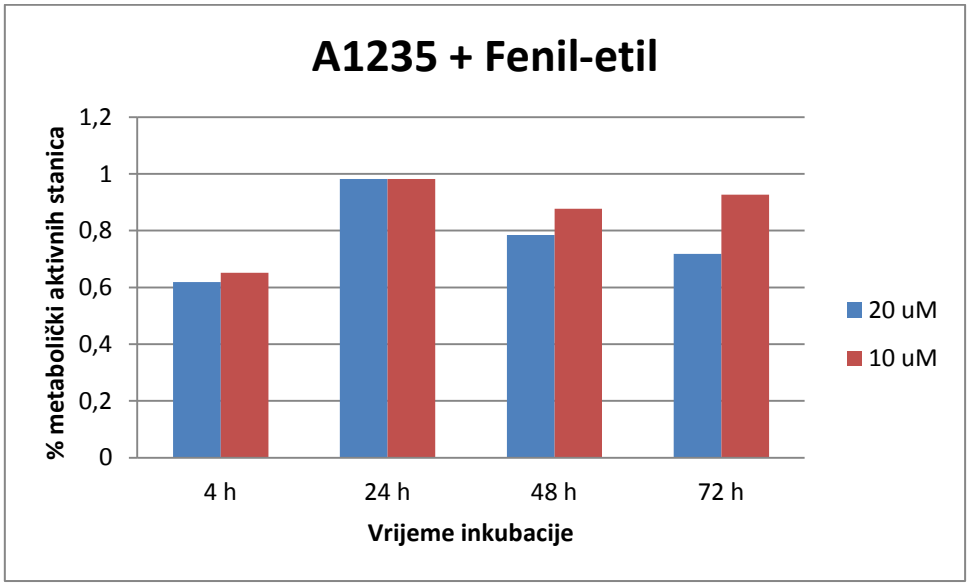
Slika 26. Alil izotiocijanatnajznačajniji učinak pokazuje u koncentraciji od 20µM, nakon 4h inkubacije. Nakon 24h dolazi do oporavka stanica kod obje koncentracije, ali daljnjom inkubacijom opet se smanjuje broj metabolički aktivnih stanica.



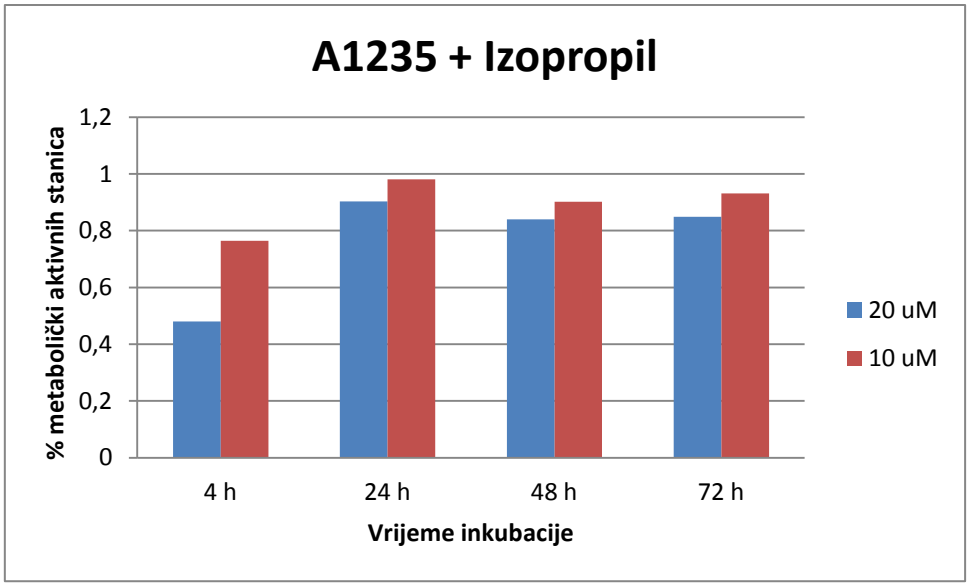
Slika 27. Fenil izotiocijanat nakon 4h inkubacije bolji učinak ima pri koncentraciji od 10µM, što je ujedno i njegov najjači citotoksični učinak. Daljnjom inkubacijom veća koncentracija pokazuje bolji učinak, s tim da nakon 24h dolazi do oporavka stanica kod obje koncentracije, a nakon 72h blagi je oporavak stanica tretiranih koncentracijom od 10µM.



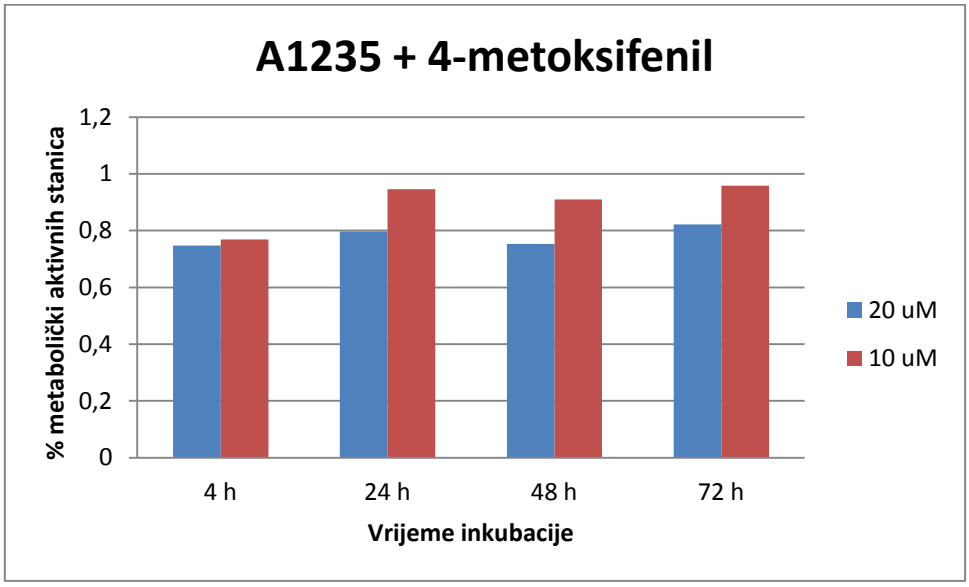
Slika 28. Benzil izotiocijanat pokazao je vrlo značajan citotoksični učinak nakon 24h inkubacije, pri koncentraciji od 20µM. Stanice se oporave nakon 48h, ali se učinak opet poveća nakon 72h inkubacije. Koncentracija od 10µM ima najveći učinak nakon 72h, s tim da se nakon 24h poveća postotak metabolički aktivnih stanica u odnosu na onaj nakon 4h.



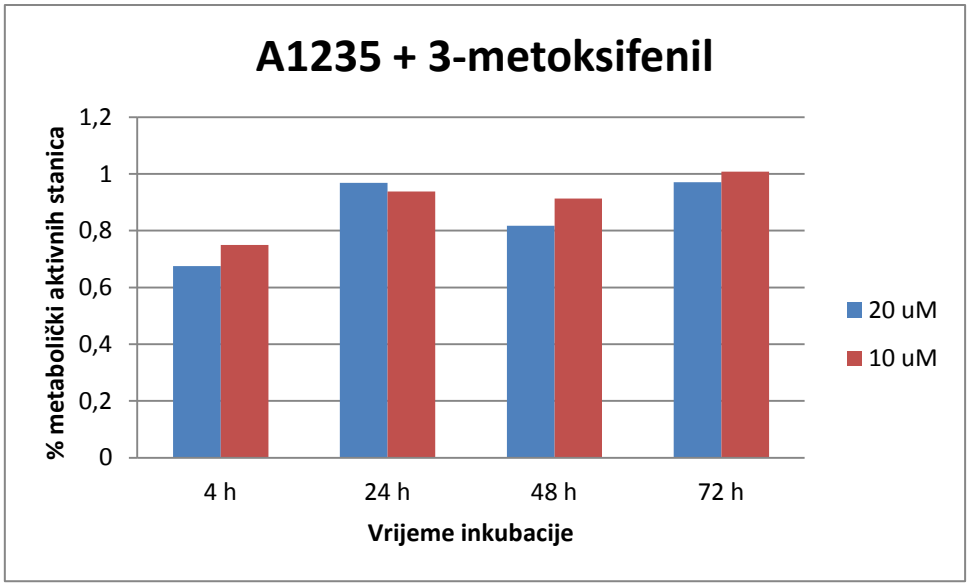
Slika 29. Fenil-etil izotiocijanat nakon 4h ima najjači učinak pri koncentraciji od 20µM. Pri toj koncentraciji dio stanica se oporavi nakon 24h, a onda opet učinak jača. Oporavak stanica pri koncentraciji od 10µM vidljiv je nakon 24h i 72h, a najjači učinak je nakon 4h.



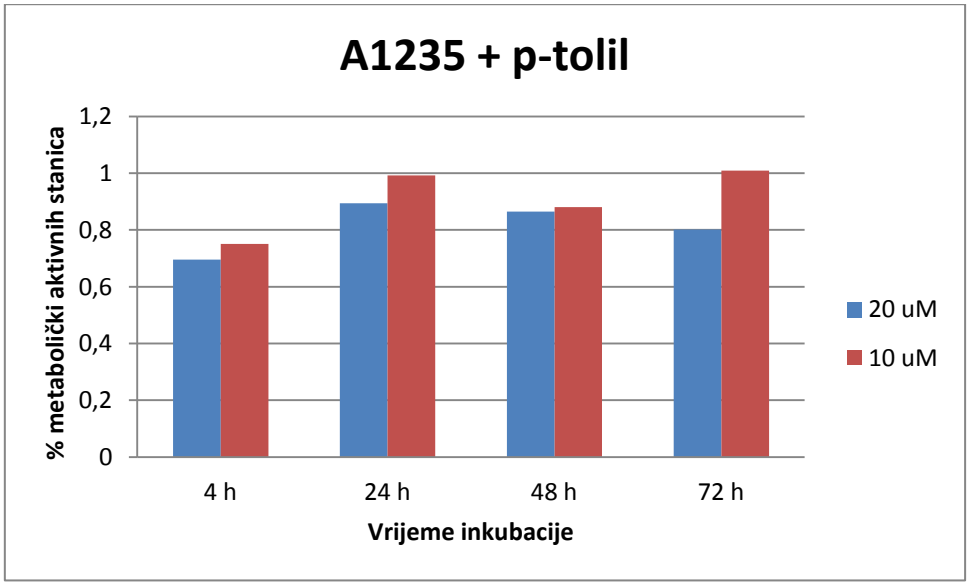
Slika 30. Izopropil izotiocijanat najjači učinak pokazuje nakon 4h, pri koncentraciji od 20µM, a oporavak se vidi nakon 24h i 72h. Koncentracija od 10µM također ima jaki učinak nakon 4h i pokazuje oporavak nakon 24 i 72h.



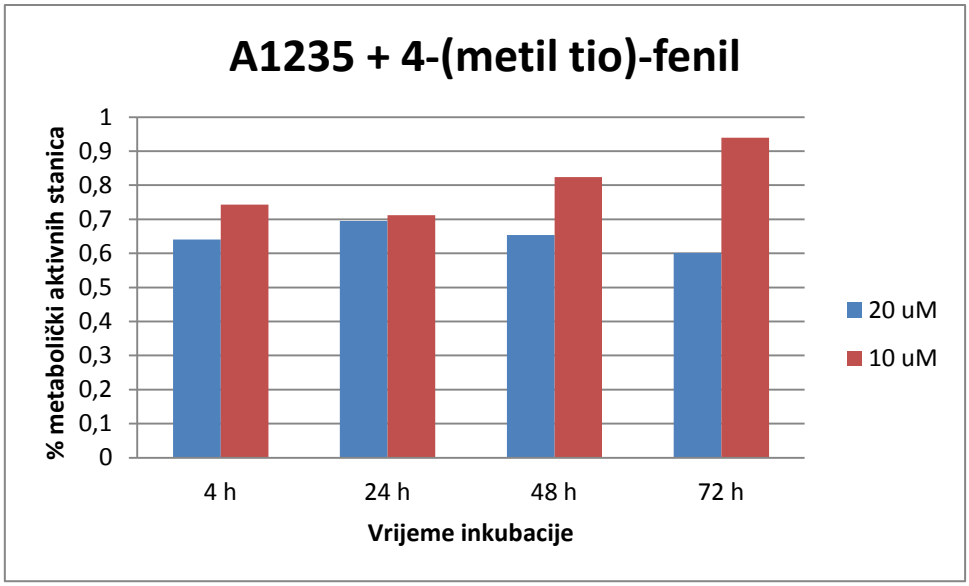
Slika 31. 4-metoksifenil izotiocijanatima sličan učinak pri obje koncentracije nakon 4h, s tim da je malo jači onaj pri 20µM. Kod obje koncentracije blagi oporavak stanica se vidi nakon 24h i 72h inkubacije.



Slika 32. 3-metoksifenil izotiocijanatje pokazao najjače citotoksično djelovanje pri većoj koncentraciji nakon 4h, ali se dio stanica oporavio nakon 24h i 72h.



Slika 33. P-tolil izotiocijanat nakon 4h inkubacije i pri koncentraciji od 20µM ima najmanji postotak metabolički aktivnih stanica. Oporavak je vidljiv nakon 24h pri višoj koncentraciji, te nakon 24h i 72h pri nižoj koncentraciji.



Slika 34. 4-(metiltio)-fenil izotiocijanat će najviše smanjiti broj metabolički aktivnih stanica nakon 72h inkubacije i pri koncentraciji od 20µM. Kod koncentracije od 10µM je najjači učinak nakon 24h, s tim da dolazi do značajnog oporavka stanica nakon 72h.

Većina izotiocijanata najjači citotoksični učinak ima pri većoj koncentraciji od 20µM (osim fenil-izotiocijanata). Najznačajniji učinak na smanjenje broja metabolički aktivnih stanica ima **benzil izotiocijanat** pri koncentraciji od 20µM nakon 24h inkubacije, pri čemu je apsorbancija stanica A=0,061666667, a postotak apsorbancije stanica %A=0,101648352.

5. RASPRAVA

Karcinom mokraćnog mjehura je česti urološki karcinom koji ima najvišu stopu recidiva od svih malignosti. U Sjevernoj Americi, Južnoj Americi, Europi i Aziji najčešći tip je karcinom prijelaznih stanica. Do 80% slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura povezano je s izloženošću okolišnim čimbenicima. Pušenje je daleko najčešći uzrok u SAD-u, a raste na važnosti i u nekim zemljama u razvoju. Trajanje pušenja i intenzitet su izravno povezani s povećanim rizikom. Rizik od razvoja karcinoma je 2-6 puta veći kod pušača nego nepušača. Rizik je sličan kod muškaraca i žena. Nitrozamin, 2-naftilamin i 4-aminobifenil su mogući kancerogeni spojevi u dimu cigarete.Brojna zanimanja uključuju izloženost tvarima koje mogu povećati rizik od karcinoma mokraćnog mjehura. Stopa oboljenja je najveća kod radnika izloženih aromatskim aminima, a smrtnost je najveća kod izloženosti policikličkim aromatskim ugljikovodicima i teškim metalima. Kemoterapija ciklofosfamidompovećava rizik od karcinoma mokraćnog mjehura putem izloženosti akroleinu, mokraćnom metabolitu ciklofosfamida (13).

Multiformni glioblastom je najčešći i najmaligniji od svih glija tumora. U SAD-u glioblastom je nešto češći kod bijelaca. U pregledu 1003 biopsije glioblastoma iz Sveučilišne bolnice u Zürichu, muškarci su imali blagu prevagu nad ženama, s omjerom muško:žensko = 3:2. Multiformni glioblastom može se manifestirati kod osoba bilo koje dobi, ali su to najčešće odrasle osobe, s najvišom incidencijom 45-70 godina. Pacijenti koji su liječeni optimalnom terapijom, uključujući kirurške resekcije, terapije zračenjem i kemoterapijom, imaju srednju vrijednost preživljavanja od oko 12 mjeseci, s manje od 25% bolesnika koji su preživjeli do 2 godine, a manje od 10% bolesnika koji su preživjeli do 5 godina (14).

Svrha ovog istraživanja je utvrditi može li se, osim standardnog liječenja citostaticima, uvesti mogućnost liječenja ili potporne terapije u vidu biljnih izvora.

Tablica 12. Tradicionalno korištene biljke u liječenju i prevenciji različitih linija karcinoma (15)

NAZIV BILJKE	**DJELOVANJE**	**RAZINA DOKAZA**
Chelidonium majus (Rosopas)	prevencija i terapija raka	B
Actaea racemosa (Habulica)	prevencija raka dojke	C
Oenothera biennis (Noćurak)	prevencija i terapija raka dojke	C
Linum usitatissimum (Lan)	prevencija i terapija raka dojke	C
Paeonia sp. (Božur)	rak pluća	C
Salvia officinalis (Kadulja)	prevencija raka pluća	C

Rhodiola rosea (Rodiola)	rak mokraćnog mjehura	C
Boswelia serrata (Indijski tamjan)	terapija raka mozga	B
Lycium sp. (Goji)	prevencija i terapija raka	C
Aloe vera	prevencija raka	C
Asimina triloba (Indijanska banana)	terapija raka	C
Astragalus membranaceus (Kozlinac)	terapija raka	C
Bromelain	prevencija i terapija raka	C
Bupleurum sp.	prevencija hepatocelularnog karcinoma	C
Uncaria sp.	prevencija raka	C
Larrea sp.	prevencija i terapija raka	C
Chrysantemum sp.	prevencija raka, terapija prekancerogenih lezija	C
Echinacea sp.	prevencija i terapija raka	C
Gynostemma pentaphyllum (Jiaogulan)	prevencija i terapija raka	C
Allium sativum (Češnjak)	prevencija raka	C
Ginkgo biloba	rak debelog crijeva i rektuma, rak želuca, rak gušterače, rak jajnika	C
Ginseng	prevencija raka, rak želuca	C
Lavandula angustifolia	terapija uznapredovalog raka	C
Grifola fondoza (Maitake gljiva)	prevencija i terapija raka	C
Sylibum marianum	prevencija raka	C
Viscum album (Bijela imela)	prevencija i terapija raka	C
Modificirani pektini iz citrusa	rak prostate	C
Nerium oleander	prevencija i terapija raka	C
Podophylum sp.	rak maternice	C
Coriolus versicolor (Šarena tvrdokoška)	adjuvant (leukemija, rak debelog crijeva i rektuma, rak jetre, pluća, grla, želuca)	C
Plantago sp.	rak debelog crijeva	C
Trifolium pratense (Crvena djetelina)	rak prostate	C
Ganoderma lucidum (Hrastova sjajnica)	prevencija i terapija raka	C
Rheum sp.	rak grla	C
Salvia officinalis	prevencija raka pluća	C
Serenoa repens	prevencija raka, prevencija i terapija raka prostate	C
Lentinus edodes (Shiitake gljiva)	adjuvant u kemoterapiji	C

Scutellaria sp.	prevencija i terapija raka	C
Ulmus rubra (Glatki brijest)	prevencija i terapija raka	C
Rumex sp.	prevencija i terapija raka	C
Artroshpira sp. (alga spirulina)	rak usne šupljine	C
Fragaria sp.	prevencija raka rektuma i debelog crijeva	C
Artemisia annua (Slatki pelin)	prevencija i terapija raka	C
Camellia sinensis (Zeleni čaj)	prevencija i terapija raka	C
Curcuma longa	prevencija i terapija raka	C

*B – dobri znanstveni dokazi; do dva RKT (randomizirana kontrolirana pokusa) ili bar jedna meta analiza ili slabija studija i utemeljenje u teoriji/*in vivo* pokusima.

*C – nejasni ili proturječni znanstveni dokazi; RKT slabije kvalitete, slabije studije bez dokaza u teoriji/ *in vivo* pokusima ili samo teorijski/ *in vivo* dokazi.

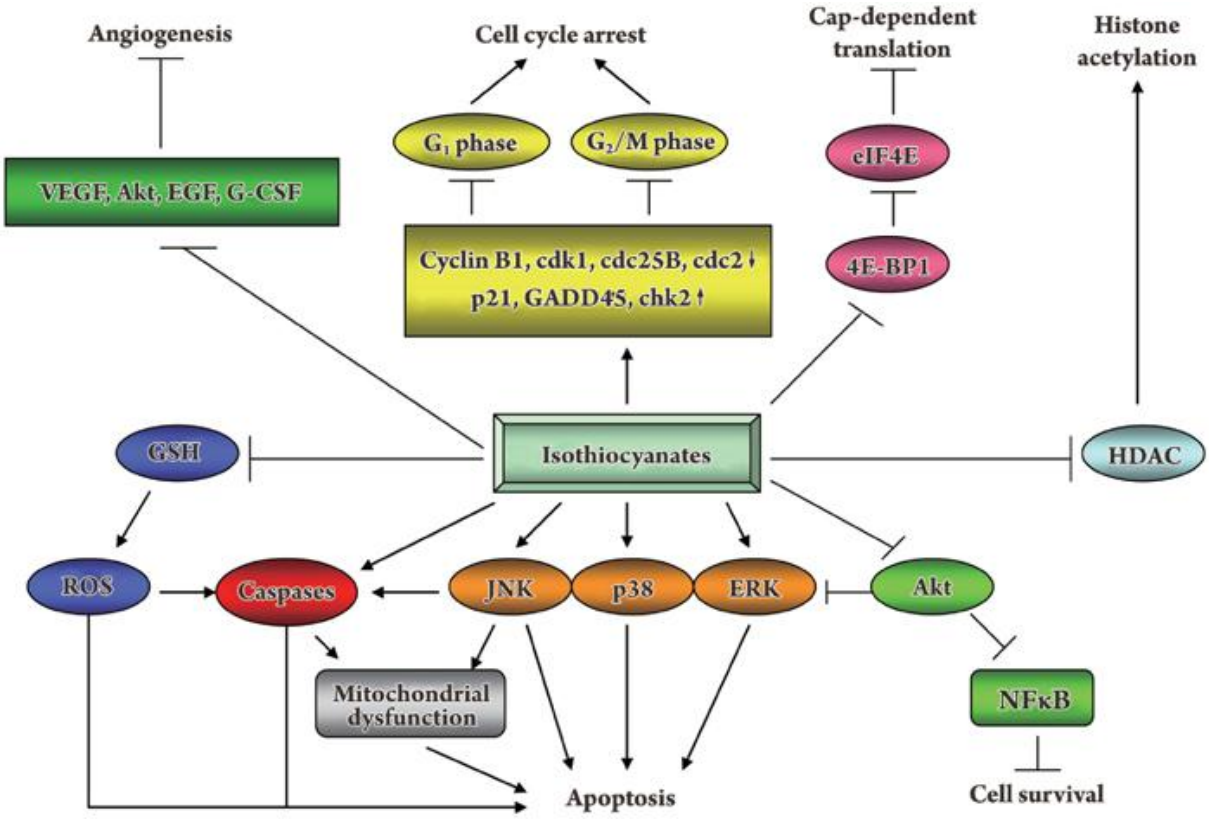
Tablica prikuje biljne vrste koje se koriste za prevenciju, odnosno terapiju karcinoma, a navedene su i razine dokaza za pojedinu tvrdnju. Dobre znanstvene dokaze o antitumorskoj aktivnosti imaju biljke *Chelidonium majus* (rosopas) i *Boswellia serrata* (indijski tamjan).

Chelidonium majus (rosopas) je biljka s čvrstim dokazima antitumorske aktivnosti. Jedna od studija je ispitivala djelovanje kelidonina izoliranog iz etanolnog ekstrakta rosopasa na HeLa stanice čiji su rezultati pokazali inhibiciju proliferacije i indukciju apoptoze HeLa stanica preko moguće promjene p38-p53 i AKT/PI3 kinazom signalnih puteva. Isto tako, rosopas je pokazao djelovanje u studiji u kojoj su se ispitivali toksični učinci ekstrakta biljke na humanim karcinomima staničnih linija A549, H460, HCT 116, SW480, MDA-MB 231 i MCF-7 putem MTT i SRB (sulforhodamin B) metoda. Ekstrakt rosopasa je pokazao povećanje citotoksičnosti ovisno o vremenu i dozi kod svih šest staničnih linija. Ovakvi rezultati ukazuju na moguću korisnost sirovog ekstrakta rosopasa u liječenju tumora, bilo preko svojeg izravnog citotoksičnog učinka, u prevenciji metastaza ili kao adjuvantna terapija (16).

Boswellia serrata je biljka koja se tradicionalnoupotrebljava u vjerske, medicinske i kozmetičke svrhe. Oleo smola biljke se koristi u tradicionalnoj medicini za liječenje različitih stanja kao što su artritis, astma, kronična bol, crijevne bolesti i mnoga druga. Triterpenoidalni dio biljke (sadrži bosvelične kiseline) je odgovoran za citotoksična i antitumorska svojstva. Od istraživanih spojeva, 3-O-acetil-11-keto bosvelična kiselina najviše obećava kao citotoksična molekula. Citotoksični i antitumorski učinci su uglavnom zbog indukcije

apoptoze putem aktivacije kaspaze, povećane Bax ekspresije, NF-kB down-regulacije i indukcije poli(ADP)-riboze polimeraze (PARP) (17).

Brojne studije podupiru činjenicu da fitokemikalije, koje se nalaze u određenim prehrambenim tvarima, štite od karcinoma. Biljke krstašice su široko prihvaćene kao komponente prehrane koje mogu smanjiti rizik od karcinoma.



Slika 35. Antitumorska aktivnost izotiocijanata
Preuzeto s: http://www.nature.com/aps/journal/v30/n5/fig_tab/aps200950f4.html#figure-title

Izotiocijanati, koji su predmet našeg istraživanja, su prirodne, male molekule koje nastaju iz glukozinolatnih prekursora u biljkama krstašicama. Mnogi izotiocijanati, sintetski ili prirodni, pokazuju antitumorski učinak, jer smanjuju aktivaciju karcinogena i povećavaju njihovu detoksikaciju (18).

Učestalost karcinoma mokraćnog mjehura značajno raste sa starenjem, što upućuje na moguću uporabu sredstava protiv starenja u kemoprevenciji karcinoma. *Rhodiola rosea*, koja raste u hladnim krajevima i na velikim visinama, pokazuje „anti-aging“ učinak. Ekstrakt

*R.rosea*i jednaod aktivnih komponenti, salidrozid, inhibira rast stanica karcinoma s minimalnim učinkom na nemaligne epitelne stanice. Mehanizam se temelji na porastu α-fosforilacije AMP-aktivirane protein-kinaze i smanjenju 4EPB1 fosforilacije (19).

Pokazano je da kemoterapija ima ograničeno antitumorsko djelovanje protiv uznapredovalog karcinoma mokraćnog mjehura. Stoga, postoji hitna potreba da se razviju učinkovite terapijske metode za takve pacijente. Povećane koncentracije lentinana (beta-glukan s glikozidnim vezama: β-1,3,β-1,6) ili lentinan u kombinaciji s gemcitabinom su u pozitivnoj korelaciji sa smanjenom proliferacijom T24 stanica.Lentinan u kombinaciji s kemoterapijom gemcitabinomznačajno inhibira proliferaciju karcinomskih stanica. Gemcitabin ima sposobnost induciranja apoptoze T24 stanica, a taj učinak je pojačan kada je u kombinaciji s lentinanom (20).

Gliomi predstavljaju najčešći i najmaligniji primarni tumor mozga. Trenutne standarne terapijske strategije (operacija, radioterapija, kemoterapija, npr. temozolomid, karmustin ili karboplatina) su samo palijativne i očekivano preživljenje je obično 6-12 mjeseci. Stoga je neophodan razvoj novih terapijskih strategija. Kanabinoidi su pokazali da djeluju antiproliferativno na širok spektar stanica u kulturi. Također, pokazali su i veliki potencijal u smanjenju rasta tumora glioma ili *in vitro*ili na životinjskim modelima. Čini se da su kanabinoidi selektivna antitumorska sredstva, jer ubijaju stanice glioma bez utjecaja na nepromijenjene stanice. Pilot studija na pacijentima s multiformnim glioblastomom pokazala je njihov dobar sigurnosni profil i izvanredan antitumorski učinak, te može biti podloga za daljnja ispitivanja antitumorskog djelovanja kanabinoida (21).

Kao predmet našeg istraživanja korištene su vodene otopine izotiocijanata iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*), odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije: T24 (karcinom mokraćnog mjehura) i A1235 (glioblastom).

In vitro istraživanje na stanicama glioblastoma A1235 pokazalo je da svi izotiocijanati imaju određeni učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica, a najznačajniji je benzil izotiocijanat pri koncentraciji od 20μM nakon 24h inkubacije.
Rezultati istraživanja na GBM 8401 stanicama glioblastoma pokazuju da benzil izotiocijanat inducira sub-G1 fazu i apoptozu GBM 8401 stanica. Također, dokazano je da benzil izotiocijanat inducira proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i otpuštanje Ca^{2+}, smanjuje mitohondrijski membranski potencijal i promovira kaspaze 8,9 i 3. Western blot pokazao je da BITC inducira Fas, Fas-L, FADD, kaspazu 8, kaspazu 3, proapoptotičke

proteine (Bax, Bid i Bak), a inhibira antiapoptotičke proteine (Bcl-2 i Bcl-x). BITC povećava otpušanje citokroma c, AIF-a, Endo G iz mitohondrija koji su doveli do apoptoze stanica. Rezultati također pokazuju da je povećana BITC GADD153, GRP, 78 XBP-1 i ATF-6p, IRE-1 a, IRE-1B kalpain 1 i 2 u GBM 8401 stanicama. Na temelju tih promatranja, možemo sugerirati da BITC-inducirana apoptoza može biti putem Fas receptora, ROS-om izazvanim ER stresom, kaspaze-3 i mitohondrijskih signalnih putova. Uzete zajedno, ove molekularne promjene i signalni putevi pružaju uvid u BITC-om izazvanu inhibicijurasta i induciranu smrt stanica (22).

Utjecaj na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 kod većine izotiocijanata je značajniji pri većim koncentracijama od 0,5 i 5mM. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica ima izopropil izotiocijanat pri koncentraciji od 5mM nakon 72h inkubacije.

Metastaze i recidivi karcinoma mokraćnog mjehura glavni su razlozi za njegovu lošu prognozu i visoku stopu smrtnosti. Zbog svoje biološke aktivnosti i visoke metaboličke aktivacije u mokraći, sulforafan, spoj koji se isključivo nalazi u krstašicama, ima snažan i specifičan potencijal za sprečavanje raka mokraćnog mjehura. Dokazano je da značajno suzbija različite biokemijske puteve, uključujući adheziju, invaziju, i kemotaksiju u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura. Transfekcija ciklooksigenazom 2 (COX-2), uvelike je obustavila inhibiciju ekspresije MMP2/9 i invazivnu sposobnoststanica. Osim toga, sulforafan inhibira epitelno-mezenhimalnu tranziciju, proces koji je temelj invazije tumorskih stanica, i migraciju posredovanu E-kadherinom. Studija pokazuje da sulforafan ima terapijski potencijal u sprečavanju ponovnog pojavljivanja karcinoma mokraćnog mjehura (23).

Izotiocijanatima se pridodaju i protuupalna svojstva, te postoji mogućnost korištenja kod neurodegenerativnih bolesti. Neuroupala je, zajedno s oksidativnim stresom, jedan od ključnih uzročnika neurodegenerativnih bolesti. U bolestima, kao što je Parkinsonova, ključno je pronaći multitargetnu terapiju, kako bi se spriječilo njezino napredovanje. Izotiocijanati su pokazali zanimljivu mogućnost mijenjanja oksidativnog stresa i upalnih procesa. Zahvaljujući sposobnosti tih spojeva da stupaju u interakciju s NrF2 putem, razvijene su nove studije za procjenu novih molekula sintetiziranih prema strukturi izotiocijanata s ciljem pronalaženja lijekova koji će učinkovito spriječiti razvoj neurodegenerativnih procesa (24).

Na temelju navedenih rezultata, vidljivo je da izotiocijanati imaju veliki potencijal za liječenje različitih bolesti, a posebno su važna njihova kemoprotektivna i antitumorska svojstva, koja smo u našem *in vitro* ispitivanju pokazali na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura i

glioblastoma. Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica tj. citotoksični učinak ovisi o njihovoj koncentraciji i vremenu izlaganja, te je glavna hipoteza potvrđena i ostvaren je cilj istraživanja. Potrebne su još dodatne *in vivo* studije, koje će utvrditi njihove pozitivne učinke, kako bi se ovi spojevi ili lijekovi temeljeni na njihovoj strukturi, mogli uvrstiti u terapiju različitih bolesti.

6. ZAKLJUČAK

1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i glioblastoma (A1235) izotiocijanatima izoliranim iz biljne porodice kupusnjača (*Brasicaceae*) dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.

2) Ispitivani izotiocijanati pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji.

3) Djelovanje izotiocijanata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica.

4) Citotoksični učinak izotiocijanata, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma mokraćnog mjehura i glioblastoma kod životinja.

7. LITERATURA

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

2. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes.

3. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.

4. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.1, Tumor Cells and the Onset of Cancer.

5. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. Available from:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/

6. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Tumori mokraćnog sustava. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 146-149.

7. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Tumori središnjeg živčanog sustava. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 105.-108.

8. https://bib.irb.hr/datoteka/410795.TUMORI_SREDISNJEG_ZIVCANOG_SISTEMA.doc Datum pristupa: 2.3.2017.

9. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Tumori središnjeg živčanog sustava. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 108.-111.

10. The Editors of Encyclopædia Britannica. Brassicaceae. Encyclopædia Britannica. July 17, 2015. URL:https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae. Datum pristupa**:** 30.11.2016.

11. http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:279435-1 Datum pristupa: 13.3.2017.

12. http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates Datum pristupa: 10.4.2017.

13. http://emedicine.medscape.com/article/438262-overview#a8 Datum pristupa: 27.3.2017.

14. http://emedicine.medscape.com/article/283252-overview#a8 Datum pristupa: 27.3.2017.

15. M ZK. Fitoterapija. predavanja prezentirana na Medicinskom fakultetu u Splitu ed.; 2014.

16. Mikić, A. (2016.) Citotoksični učinak chelidonium majus, alchemilla vulgaris i polygonum aviculare na različite stanične linije humanih karcinoma. Diplomski rad. Split. Medicinski fakultet u Splitu.

17. Khan MA, Ali R, Parveen R, Najmi AK, Ahmad S. Pharmacological evidences for cytotoxic and antitumor properties of Boswellic acids from Boswellia serrata. J Ethnopharmacol. 2016 Sep 15;191:315-23. doi: 10.1016/j.jep.2016.06.053. Epub 2016 Jun 21.

18. Xiang W, Qing-hua Z and Ke X. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? *Acta Pharmacologica Sinica* (2009) 30: 501–512; doi: 10.1038/aps.2009.50

19. Liu Z, Li X, Simoneau AR, Jafari M, Zi X. Rhodiola rosea extracts and salidroside decrease the growth of bladder cancer cell lines via inhibition of the mTOR pathway and induction of autophagy. Mol Carcinog. 2012;51(3):257-67.

20. Sun M, Zhao W, Xie Q, Zhan Y, Wu B. Lentinan reduces tumor progression by enhancing gemcitabine chemotherapy in urothelial bladder cancer. Surg Oncol. 2015 Mar;24(1):28-34. doi: 10.1016/j.suronc.2014.11.002. Epub 2014 Nov 20.

21. Parolaro D, Massi P. Cannabinoids as potential new therapy for the treatment of gliomas. Expert Rev Neurother. 2008 Jan;8(1):37-49.

22. Shang, H.-S., Shih, Y.-L., Lu, T.-J., Lee, C.-H., Hsueh, S.-C., Chou, Y.-C., Lu, H.-F., Liao, N.-C. and Chung, J.-G. (2016), Benzyl isothiocyanate (BITC) induces apoptosis of GBM 8401 human brain glioblastoma multiforms cells via activation of caspase-8/Bid and the reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway. Environ. Toxicol., 31: 1751–1760. doi:10.1002/tox.22177

23. Shan Y, Zhang L, Bao Y, Li B, He C, Gao M, Feng X, Xu W, Zhang X, Wang S. Epithelial-mesenchymal transition, a novel target of sulforaphane via COX-2/MMP2, 9/Snail, ZEB1 and miR-200c/ZEB1 pathways in human bladder cancer cells. J Nutr Biochem. 2013 Jun;24(6):1062-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.08.004. Epub 2012 Nov 13.

24. Sita G, Hrelia P ,Tarozzi A, Morroni F. Isothiocyanates Are Promising Compounds against Oxidative Stress, Neuroinflammation and Cell Death that May Benefit Neurodegeneration in Parkinson's Disease. International Journal of Molecular Sciences. Received: 29 July 2016; Accepted: 29 August 2016; Published: 1 September 2016.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj je istraživanja ispitati potencijalno citotoksično djelovanje izotiocijanata, spojeva izoliranih iz biljaka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae)* na humane karcinomske stanice mokraćnog mjehura (T24) i glioblastoma (A1235). Pretpostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih stanica izotiocijanatima njihov broj smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

Materijali i metode:

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

Rezultati:

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

Kod stanica karcinoma mokraćnog mjehurasvi izotiocijanati ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama od 0,5 ili 5mM, pri različitim vremenima inkubacije.Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica ima izopropil izotiocijanat pri koncentraciji od 5mM nakon 72h inkubacije.

Kod stanica glioblastoma većina izotiocijanata najjači citotoksični učinak ima pri većoj koncentraciji od 20μM (osim fenil-izotiocijanata). Najznačajniji učinak na smanjenje broja metabolički aktivnih stanica ima benzil izotiocijanat pri koncentraciji od 20μM nakon 24h inkubacije.

Zaključci:

In vitro izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24) i glioblastoma (A1235) izotiocijanatima dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak ovisan je o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje izotiocijanata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak izotiocijanata, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma mokraćnog mjehura i glioblastoma kod životinja.

9. SUMMARY

The aim of the research

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of isothiocyanates, a chemical substance isolated from the Brassicaceae family of plants on human carcinoma cells of urinary bladder (T24) and glioblastoma (A1235). The assumption is that after the exposure of carcinoma cells to isothiocyanates their number will be reduced in comparison to the control group.

Materials and methods

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

Results

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

In urinary bladder carcinoma cells all isothiocyanates show better effects in higher concentrations of 0.5 or 5 mM, with different incubation times. The most prominent effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by isopropyl isothiocyanate with the concentration of 5 mM after 72-hour incubation time.

In glioblastoma cells most isothiocyanates have the strongest effect in higher concentrations of 20μM (except for phenyl-isothiocyanate). The most significant effect on the reduction of metabolically active cells is shown by benzyl isothiocyanate with the concentration of 20 μM after 24-hour incubation time.

Conclusions

In vitro exposure of urinary bladder carcinoma cells (T24) and glioblastoma (A1235) to isothiocyanates leads to reduced cell survival rate. Cytotoxic effects depend on incubation time and concentration. Isothiocyanates effect is not always proportional to the increase in concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurs. The cytotoxic effect of isothiocyanates is confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next

step is the confirmation of these effects by *in vivo* studies on the models of animal urinary bladder and glioblastoma cancers.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Mirna Župić

Datum rođenja: 24.9.1993.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Andrije Kačića Miošića 12

e-mail: mirnazupic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- **2000. - 2008**. Osnovna škola "Marko Marulić", Sinj, Republika Hrvastska
- **2008. - 2012**. Opća gimnazija "Dinko Šimunović", Sinj, Republika Hrvatska
- **2012. - 2017**. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

RADNO ISKUSTVO:

III. 2017. – IX. 2017. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Sinj

CPSA Split (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski jezik

Vozačka dozvola: B kategorija