Citotoksično djelovanje polisulfida iz porodice lukova (Allium spp.) na različite linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

Polunić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:066676

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI

I

MEDICINSKI FAKULTET

Ana Polunić

CITOTOKSIČNO DJELOVANJE POLISULFIDA IZ PORODICE LUKOVA (ALLIUM SPP.) NA RAZLIČITE LINIJE HUMANIH KARCINOMA MJERENO MTT METODOM

Diplomski rad

Akademska godina:

2017./2018.

Mentor:

Izv. prof. dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, 2018.

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	je prihvaćena na 1. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 1. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 1. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor:	izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
Pomoć pri izradi:	izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Citotoksično djelovanje polisulfida iz porodice lukova (*Allium spp*.) na različite linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

Ana Polunić, broj indeksa 71

Sažetak:

Cilj istraživanja je bio ispitati citotoksični učinak određenih polisulfida iz porodice *Allium spp.* na dvije stanične linije humanih karcinoma: UM-UC-3 i LN229. Korišteni su destilat i ekstrakt iz *Allium sativum*, destilat iz *Allium commutatum*, dialil disulfid, dipropil disulfid i dipropil trisulfid. Obe stanične linije tretirane su koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama polisulfida te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj nam je citotoksične aktivnosti korištenih polisulfida. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica stanične linije UM-UC-3 imaju dialil disulfid i dipropil trisulfid pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju LN229 pokazali su dialil disulfid i dipropil trisulfid pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Ispitivani polisulfidi pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje polisulfida nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak polisulfida, 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: 60 stranica, 27 slika, 7 tablica, 21 referenca
Jezik izvornika: hrvatski
Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc.dr.sc. Ivana Mudnić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Maja Valić, član
3. Izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 9.3.2018.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine

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

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	Medical Chemistry and Biochemistry
Thesis subject:	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 1 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 1 and Faculty Council of School of Medicine, session no.1
Mentor:	Assoc. prof. Vedrana ČikešČulić, PhD
Technical assistence:	Assoc. prof. Vedrana ČikešČulić

The cytotoxic effect of the *Allium* family polysulfides on human cancer cell lines measured by the MTT assay

Ana Polunić, index number 71

Summary:

The aim of this research was to examine cytotoxic effects of certain polysulfides from the *Allium* family of plants on two cell lines of human carcinomas, UM-UC-3 and LN229. We used *Allium sativum* distillate and extract, *Allium commutatum* distillate and polysulfides diallyl disulfide, dipropyl disulfide and dipropyl trisulfide. Both cell lines were treated with concentrations of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Cytotoxicity was established after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours, using the MTT assay. The ratio of absorbances of cells treated with polysulfides in aqueous solutions and the ones not treated showed the cytotoxic activity of used polysulfides. The most prominent effect on the reduction of metabolically active cells in cell line UM-UC-3 was achieved by diallyl disulfide and dipropyl trisulfide at the concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time. In cell line LN229 the most significant effect on the reduction of metabolically active cells was achieved by diallyl disulfide and dipropyl trisulfide at the concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time. Polysulfides tested showed cytotoxic effects dependent on incubation time and concentration. The effectiveness of polysulfides was not always correspondent to the increase of concentration and incubation time and in some cases cell recovery occured. The cytotoxic effect of polysulfides 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: 60 pages, 27 figures, 7 tables, 21 references
Original in: Croatian
Defence committee:
1. Ivana Mudnić, PhD, assist. prof., chair person
2. Maja Valić, PhD, full prof, member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member - supervisor

Defence date: March 9th, 2018

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

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Rak 2

1.1.1. Onkogeni i tumor supresorski geni 2

1.2. Karcinom mokraćnog mjehura 4

1.2.1. Epidemiologija i etiologija 4

1.2.2. Patohistologija 4

1.2.3. Simptomi i dijagnostika 5

1.2.4. Klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura 6

1.2.5. Liječenje 10

1.3. Glioblastom 11

1.3.1. Epidemiologija i etiologija 11

1.3.2. Simptomi i dijagnostika 12

1.3.3. Klasifikacija tumora središnjeg živčanog sustava 14

1.3.4. Liječenje 14

1.4. *Allium spp.* 15

1.4.1. *Allium sativum* (češnjak) 17

1.5. Polisulfidi 19

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 22

3. MATERIJALI I METODE 24

3.1. Stanične linije 25

3.2. Postupak 26

3.3. Test citotoksične aktivnosti 27

4. REZULTATI 28

4.1. Karcinom mokraćnog mjehura - stanična linija UM-UC-3 29

4.1.1. *Allium sativum* destilat 29

4.1.2. *Allium sativum* ekstrakt 30

4.1.3. Dialil disulfid 31

4.1.4. *Allium commutatum* destilat 32

4.1.5. Dipropil disulfid 33

4.1.6. Dipropil trisulfid 34

4.2. Glioblastom – stanična linija LN229 35

4.2.1. *Allium sativum* destilat 35

4.2.2. *Allium sativum* ekstrakt 36

4.2.3. Dialil disulfid 37

4.2.4. *Allium commutatum* destilat 38

4.2.5. Dipropil disulfid 39
4.2.6. Dipropil trisulfid 40
5. RASPRAVA 41
6. ZAKLJUČAK 51
7. LITERATURA 53
8. SAŽETAK 56
9. SUMMARY 58
10. ŽIVOTOPIS 60

1. UVOD

1.1. RAK

Rak je skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici, te posljedično, i po načinu liječenja. Svim vrstama raka zajedničko je da nastaju od zdravih stanica organizma procesom koji se zove zloćudna pretvorba. Zbog određenih promjena stanica gubi sposobnost adekvatnog odgovaranja na brojne signale kojima se njezino ponašanje stalno usklađuje s „potrebama“ organizma, što rezultira nekontroliranom diobom zloćudno preobražene stanice. Nakupina takvih stanica naziva se rak. Promjena koja je odgovorna za zloćudnu pretvorbu stanica je genska mutacija. Tako se može reći da je rak u osnovi genska bolest. Rak se klinički najčešće očituje kao nakupina velikog broja zloćudno preobraženih stanica čiji se broj zbog nekontrolirane stanične diobe progresivno povećava. Međutim, različiti dokazi upućuju na to da je rak monoklonskog podrijetla, što znači da nastaje zloćudnom transformacijom samo jedne zdrave stanice. Sam je proces nastanka raka od zdravih stanica složen, dugotrajan i odigrava se u više koraka. Proces kojim iz zdravog tkiva u više koraka nastaje rak, naziva se tumorska progresija (1).

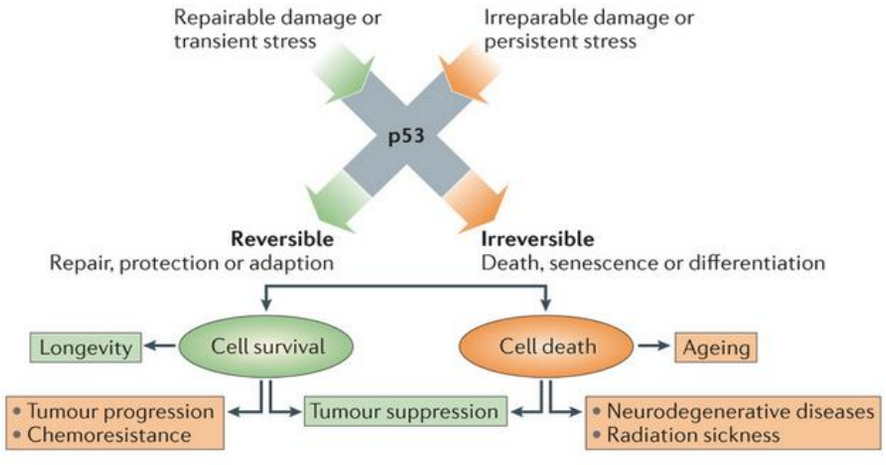
Rak je značajan javnozdravstveni problem stanovništva Hrvatske. Drugi je najvažniji uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila. Incidenciju raka u Hrvatskoj prati i proučava Registar za rak Republike Hrvatske, populacijski registar pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo (2).

1.1.1. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI

Onkogeni su prvi geni za koje se pokazalo da imaju središnju ulogu u nastanku raka. Oni su promijenjena inačica normalnih staničnih gena koje nazivamo proto-onkogenima i koji sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije. Proto-onkogeni su uključeni u prijenos signala u stanici i svi su evolucijski dobro očuvani, što upućuje na njihovu ulogu u bitnim staničnim procesima. Putevi prijenosa signala u stanici način su na koji se stanični rast, dioba, diferencijacija i preživljenje usklađuju s uvjetima u okolišu stanice. Signali koje stanica prima iz okoliša često su oblik malih molekula, čimbenika rasta, koje se najčešće vezuju za receptore na staničnoj membrani. Time ih aktiviraju, što dovodi do prijenosa signala putem brojnih drugih molekula u stanici sve do transkripcijskih čimbenika koji potiču ekspresiju određenih gena. Ako se proto-onkogeni promijene tako da sami ili njihovi proteinski produkti postanu aktivniji, tada nastaju onkogeni. Taj proces nazivamo aktivacijom onkogena. Posljedica aktivacije onkogena jest nekontrolirani rast i dioba stanice, što uzrokuje nastanak raka. Do aktivacije onkogena može doći na nekoliko načina. Proteinski produkti onkogena nazivaju se onkoproteinima. Onkogen se može aktivirati zbog mutacija u samom genu, kao posljedica genske

amplifikacije (povećanja broja kopija gena), kao posljedica kromosomske translokacije (dio kromosoma se „odlomi“ i premjesti na drugi kromosom). Kod glioblastoma je nađena specifična mutacije EGFR (ERBB1) onkogena koja rezultira ekspresijom receptora kojemu nedostaje dio na koji se veže čimbenik rasta, tako da je receptor aktivan i šalje signale koji potiču stanični rast i diobu i onda kad na njega nije vezan čimbenik rasta (1).

Za razliku od onkogena čija pojačana aktivnost dovodi do nastanka raka, tumorsupresorski geni su geni čiji gubitak ili inaktivacija njih samih, odnosno njihovih proteinskih produkata dovodi do nastanka raka. Različiti tumorsupresorski geni imaju različite funkcije u stanici. Posebno važan tumorsupresorski gen je P53. Taj gen je često mutiran u različitim tipovima raka u ljudi. Proteinski produkt gena P53, transkripcijski čimbenik p53, aktivira se zbog oštećenja stanične DNA ili drugih poremećaja povezanih sa staničnim stresom. Aktivirani p53 ima dva osnovna načina djelovanja: zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA te potiče apoptozu. Oštećenje stanične DNA znatno povećava mogućnost da se stanica pretvori u stanicu raka. Zaustavljajući prolazak stanice kroz stanični ciklus, p53 omogućuje da se oštećenja stanične DNA poprave prije nego se oštećena DNA replicira. Ako se ta oštećenja ne uspiju popraviti, djelovanjem proteina p53, stanica ulazi u apoptozu i umire. Na taj se način „žrtvuje“ ta stanica kako bi se spriječio mogući razvoj raka. Ako gen P53 nedostaje u stanici ili je inaktiviran, tada u diobu ulaze i stanice s oštećenom DNA, čime se povećava vjerojatnost nastanka raka. Inaktivacija p53 u stanicama raka povezana je i s tumorskom angiogenezom te rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju. Stoga je za nastanak raka potrebno narušiti mehanizam apoptoze, do čega dolazi zbog mutacija u genu P53 ili zbog mutacija u drugim onkogenima, odnosno tumorsupresorskim genima u stanicama raka (1).



Slika 1. Funkcije proteina p53

Preuzeto s: https://drjockers.com/the-p53-gene-and-cancer-development/

1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom mjehura je 9. najčešći oblik maligniteta i 13. najčešći uzrok smrti od raka širom svijeta (3). Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura iznosi 15/100.000. U Republici Hrvatskoj je 2008. godine zabilježeno 835 slučajeva. Prosječna dob bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura iznosi 65 godina (4).

Klinički je karakteriziran progresijom, ponavljanjem, metastazama i rezistencijom na lijek. Značajno, zbog životnog zahtjeva za praćenjem recidiva tumora, tipični trošak liječenja karcinoma mokraćnog mjehura od dijagnoze do smrtnosti je najviši među svim vrstama raka. Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura je 3-4 puta veća kod muškaraca nego kod žena (5).

Dokazani čimbenici rizika za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura su pušenje, izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, određenim lijekovima (ciklofosfamid, fenacetin), kamenci, kronična upala te shistosomijaza (povezana je s rakom pločastih stanica) (4).

1.2.2. PATOHISTOLOGIJA

Postoje tri vrste karcinoma mokraćnog mjehura koji počinju u stanicama u podlozi mokraćnog mjehura. Ovi se karcinomi nazivaju po vrstama stanica koje postaju maligne.

Karcinom prijelaznog epitela (urotelni karcinom): karcinom koji počinje u stanicama u najdubljim slojevima tkiva mokraćnog mjehura. Te se stanice mogu rastezati kada je mjehur pun i skupljati kada se isprazni. Većina karcinoma mokraćnog mjehura počinje u stanicama prijelaznog epitela. Karcinom prijelaznog epitela može biti niskog ili visokog stupnja:

Karcinom prijelaznog epitela niskog stupnja često se vraća nakon liječenja, ali se rijetko širi u mišićni sloj mokraćnog mjehura ili na druge dijelove tijela.

Karcinom prijelaznog epitela visokog stupnja često se javlja nakon liječenja i često se širi u mišićni sloj mokraćnog mjehura, na druge dijelove tijela i na limfne čvorove. Gotovo sve smrti od karcinoma mokraćnog mjehura su visokog stupnja bolesti.

Karcinom pločastih stanica: karcinom koji počinje u pločastim stanicama, koje su tanke, ravne stanice koje mogu nastati u mjehuru nakon dugotrajne infekcije ili iritacije.

Adenokarcinom: karcinom koji počinje u žljezdanim (sekretornim) stanicama koje se nalaze u podlozi mokraćnog mjehura. Ovo je vrlo rijetka vrsta karcinoma mokraćnog mjehura.

Karcinom koji se nalazi u podlozi mjehura zove se površinski karcinom mokraćnog mjehura. Karcinom koji se proširio kroz podlogu mjehura i napada mišićni zid mjehura ili se proširio na obližnje organe i limfne čvorove zove se invazivni karcinom mokraćnog mjehura (6).

1.2.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

U 90% bolesnika karcinom mokraćnog mjehura očituje se bezbolnom hematurijom (krv u urinu), mikroskopskom ili makroskopskom. Također pojavljuje se učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili rjeđe, simptoma urinarne infekcije. Znakovi lokalnog širenja tumora su 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 (4).

Testovi koji ispituju urin i mjehur, te služe za otkrivanje i dijagnosticiranje karcinoma mokraćnog mjehura:

a) Fizikalni pregled i anamneza: pregled tijela kako bi se provjerili opći znakovi zdravlja, uključujući provjeru znakova bolesti, kao što su izrasline ili bilo što drugo što se čini neobičnim. Također i anamneza pacijentovih zdravstvenih navika i prošlih bolesti i tretmana.

b) Analiza urina: ispitivanje boje urina i njegovog sadržaja, kao što su šećer, proteini, crvene krvne stanice i bijele krvne stanice.

c) Citologija urina: laboratorijski test u kojem se uzorak urina provjerava pod mikroskopom na abnormalne stanice.

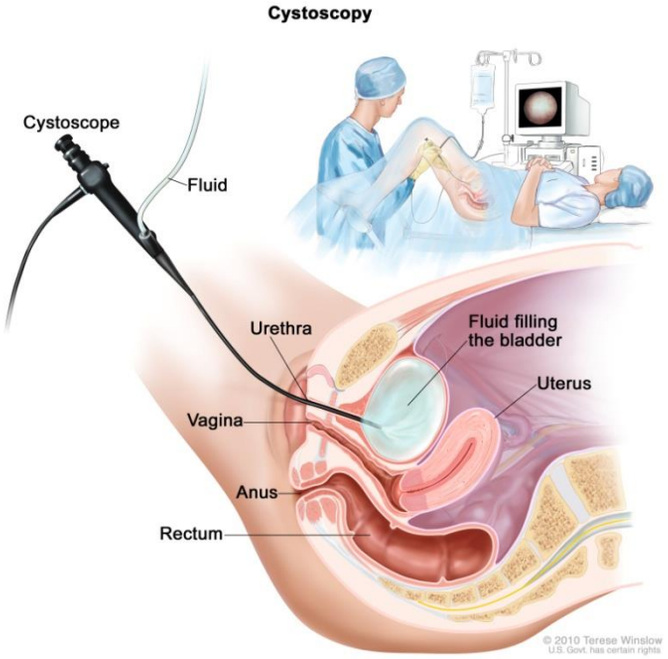
d) Cistoskopija: postupak gledanja unutar mokraćnog mjehura i uretre radi provjere abnormalnih područja. Cistoskop se umetne kroz mokraćnu cijev u mjehur. Cistoskop je tanak, cijevni instrument sa svjetlom i objektivom za gledanje. Može također imati alat za uklanjanje uzoraka tkiva, koji se zatim provjeravaju pod mikroskopom na znakove karcinoma (Slika 2.)

e) Intravenska pijelografija (IVP): pomoću x-zraka i kontrastnog sredstva koje se ubrizgava u venu, dobija se slika bubrega, mokraćne cijevi i mokraćnog mjehura kako bi se utvrdilo je li karcinom prisutan u tim organima

f) Biopsija: Uklanjanje stanica ili tkiva kako bi ih patolog pregledao pod mikroskopom kako bi provjerio znakove karcinoma. Biopsija za karcinom mokraćnog mjehura obično se obavlja tijekom cistoskopije.

Nakon što je dijagnosticiran karcinom mokraćnog mjehura, provode se testovi kako bi se ustanovilo jesu li se stanice karcinoma proširile unutar mjehura ili na druge dijelove tijela (6).

Za procjenu proširenosti bolesti služi MSCT ili MR trbuha i male zdjelice te RTG-prikaz pluća. U slučaju povišene vrijednosti alkalne fosfataze ili prisutnih simptoma uz koštani sustav, potrebno je učiniti scintigrafiju kostiju (4).



Slika 2. Cistoskopija

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__98

1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Zbog odgovarajućeg izbora terapije te prognoze bolesnika potrebna je što točnija procjena proširenosti bolesti. Procjenu proširenosti bolesti najčešće izražavamo TNM- klasifikacijom Američkog združenog odbora za rak (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*) (Tablica 1.) (4).

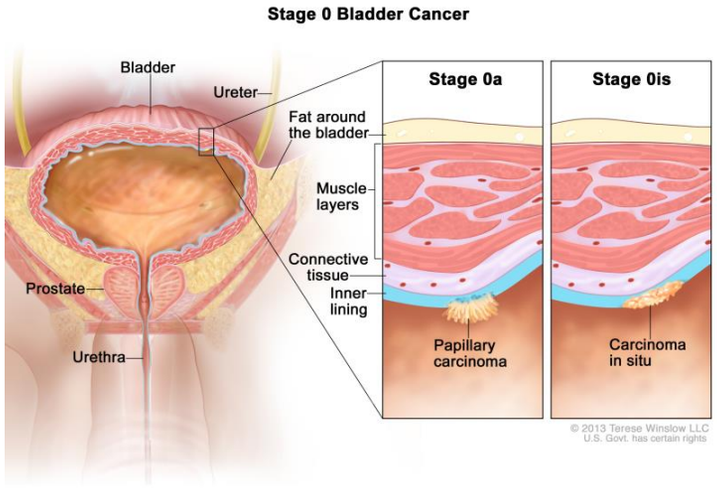
Tablica 1. TNM-klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html

Stadij	**Grupa**	**Opis stadija**
0a	**Ta** **N0**	Neinvazivni papilarni karcinom (Ta). Narastao je prema šupljem središtu mokraćnog mjehura, ali nije narastao u vezivno tkivo ili mišiće zida mokraćnog mjehura.

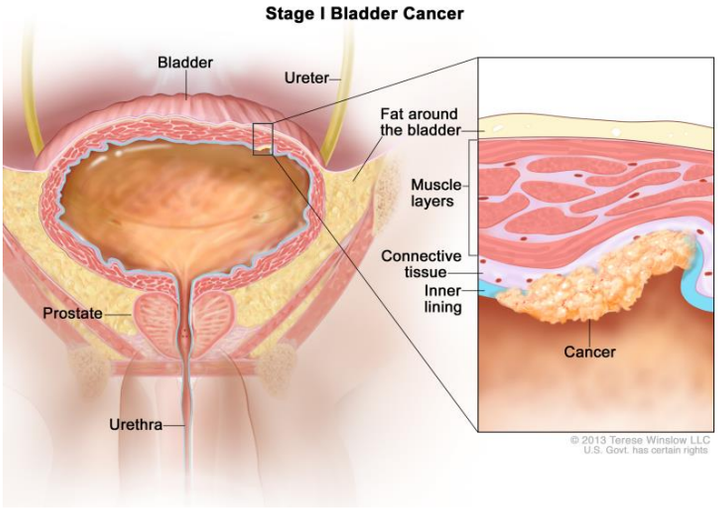
	M0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili udaljena mjesta (M0).
0is	**Tis** **N0** **M0**	Neinvazivni karcinom (Tis), također poznat kao karcinom *in situ* (CIS). Karcinom raste samo u unutarnjem sloju mokraćnog mjehura. Nije narastao prema unutra, prema šupljem dijelu mjehura, niti je napao vezivno tkivo ili mišiće zidova mjehura. Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili udaljena mjesta (M0).
I	**T1** **N0** **M0**	Karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura, ali nije dosegao sloj mišića u zidu mjehura (T1). Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
II	**T2a ili T2b** **N0** **M0**	Karcinom je narastao u unutarnji (T2a) ili vanjski (T2b) mišićni sloj zida mjehura, ali nije prošao kroz mišiće do sloja masnog tkiva koji okružuje mjehur. Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
IIIA	**T3a, T3b ili T4a** **N0** **M0**	Karcinom je narastao kroz mišićni sloj mokraćnog mjehura i u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur (T3a ili T3b). Možda se proširio u prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a). Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
	ILI	
	T1-4a **N1** **M0**	• karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura (T1), ili • u mišićni sloj zida mokraćnog mjehura (T2), ili • u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur, (T3a ili T3b) ili • se možda proširio na prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a)

		i karcinom se proširio na obližnji limfni čvor u zdjelici (N1). Karcinom se nije proširio na udaljena mjesta (M0).
IIIB	**T1-T4a** **N2 or N3** **M0**	• karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura (T1), ili • u mišićni sloj zida mokraćnog mjehura (T2), ili • u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur, (T3a ili T3b) ili • se možda proširio na prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne raste u zdjelici ili trbušnom zidu (T4a) i karcinom se proširio na 2 ili više limfnih čvorova u zdjelici (N2) ili u limfne čvorove duž zajedničke ilijačne arterije (N3). Karcinom se nije proširio na udaljena mjesta (M0).
IVA	**T4b** **N0** **M0**	Karcinom je izrastao kroz zid mokraćnog mjehura u zdjelicu zdjelice ili trbušne zidove (T4b). Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (NE) ili na udaljena mjesta (M0).
	ILI	
	Bilo koji T **Bilo koji N** **M1a**	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T). Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N). Proširio se na udaljeni skup limfnih čvorova (M1a).
IVB	**Bilo koji T** **Bilo koji N** **M1b**	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T). Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N). Proširio se na 1 ili više udaljenih organa (kosti, jetra ili pluća) (M1b).



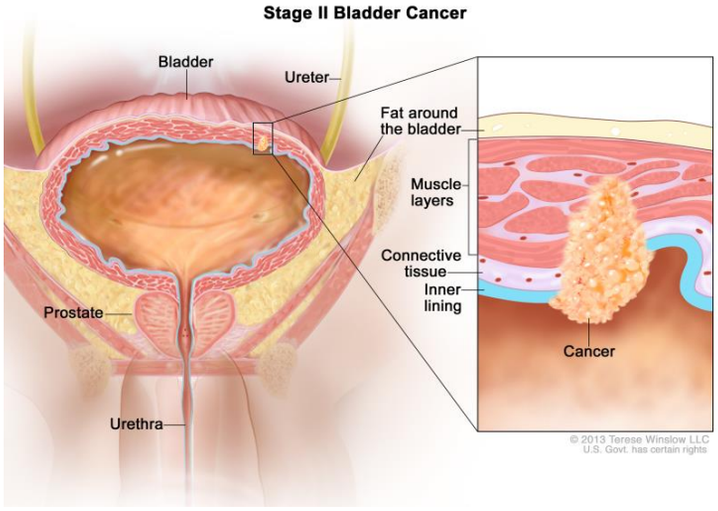
Slika 3. Stadij 0 karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116



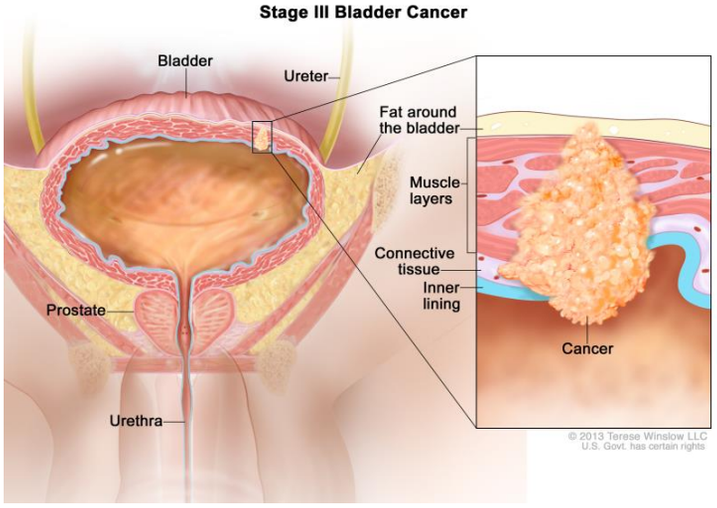
Slika 4. Stadij I karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116



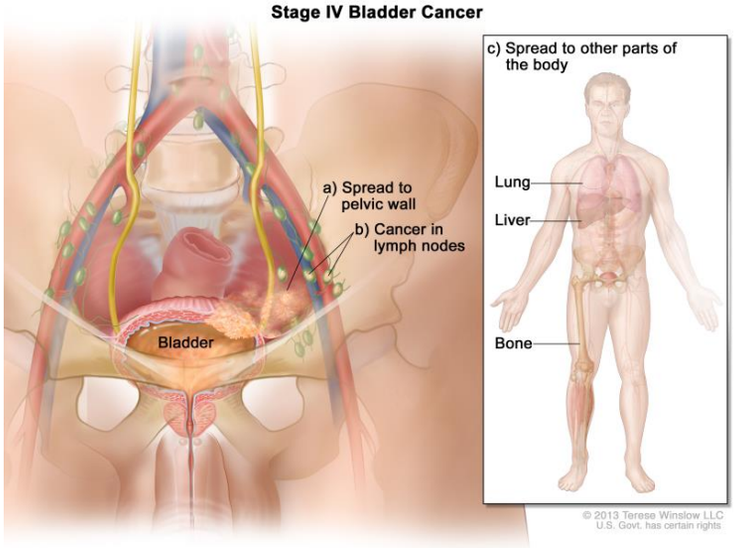
Slika 5. Stadij II karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116



Slika 6. Stadij III karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116



Slika 7. Stadij IV karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116

1.2.5. LIJEČENJE

Liječenje karcinoma prijelaznog epitela se temelji na stupnju proširenosti bolesti. Stoga se razlikuje pristup neinvazivnom i invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti. Primarni oblik liječenja površinskog raka mokraćnog mjehura je transuretralna endoskopska resekcija (TUR). S obzirom na visoku stopu lokalnog povratka bolesti, nakon resekcija, 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. Nakon aplikacije citostatika bolesnik ne mokri jedan sat te hoda, kako bi se zadržao kontakt lijeka s endotelom. Intravezikalna imunoterapija i kemoterapija produljuju preživljenje bez znakova bolesti te smanjuju broj recidiva (4).

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. Metastatska se bolest liječi kemoterapijom. Danas je standardna prvolinijska kemoterapija kombinacija gemcitabina i cisplatina (GC protokol) (4).

1.3. GLIOBLASTOM

Sve novotvorine središnjeg živčanog sustava su zloćudne po lokalizaciji, bez obzira na svoj zloćudni potencijal, jer bilo koji ekspanzivni proces unutar koštanog oklopa u kojem je smješten središnji živčani sustav može uzrokovati pojedinačni neurološki ispad, kvantitativni poremećaj svijesti ili pak smrt. Primarni tumori središnjeg živčanog sustava specifični su i po tome što najčešće nesmetano infiltriraju okolni moždani parenhim bez stvaranja vezivne čahure, ne metastaziraju limfogeno, a presađivanje krvlju u udaljene organe vrlo je rijetko (obično pluća i kosti). Najčešći tumori mozga zapravo su presadnice iz drugih, primarnih žarišta, koje se pojavljuju oko 10 puta češće nego primarni tumori (7).

1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Gliom je opći pojam koji se koristi za opisivanje primarnih tumora mozga i klasificira se prema pretpostavljenoj stanici podrijetla. To uključuje astrocitne tumore (astrocitom, anaplastični astrocitom i glioblastom), oligodendroglioma, ependimomi i miješani gliomi. Oni su najčešći tumori središnjeg živčanog sustava (CNS), koji čine gotovo 80% svih malignih primarnih tumora mozga. Glioblastom je glavni i najčešći oblik primarnog astrocitoma. On čini više od 60% svih

tumora mozga kod odraslih. Unatoč raznolikosti suvremenih terapija protiv glioblastoma, on je i dalje smrtonosna bolest s iznimno lošom prognozom. Pacijenti obično imaju prosječno preživljenje od oko 14 do 15 mjeseci od dijagnoze (8).

Iako je glioblastom rijedak tumor s globalnom incidencijom manjom od 10 na 100.000 ljudi, njegova slaba prognoza sa stopom preživljenja od 14 do 15 mjeseci nakon dijagnoze, čini ključan javno zdravstveni problem. To čini 50% svih glioma u svim dobnim skupinama. Može se pojaviti u bilo kojoj dobi, ali najveća incidencija je između 55 i 60 godina. Maligni gliomi su razlog za 2,5% smrti zbog raka i treći su glavni uzrok smrti od raka kod osoba od 15 do 34 godine. Incidencije glioblastoma veća je u muškaraca u usporedbi sa ženama (8).

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. Izloženost derivatima nitrozoureje, pušenje i uzimanje nekih lijekova tijekom trudnoće može dovesti do pojave tumora mozga u djece, dok inhibitori nitrozoureje u prehrani (vitamini C i E) mogu smanjiti rizik za nastanak tumora mozga. 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 (7).

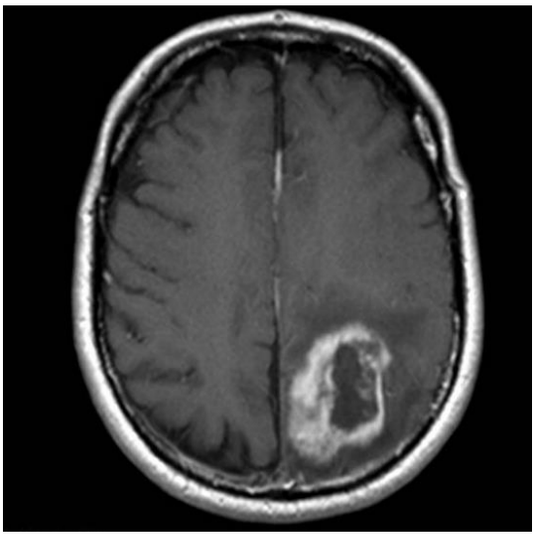
1.3.2. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

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 (7).

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).

Tehnike vizualnog prikazivanja koje se provode na pojedince za koje se sumnja da imaju tumore mozga uključuju invazivne postupke poput angiografije katetera i neinvazivnih testova kao što su računalna tomografija (CT) i skeniranje magnetske rezonancije (MRI) koje se

rutinski koriste u svrhu vizualizacije tumora. Često se savjetuje CT skeniranje kada pacijent ne može proći MR skeniranje zbog nekih razloga, na primjer, kod bolesnika s pacemakerima. Tehnika zlatne standardne slike koja se koristi je MR skeniranje, zbog njihovog nadmoćnog kontrasta mekog tkiva, koji omogućuje bolju vizualizaciju složenosti i heterogenosti tumorske lezije nego CT (8).



Slika 8. MR glioblastoma

Preuzeto s: https://radiopaedia.org/cases/glioblastoma-nos-3



Slika 9. CT glioblastoma

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

1.3.3. KLASIFIKACIJA TUMORA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

Trenutna međunarodna norma za nomenklaturu i dijagnozu glioma je WHO (Svjetska zdravstvena organizacija) klasifikacija. Razlikuje gliome u razred I do IV na temelju razine malignosti koja je određena histopatološkim kriterijima. Razred I gliomi se odnose na lezije koje imaju nizak proliferacijski potencijal i mogu se izliječiti kirurškim zahvatom, dok su razredi II do IV vrlo maligni i invazivni gliomi. Glioblastom je najagresivnija, invazivna i nediferencirana vrsta tumora te je proglašen razredom IV od strane svjetske zdravstvene organizacije (9).

Tablica 2. Klasifikacija tumora SŽS-a prema WHO

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430738/

WHO 2007 classification for diffuse gliomas

Type	Grade	Description	Median survival (years)
Astrocytoma	II	Found diffusely infiltrating into surrounding neural tissue; increased hypercellularity, no mitosis	6-8
Oligodendroglioma	II	Occur in the white matter and cortex of the cerebral hemispheres, low mitotic activity, no necrosis	12
Oligoastrocytoma	II	Diffuse mixed tumor with mixed glial background	3 to >10
Anaplastic-astrocytoma/oligodendroglioma	III	Highly infiltrating tumors with increased mitotic activity; no necrosis or vascular proliferation	3
Glioblastoma	IV	Infiltrating glial neoplasm with necrosis and micro-vascular proliferation; high rate of mitosis	1 to 2

WHO, World Health Organization.

1.3.4. LIJEČENJE

Liječenje tumora mozga uključuje sva tri osnovna modaliteta onkološkog liječenja-kirurški zahvat, radioterapiju i kemoterapiju, te adekvatno potporno liječenje (7).

a) Potporno liječenje

Gotovo svi tumori mozga izazivaju edem okolnog moždanog parenhima, izazivajući tako žarišne simptome i porast intrakranijalnog tlaka. Kortikosteroidi (najčešće deksametazon) lijekovi su izbora za smanjivanje moždanog edema, a najčešće se rabe prije i nakon kirurškog zahvata te u ranim fazama provođenja radioterapije. Budući da infiltracija moždanog parenhima tumorom uzrokuje paroksizmalna izbijanja neuronske električne aktivnosti i time stvara

predispoziciju nastanku sekundarnih epileptičnih napadaja, često je u terapiju potrebno uključiti antikonvulzive (7).

b) Kirurško liječenje

Kirurški se zahvati poduzimaju s palijativnom i kurativnom nakanom. 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. Često je moguće napraviti samo redukciju primarnog tumora, što, po pravilu, produljuje preživljenje ovakvih bolesnika. Katkad su, ovisno o histološkom tipu tumora i njegovoj poziciji, mogući kurativni kirurški zahvati, uklanjanje tumora u cijelosti. Poželjno je 24-72 sata nakon kirurškog zahvata napraviti MR mozga radi procjene veličine ostatne bolesti (7).

c) Radioterapija

Indicirana je u većine bolesnika s primarnim tumorima SŽS-a, najčešće nakon kirurškog zahvata, a u inoperabilnih bolesnika provodi se primarna radioterapija. Da bi se osigurao adekvatan oporavak bolesnika, s radioterapijom se najčešće počinje 3-4 tjedna nakon kirurškog zahvata (7).

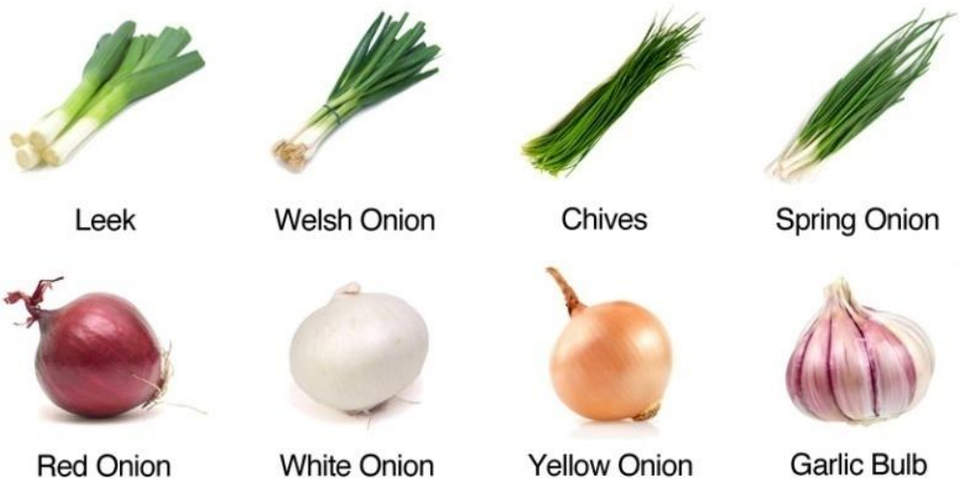
d) Kemoterapija

U bolesnika sa slabo diferenciranim tumorima, ordiniranje kemoterapije, obično nakon kirurškoga zahvata i radioterapije, produljuje preživljenje. U posljednje vrijeme s uspjehom se primjenjuje konkomitantna radiokemoterapija (temozolomidom). Preduvjet učinkovitosti citostatika jest njihov prodor kroz krvno-moždanu barijeru (mala molekularna masa, topljivost u lipidima). Sam tumor, kao i radioterapija, mogu oštetiti krvno-moždanu barijeru i olakšati prodor citostatika u mozak. Najviše se rabe derivati nitrozoureje, temozolomid, vinkristin i prokarbazin. Kod tumora sa sklonošću širenja uz moždane ovojnice, odnosno subarahnoidalnim prostorom, citostatici se ordiniraju i intratekalno (metotreksat, tiotepa) (7).

1.4. *ALLIUM SPP.*

Allium vrste nalaze se u skoro svim dijelovima svijeta osim tropskim područjima, Novom Zelandu i Australiji. Nekoliko se važnih biljaka koristi kao hrana, uključujući luk (*A. cepa*), češnjak (*A. sativum*), vlasac (*A. schoenoprasum*) i poriluk (*A. porrum*), a neke se uzgajaju kao ukrasne biljke. *Allium* vrste karakteriziraju tanki linearni listovi i cvjetovi sa šest latica. Mnogi rastu iz lukovice ili gomolja, a većinom su trajnice. Cvjetovi često rastu u sferičnim cvjetnim

grozdovima i imaju crne sjemenke u suhim čahurama. Neke biljke se nespolno razmnožavaju iz male lukovice u glavi cvijeta (10).



Slika 10. Vrste luka

Preuzeto s: https://kitchen-garden.be/gardening/growing-onions-and-leeks-in-the-city

Allium vrste, najznačajniji rod Alliaceae obitelji, spadaju među najstarije kultivirano povrće. Korištene su kao ukrasne biljke, začini, povrće ili kao lijekovi za liječenje različitih bolesti. Rod *Allium* uključuje više od 700 vrsta široko rasprostranjenih u cijelom svijetu i cijenjen je zbog svog okusa, jednostavnog rasta i dugog vremena skladištenja. Vrste se mogu razlikovati po obliku i okusu, ali su bliske u biokemijskim i fitokemijskim svojstvima. *Allium* vrste karakterizira njihov bogati sadržaj sumpornih spojeva koji su odgovorni za organoleptičke parametre i doprinose antioksidativnim i antimikrobnim aktivnostima tih vrsta povrća. Ove hlapljive komponente također čine glavni dio eteričnih ulja tih biljaka (11).

Allium povrće sadrži slične količine mnogih hranjivih tvari, osobito makronutrijenata, iako je češnjak bogati izvor mnogih minerala, uključujući selen. Luk, jer se konzumira u većim količinama od ostalog *Allium* povrća, značajan je izvor ugljikohidrata, vlakana, kalija, željeza i vitamina C (Tablica 3.). *Allium* povrće sadrži različite bioaktivne spojeve, uključujući flavonoide, oligosaharide, arginin i selen; međutim, većina zdravstvenih prednosti *Allium* vrsta na koje je i većina studija fokusirana su komponente koje sadrže sumpor (12).

Tablica 3. Hranjive vrijednosti *Allium* povrća

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4366009/

Component	Garlic Amount/100g	Onions Amount/100g	Shallots Amount/100g	Chives Amount/100g	Leeks Amount/100g
Energy, kcal	149	40	72	30	61
Protein, g	6.4	1.1	2.5	3.3	1.5
Total lipid, g	0.5	0.1	0.1	0.7	0.3
Carbohydrate, g	33.1	9.3	16.8	4.4	14.2
Fiber, total dietary, g	2.1	1.7	3.2	2.5	1.8
Sugars, total, g	1.0	4.2	7.9	1.9	3.9
Calcium, mg	181	23	37	92	59
Iron, mg	1.70	0.21	1.20	1.60	2.10
Magnesium, mg	25	10	21	42	28
Phosphorus, mg	153	29	60	58	35
Potassium, mg	401	146	334	296	180
Selenium, mcg	14.2	0.5	1.0	0.9	1.0
Vitamin C, mg	31.2	7.4	8.0	58.1	12.0
Folate, mcg	3	19	34	105	64

1.4.1. *ALLIUM SATIVUM* (ČEŠNJAK)

Carstvo: Plantae

Red: Asparagales

Porodica: Aliaceae

Potporodica: Allioideae

Tribus: Allieae

Rod: *Allium*

Vrsta: *Allium sativum*

Češnjak (*Allium sativum L.*) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice Lukova (Aliaceae). Stabljika naraste 1 metar visine, sadrži nekoliko duguljastih, šupljih listova. Lukovica je sastavljena od mnogo manjih lučica i obavijena tankom bijelom opnom. Iz svake lučice se u narednoj godini razvijaju nove biljke. Cvjetovi su dvospolni, pravilni, maleni, cvatu u lipnju. Cvatovi se nalaze na dugim stapkama, obavijeni su bijelim omotačem i sastoje se od tridesetak pupoljaka. Plodnica je nadrasla, trogradna i nosi više sjemenki zametaka. Plodovi su

trodijelni tobolci koji nose sitne, crne, sjajne sjemenke. Potiče iz dijelova srednje Azije. Ubraja se u najstarije povrće. Ime vrste *sativum* znači sijan, kultiviran. Narodna imena su česan, češanj, bijeli luk (13).

Stoljećima je češnjak proučavan zbog svojih blagotvornih učinaka na zdravlje i smatra se najboljom hranom za prevenciju bolesti. Pretklinička i klinička ispitivanja pokazala su da dnevno konzumiranje češnjaka smanjuje kolesterol, inhibira agregaciju trombocita i smanjuje krvni tlak (14).

Interesi o potencijalnim zdravstvenim učincima češnjaka mogu se pratiti do početka civilizacije. Najraniji zapisi iz drevnog Egipta ukazuju na češnjak kao redoviti izvor hranjivih tvari u dnevnoj prehrani. Ponavljajuća tema kroz povijest bila je dodavanje češnjaka dnevnoj prehrani radničke klase kako bi se povećala snaga, poboljšala radna sposobnost i povećala sitost. Drevni medijski tekstovi iz Egipta, Grčke, Kine, Indije i Rima propisuju češnjak za pomoć kod respiratornih i probavnih poremećaja, smanjenje infekcija i liječenja bolesti srca. Uz korištenje kao konzervansa hrane i pojačivača okusa, češnjak ima i snažne terapeutske učinke. Blagotvorni učinci češnjaka na kardiovaskularno zdravlje još se danas istražuju. Pojavili su se novi dokazi koji upućuju na to da su kardioprotektivni učinci češnjaka uvelike određeni metodom pripravljanja (14).

a) Sirovi češnjak

Sirovi neoštećeni lukovi češnjaka, iako sastavljeni od 65% vode, sadrže velike količine γ-glutamilcisteina, koji mogu proći hidrolizu ili oksidaciju da bi formirali neaktivan cisteinsulfoksid, alin. Tijekom skladištenja pri hladnim temperaturama, alin se prirodno akumulira (do ~ 1%) u lukovicama češnjaka. Uništavanje lukovice češnjaka drobljenjem, rezanjem ili konzumiranjem rezultira aktivacijom enzima alinaze, potičući pretvorbu alina u aktivni metabolit alicin (dialil tiosulfanat). Alicin je izuzetno nestabilan i neugodan spoj koji se lako raspada u organske dialilne polisulfide, dialil sulfid (DAS), dialil disulfid (DADS) i dialil trisulfid (DATS) kao i ajoene (14).

b) Češnjak u prahu i ulje

Češnjak u prahu, dehidrirani, praškasti češanj od češnjaka, ima sastav identičan sirovom češnjaku; stoga je sposoban proizvesti biološki aktivni alicin i njegove metabolite, organske polisulfide DAS, DADS i DATS. Češnjakovo ulje se formira kroz destililaciju cijelog češnjaka u organskim otapalima. Iako alicin nije sadržan u ekstrahiranom fragmentu ulja, DADS i DATS su prisutni (14).

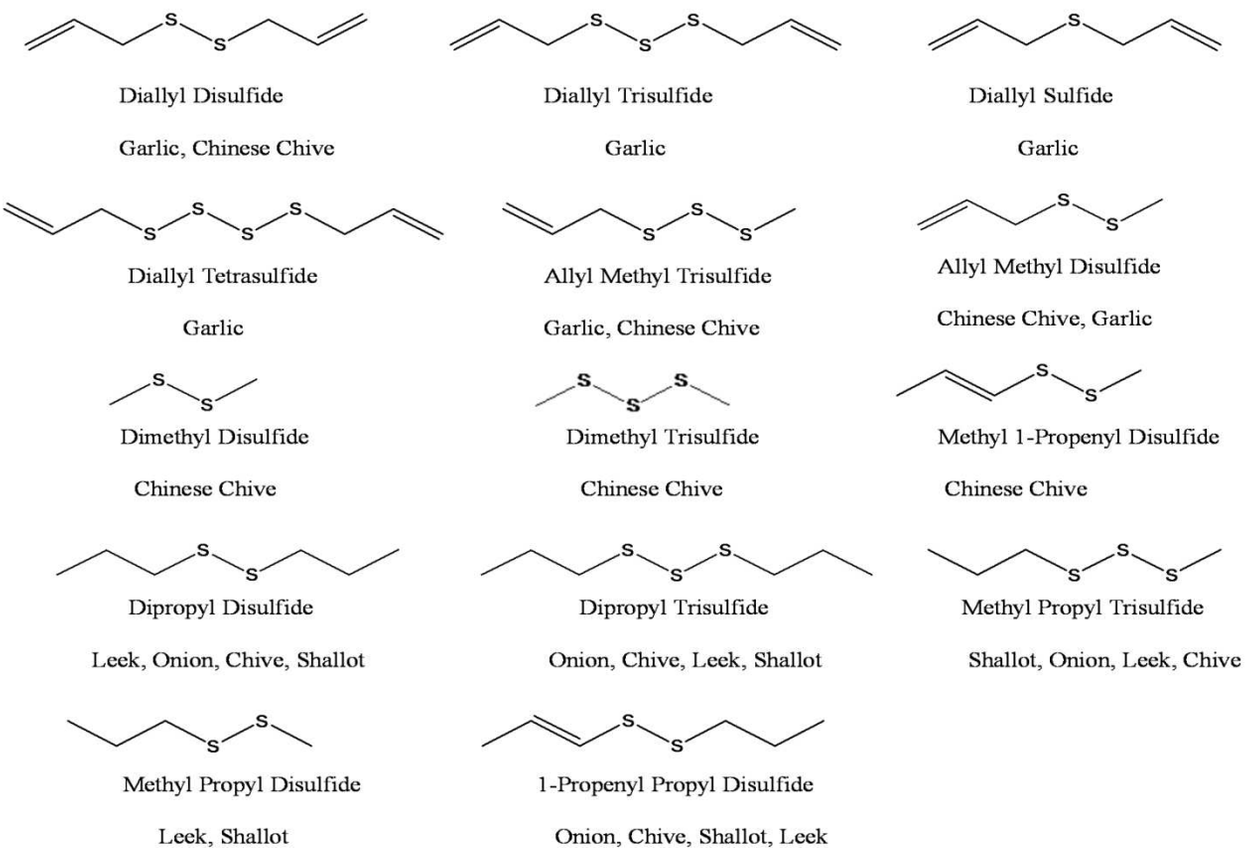
c) Starinski ekstrakt češnjaka

Starinski ekstrakt češnjaka (AGE) priprema se pohranjivanjem sirovog rezanog češnjaka u 15-20% etanola u trajanju od 20 mjeseci u spremniku od nehrđajućeg čelika. Ekstrakt se zatim filtrira i koncentrira pri niskim temperaturama. AGE se prodaje u suhom ili tekućem obliku, a tekući oblik sadrži 10% etanola. Postupak starenja povećava aktivnost snažnih antioksidansa, uključujući S-alilcistein i S-alilmerkaptocistein, dajući AGE-u veću antioksidacijsku sposobnost od svježeg češnjaka. Štoviše, proces starenja mijenja oštre i nadražujuće komponente koje se nalaze u sirovom češnjaku. Za razliku od sirovog češnjaka, AGE ne sadrži alicin, ali sadrži dialil polisulfide DAS i DADS (14).

Iako nema standardnog unosa sirovog češnjaka, nedavne kliničke studije pokazuju da učinkovita dnevna doza praška češnjaka varira od 150 do 2400 mg. Unos starinskog ekstrakta češnjaka kreće se u rasponu od 0,25 do 7,2 g/d (14).

1.5. POLISULFIDI

Proizvodi derivata alicina (dialil disulfid, dialil trisulfid) koji se nalaze u eteričnim uljima češnjaka pokazali su dobre antimikrobne i antioksidativne aktivnosti. Glavni spojevi u luku su dipropil disulfid i dipropil trisulfidi za njih je otkriveno da imaju antimikrobne i antioksidativne aktivnosti. Poriluk (*Allium porrum*), kineski vlasac (*Allium tuberosum*), ljutika (*Allium ascalonicum*) i vlasac (*Allium schoenoprasum*) široko se uzgajaju u azijskim zemljama. Oni su važni sastojci u mnogim europskim i azijskim dijetama i poznati su po svojim ljekovitim svojstvima. Vjeruje se da esencijalna ulja ovih biljaka imaju antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, koje su uglavnom povezane s njihovim sumpornim spojevima (11).



Slika 11. Strukture glavnih spojeva eteričnih ulja češnjaka, luka, poriluka, kineskog vlasca, ljutike i vlasca

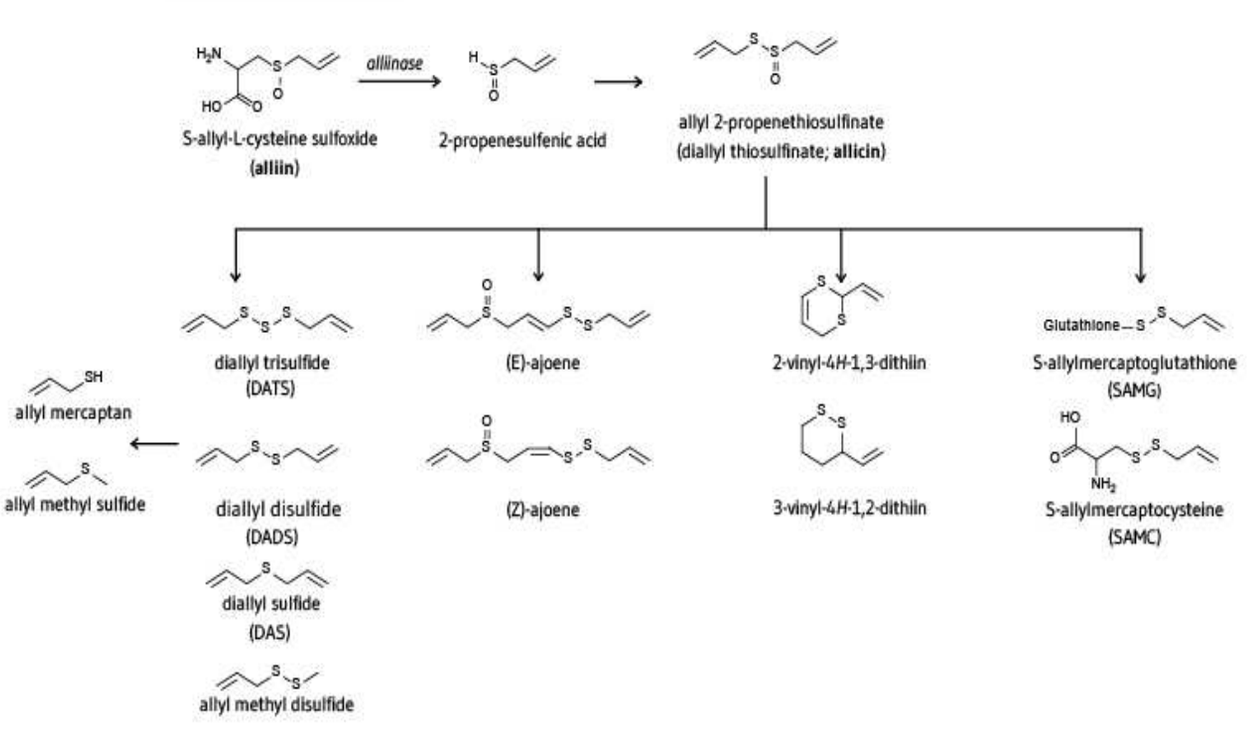
Preuzeto s : http://www.mdpi.com/1420-3049/19/12/20034/htm

Češnjak sadrži više od 2000 biološki aktivnih tvari kao što su hlapljive, u vodi topljive i u ulju topljive organosumporne komponente (npr. DAS, DADS, DATS) uz eterična ulja, dijetalna vlakna, šećere (uključujući inulin), flavonoide i pektin. Organski spojevi sumpora uključuju alin i skordinin A i B. Nedavno je nekoliko novih cikličkih sulfoksida nazvanih garlinini izolirano iz acetonskih ekstrakata češnjaka. Tiosulfinati (na primjer, alicin), azen (npr. E-ajoeni, Z-ajoeni), vinilditini (npr. vinil-l, 3-ditin, vinil-l, 2-ditin) i sulfidi (npr. DADS, DATS) su produkti razgradnje prirodno prisutnog cistein sulfoksidida- alinina (15).

S-alil-L-cisteinsulfoksid (alin) čini oko 80% cisteinsulfoksida u češnjaku. Nastanak tiosulfinata je vrlo brz i utvrđeno je da je kompletan u roku od 10 do 60 sekundi od lomljenja češnjaka. Alicin se razgrađuje *in vitro* i nastaju razne organosulfidne supstance topljive u mastima, uključujući dialiltrisulfid (DATS), dialildisulfid (DADS) i dialil sulfid (DAS), ili u prisutnosti ulja ili organskih otapala, ajoene i vinilditine. *In vivo*, alicin može reagirati s

glutationom i L-cisteinom kako bi se proizveo S-alilmerkaptoglutation (SAMG) i S-alilmerkaptocistein (SAMC) (16).

Apsorpcija i metabolizam alicina i derivata alicina samo su djelomično razumljivi. U ljudi nije pronađen nikakav alicin u serumu ili urinu do 24 sata nakon uzimanja 25 g sirovog češnjaka koji sadrži značajnu količinu alicina. Prije uzimanja pripravaka od češnjaka i nakon gutanja u želucu, alicin se vjerojatno raspada kako bi oslobodio nekoliko nestabilnih spojeva, uključujući DAS i DADS. Ovi organosumporni spojevi se metaboliziraju u alil merkaptan, alil metil sulfid i alil metil disulfid, koji se mogu osjetiti u ljudskom dahu nakon konzumiranja češnjaka. Iako su brojne biološke aktivnosti pripisane raznim spojevima izvedenim iz alicina, još nije jasno koji od tih spojeva ili metabolita zapravo dosegne ciljno tkivo. Alil metil sulfid - ali ne alilmerkaptan - otkriven je u mokraći unutar četiri sata od uzimanja češnjaka, što upućuje da se taj spoj apsorbira u cirkulaciju i brzo izlučuje. U ljudskoj krvi, urinu ili stolici, čak i nakon konzumacije do 25 g svježeg češnjaka ili 60 mg čistog alicina, nisu otkriveni drugi spojevi izvedeni iz alicina, uključujući dialil sulfide, ajoene i vinilditine. Ovi nalazi sugeriraju da se, ako se apsorbiraju, alicin i derivati alicina brzo metaboliziraju (16).



Slika 12. Shematski prikaz metabolizma alina

Preuzeto s: http://lpi.oregonstate.edu/mic/food-beverages/garlic

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati citotoksično djelovanje ekstrakta, destilata izoliranih spojeva iz vrste *Allium,* na humane karcinomske stanice. Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnoj aktivnosti ispitivat će se na humanim karcinomskim stanicama mokraćnog mjehura (UM-UC-3) i humanim karcinomskim stanicama glioblastoma (LN229).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE LINIJE

In vitro istraživanje ispitivanja djelovanja polisulfida provodilo se na humanim karcinomskim stanicama UM-UC-3 i LN229. Obilježja tih staničnih linija prikazana su u tablicama.

Tablica 4. Obilježja UM-UC-3 stanične linije

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

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	mokraćni mjehur
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznih stanica
Spol	muški
Uvjeti pohrane	tekući dušik

Tablica 5. Obilježja LN229 stanične linije

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

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	mozak
Stanični tip	glioblastom
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	glioblastom
Dob	60 godina
Spol	ženski

Etnicitet	bijeli
Primjena	ove stanice se koriste u studijama o apoptozi
Uvjeti pohrane	tekući dušik

3.2. POSTUPAK

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

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

Brojanje stanica radi se tako da se 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 polisulfida iz porodice lukova i ekstraktima luka u koncentracijama 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice koje predstavljaju kontrolu su ostavljene u samom mediju te u njih nisu dodani ekstrakti luka.

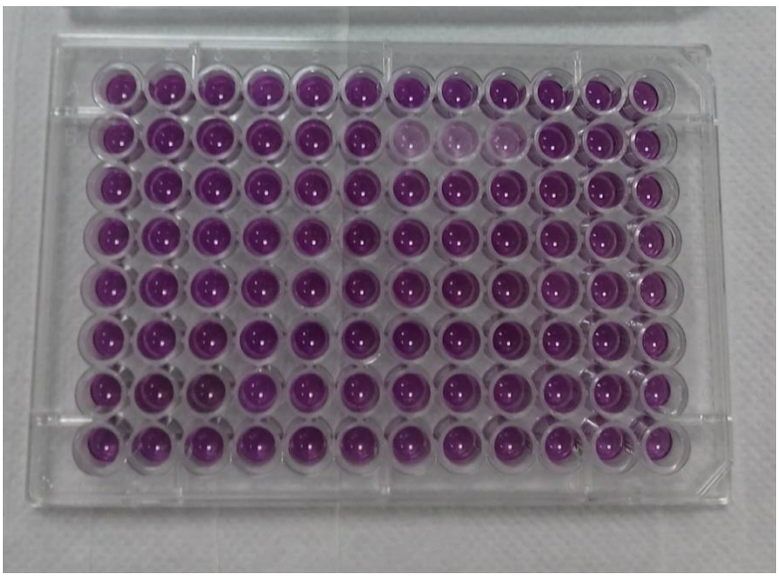


Slika 13. Vlažni inkubator za uzgoj stanica

Preuzeto s: http://www.nuve.com.tr/Products/Incubation/ec-160-co2

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.



Slika 14. Ljubičasto obojenje nakon dodavanja DMSO

Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama polisulfida i ekstraktima iz luka, te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih polisulfida.

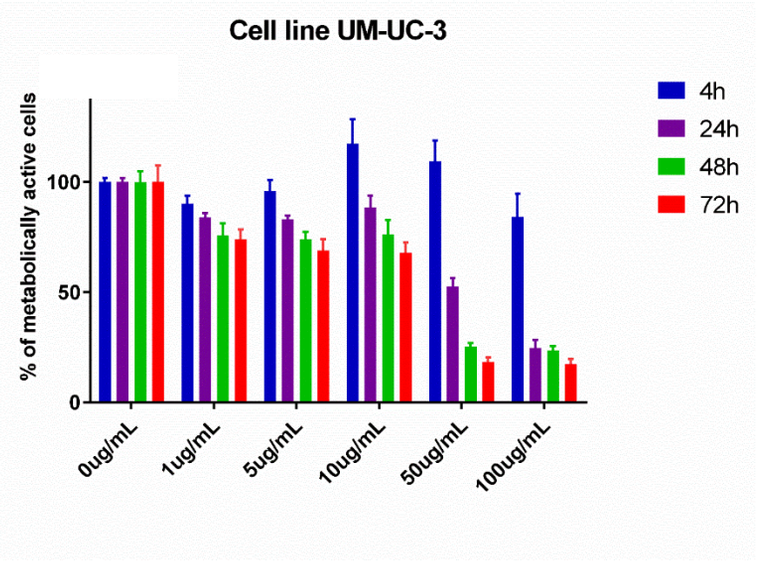
4. REZULTATI

Empirijska obrada:

Kao ograničenje istraživanja uzima se premala serija podataka.

4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA- STANIČNA LINIJA UM-UC-3

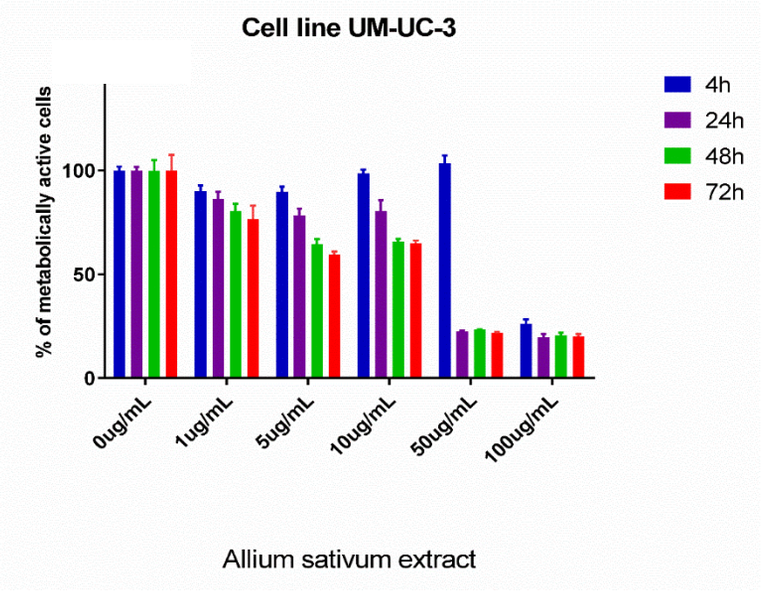
4.1.1. *ALLIUM SATIVUM* DESTILAT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50	1312	45.1	20.86	14.13

Slika 15. Destilat iz *Allium sativum* ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

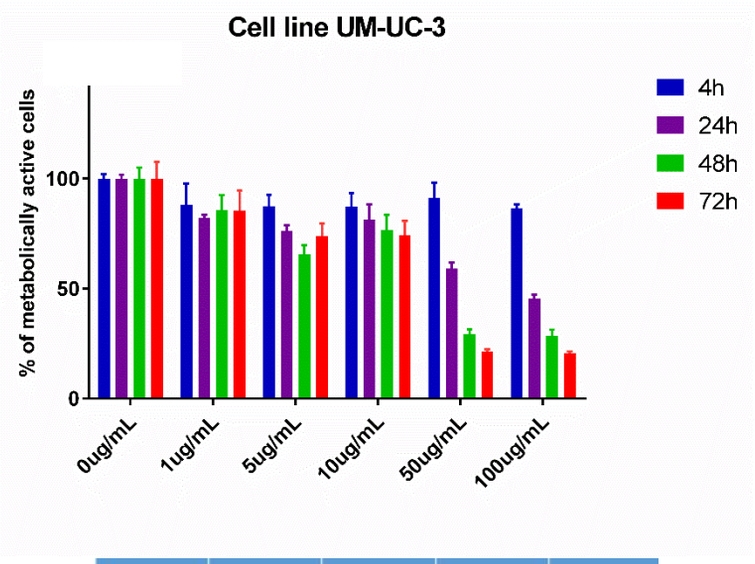
4.1.2. *ALLIUM SATIVUM* EKSTRAKT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50	119.8	22.38	14.49	12.48

Slika 16. Ekstrakt iz *Allium sativum* ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 5µg/mL i 10µg/mL nakon 48h. Koncentracije od 50 µg/mL i 100 µg/mL ostvaruju učinak nakon 24h. Daljnjom inkubacijom, pri svim koncentracijama, smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

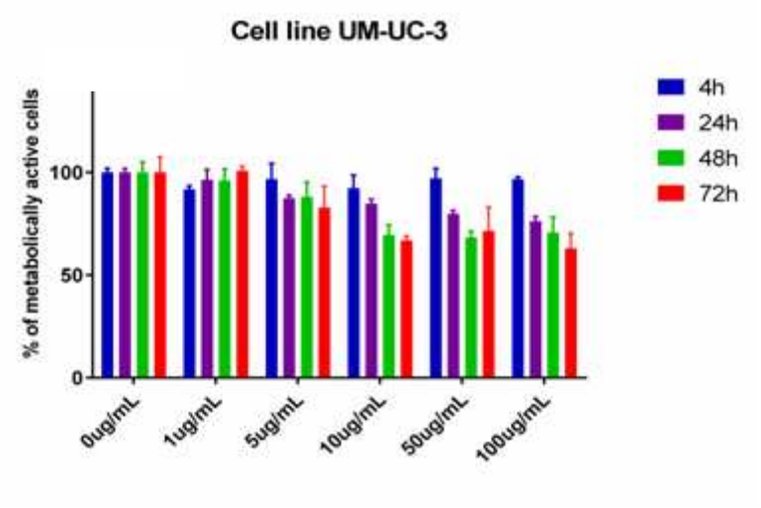
4.1.3. DIALIL DISULFID



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50	526.2	65.36	22.3	19.07

Slika 17. Dialil disulfid ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

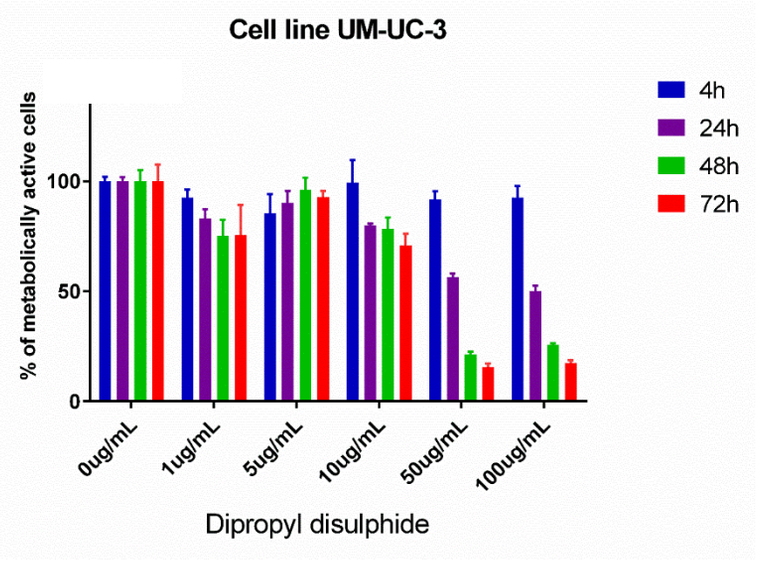
4.1.4. *ALLIUM COMMUTATUM* DESTILAT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50	2057	244.4	143.1	119.9

Slika 18. Dialil disulfid ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 10 µg/mL nakon 48h i 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

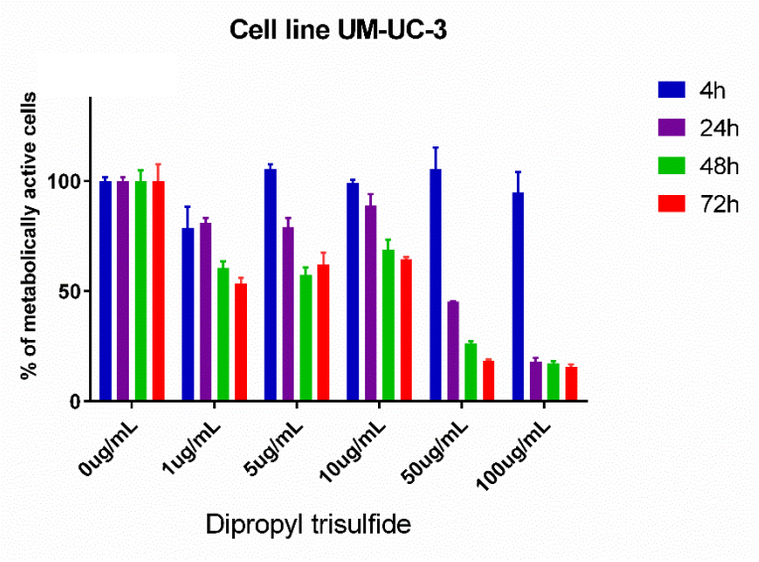
4.1.5. DIPROPIL DISULFID



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50	896	72.69	26.19	19.39

Slika 19. Dipropil disulfid ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 10 µg/mL nakon 24h i 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

4.1.6. DIPROPIL TRISULFID

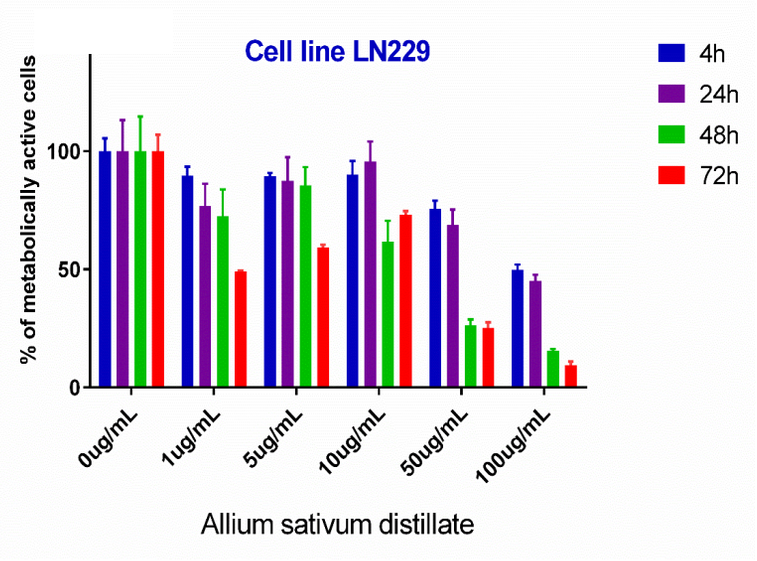


UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50	5311	35.31	12.34	10.35

Slika 20. Dipropil trisulfid ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 5 µg/mL nakon 24h. Učinak se ostvaruje i pri koncentraciji od 10 µg/mL nakon 48h, te pri 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom, pri svim koncentracijama, smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

4.2. GLIOBLASTOM – STANIČNA LINIJA LN229

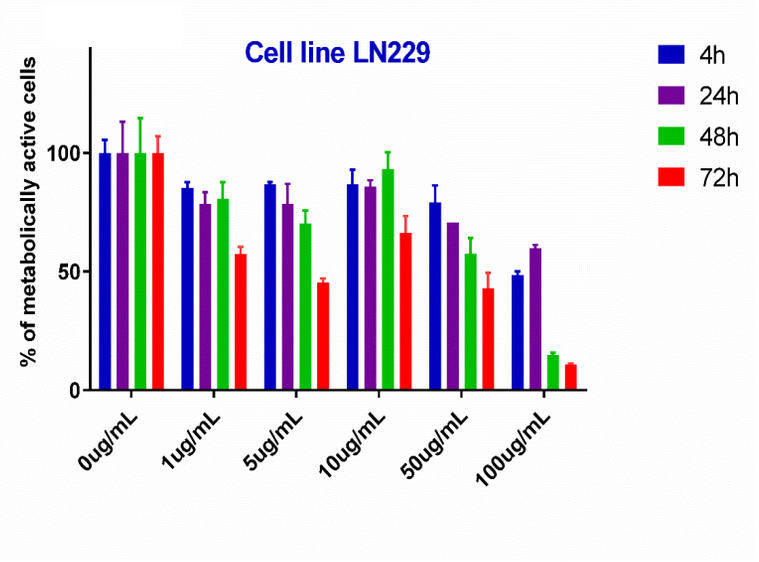
4.2.1. *ALLIUM SATIVUM* DESTILAT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50	114.5	92.78	17.41	12.01

Slika 21. *Allium sativum* destilat ostvaruje značajan učinak pri koncentraciji od 1 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica. Pri koncentraciji od 5µg/mL značajan učinak se ostvaruje nakon 72h inkubacije. Pri koncentraciji od 10µg/mL učinak se ostvaruje nakon 48h, zatim dolazi do blagog oporavka stanica. Pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL učinak se ostvaruje već nakon 4h i daljnjoj inkubacijom se smanjuje broj metabolički aktivnih stanica.

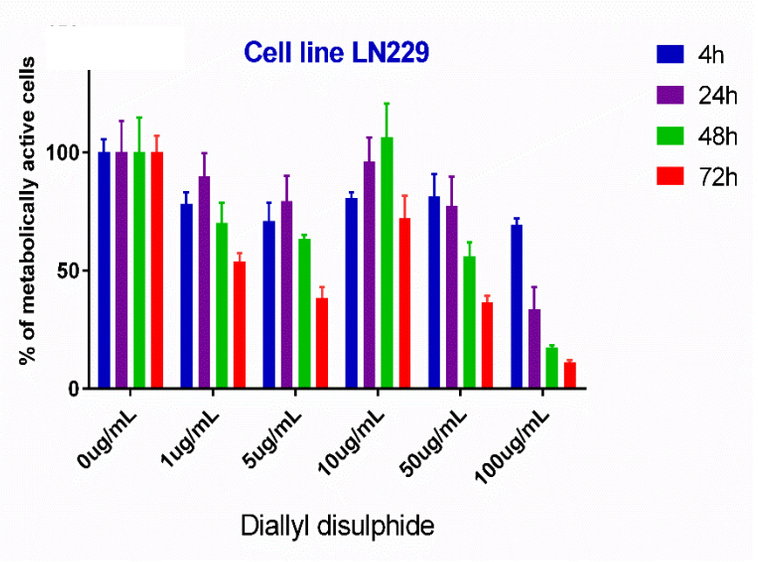
4.2.2. *ALLIUM SATIVUM* EKSTRAKT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50	106	110.6	40.84	10.41

Slika 22. *Allium sativum* ekstrakt ostvaruje značajan učinak pri koncentraciji od 1µg/mL i 5µg/mL nakon 72h. Pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL učinak se ostvaruje već nakon 4h. Daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

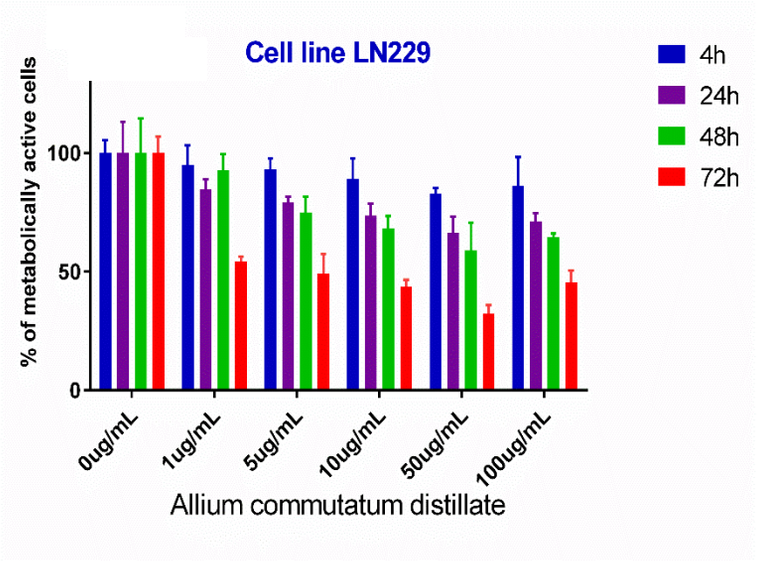
4.2.3. DIALIL DISULFID



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50	180.1	85.09	44.69	8.855

Slika 23. Dialil disulfid ostvaruje značaj učinak pri koncentracijama od 1 µg/mL i 5 µg/mL nakon 4h. Nakon 24h dolazi do blagog oporavka stanica, ali daljnjom inkubacijom se smanjuje broj metabolički aktivnih stanica. Pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL učinak se ostvaruje već nakon 4h i daljnjoj inkubacijom se također smanjuje broj metabolički aktivnih stanica.

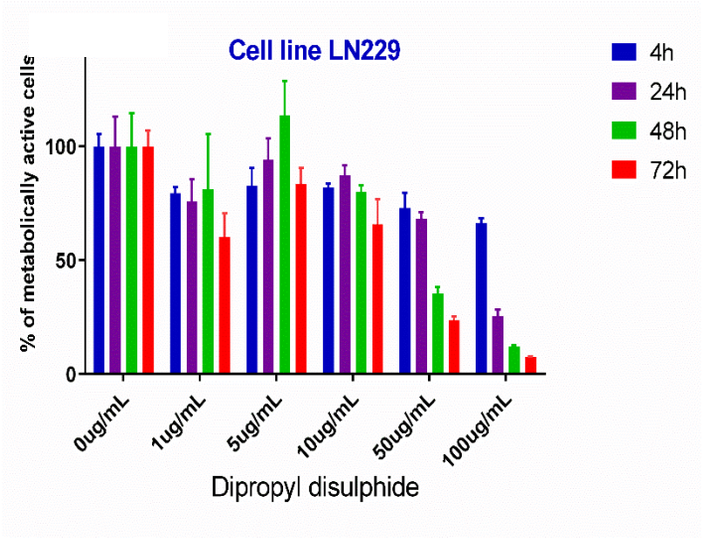
4.2.4. *ALLIUM COMMUTATUM* DESTILAT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50	369.7	136.8	90.12	6.364

Slika 24. *Allium commutatum* destilat pokazuje značaj učinak pri koncentracijama 5µg/mL, 10 µg/mL, 50µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom, pri svim koncentracijama smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

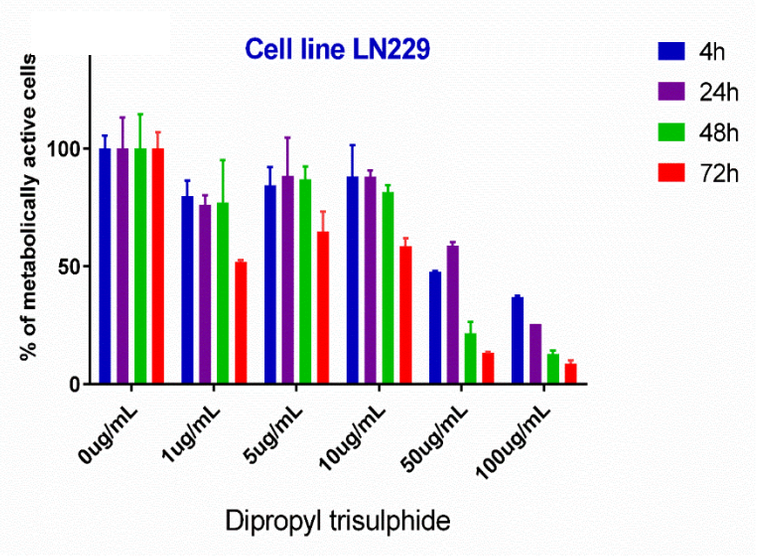
4.2.5. DIPROPIL DISULFID



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50	150.7	62.43	30.64	15.62

Slika 25. Dipropil disulfid ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 1 µg/mL i 10 µg/mL nakon 72h. Pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL ostvaruje se učinak nakon 4h i daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

4.2.6. DIPROPIL TRISULFID



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50	49.26	58.82	22.19	8.434

Slika 26. Dipropil trisulfid ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL i 10 µg/mL nakon 72h. Pri koncentracijama od 50 µg/m i 100 µg/m ostvaruje se učinak nakon 24h. Daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica.

5. RASPRAVA

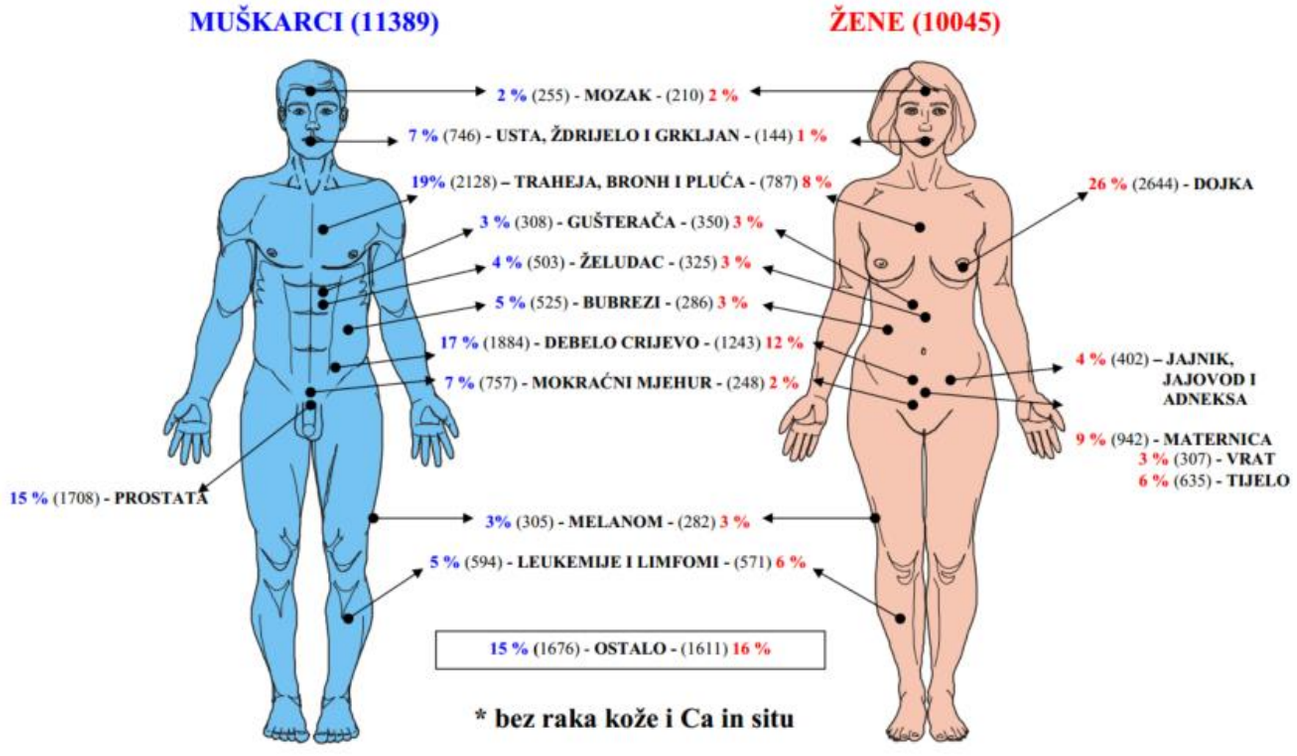
Karcinom je životno ugrožavajuća bolest karakterizirana abnormalnom proliferacijom stanica koje upadaju u susjedna tkiva i uzrokuju uništavanje tih tkiva. Karcinom se širi na udaljene organe kroz krvotok i limfni sustav. Često je nemoguće odrediti specifičan uzrok za svaku vrstu karcinoma. Međutim, postoje određeni čimbenici koji povećavaju rizik od karcinoma kao što su uporaba duhana i alkohola, zagađivači okoliša, infektivna sredstava i promjene životnih navika. Otprilike 10% do 15% karcinoma je potpuno nasljedno. U svijetu se godišnje javlja više od 6 milijuna smrtnih slučajeva od karcinoma. 2008.godine dijagnosticirano je oko 12,7 milijuna karcinoma i prijavljeno 7,6 milijuna smrtnih slučajeva. Karcinom je ozbiljno zdravstveno pitanje razvijenih zemalja i zemalja u razvoju. U 2012. godini procijenjeno je oko 14,1 milijuna slučajeva u cijelom svijetu, od toga 7,4 milijuna muškaraca i 6,4 milijuna žena. Očekuje se povećanje tog broja na 24 milijuna do 2035. godine (17).

Tablica 6. Statistika za karcinom u svijetu za 2012. g.
Preuzeto s: http://journal.waocp.org/article_29255_5aea359ba0421b89c9419048ae1d5ddf.pdf

Rank	Cancer	New case diagnosed in 2012 (1000s)	Percent of all cancer excluding non melanoma of skin
1	Lung	1,825	13
2	Breast	1,677	11.9
3	Colorectum	1,361	9.7
4	Prostate	1,112	7.9
5	Stomach	952	6.8
6	Liver	782	5.6
7	Bladder	430	3.1
8	Non-hodgkin lymphoma	386	2.7
9	Leukaemia	352	2.5
10	Pancreas	338	2.4
11	Kidney	338	2.4
12	Brain	256	1.8
13	Melanoma of skin	232	1.6
14	Gall bladder	178	1.3
15	Hodgkin Lymphoma	66	0.5

Karcinom mokraćnog mjehura je u prosjeku 3 do 4 puta češći u muškaraca nego žena. Učestalost i prevalencija karcinoma se vidi u šestom, a vrhunac je u sedmom i osmom desetljeću života. To je uglavnom bolest starijih osoba. Različiti čimbenici rizika su najvažniji razlog za drugačiju incidenciju i smrtne ishode od karcinoma mokraćnog mjehura u svijetu. Čimbenici rizika za karcinom mokraćnog mjehura uključuju pušenje (odgovorno za 50% karcinoma

mokraćnog mjehurai 65% invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura), infekcija sa *Schistosoma Haematobium*, profesionalne izloženosti aromatičnim aminima i policikličkim aromatskim ugljikovodicima, i drugi mogući čimbenici kao što su dijeta,zagađenje okoliša i genetska predispozicija. Dok je pušenje cigareta dominantan uzrok karcinoma mokraćnog mjehura u Sjedinjenim Državama, *Schistosoma Haematobium* je vodeći uzrok u većini dijelova Afrike (18).



Slika 27. Raspodjela novooboljelih od raka po sijelima u 2014.godini u Hrvatskoj

Preuzeto s https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdf

Glioblastom je najagresivniji difuzni gliom astrocitne linije i smatra se tumorom IV stupnja po klasifikaciji WHO. Glioblastom je najčešći maligni tumor mozga koji čini 54% svih glioma i 16% svih primarnih tumora mozga. Dijagnosticiran je prvenstveno u starijoj dobi, s prosječnom dobi od 64 godine pri dijagnozi. Učestalost glioblastoma se povećava s dobi (75-84 godina) i pada nakon 85 godina. Glioblastom je neuobičajen kod djece. Stopa učestalosti je 3,19 na 100 000 osoba u Sjedinjenim Američkim Državama. Incidencija je 1,6 puta veća kod muškaraca u odnosu na žene i 2,0 puta veća kod bijelaca u usporedbi s afroamerikancima, također je niža incidencija kod azijata i američkih indijanaca. Glioblastom je i dalje neizlječiv tumor s prosječnim preživljavanjem od samo 15 mjeseci. Liječenje je složeno, u početku se

sastoji od maksimalno sigurne kirurške resekcije nakon čega slijedi terapija zračenjem (RT) i istodobna kemoterapija temozolomidom (19).

Kemoterapija se rutinski koristi za liječenje karcinoma. Budući da stanice karcinoma gube mnoge regulatorne funkcije prisutne u normalnim stanicama, one se nastavljaju dijeliti i kada normalne stanice prestanu. Ova značajka čini stanice karcinoma osjetljivim na kemoterapijske lijekove. Međutim, kemoterapijski tretmani nisu lišeni vlastitih problema. Kao posljedica kemoterapijskih tretmana može doći do različitih toksičnosti. Na primjer, 5-fluorouracil, čest kemoterapeutski agens, uzrokuje mijelotoksičnost i kardiotoksičnost. Doksorubicin uzrokuje kardiotoksičnost, nefrotoksičnost i mijelotoksičnost. Bleomicin je poznat po plućnoj toksičnosti, a osim toga, bleomicin pokazuje i kožnu toksičnost. Dokazano je da ciklofosfamid, lijek za liječenje mnogih malignih stanja uzrokuje toksičnost mokraćnog mjehura u obliku hemoragičnog cistitisa, imunosupresije, alopecije i kardiotoksičnost kod visokih doza (20).

Otrovnost kemoterapijskih lijekova ponekad stvara značajan problem u liječenju karcinoma. Predložene su različite terapije za liječenje karcinoma, od kojih mnoge koriste biljne derivate. Na tržištu danas postoje četiri klase biljnih lijekova protiv karcinoma, vinka alkaloidi (vinblastin, vinkristin i vindezin), epipodofilotoksini (etopozid i tenipozid), taksani (paklitaksel i docetaksel) i derivati kamptotecina (kamptotecin i irinotekan). Biljke i dalje imaju ogroman potencijal za otkrivanje novih lijekova i kao takvi su spremnici prirodnih kemikalija koji mogu pružiti potencijalni kemoterapijski učinak protiv karcinoma (20).

Tablica 7. Antitumorska aktivnost kemijskih komponenti biljaka koje se koriste u medicini
Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160808/

Name of Plant	**Major Chemical Constituents**	***In Vitro* Effects**	***In Vivo* Effects**
Tinospora cardifolia	20 β-hidroksiekdisteron, kordiosid, kolumbin	Citotoksično djelovanje na HeLa stanice	Značajno povlačenje karcinoma i preživljavanje kod miševa s Ehrlich ascites karcinomom
Ziziphus	betulin, betulinska	a) Citotoksično, selektivno	

nummularia	kiselina	prema stanicama raka u usporedbi s normalnim stanicama b) Potiče apoptozu preko stvaranja ROS-a, inhibiciju topoizomeraze I i aktivaciju MAP kinaze c) Inhibira angiogenezu, modulira transkripcijske aktivatore, P53 i CD95 posredovanu staničnu smrt d) Potiče gubitak mitohondrijskog membranskog potencijala, oslobađanje Cyt.c i Smac	
Andrographis paniculata	andrografolid	a) Alkoholni ekstrakt pokazao je citotoksičnost prema različitim staničnih linijama raka b) Povećava antioksidacijske enzime SOD, katalazu, GST; smanjuje LDH i MDA	Andrografolid povlači karcinom kod miševa
Centella asiatica	aziatikozid, hidrokotilin, valerin, pektinska kiselina, sterol, stigmasterol, flavonoidi, tankunozidi i askorbinska kiselina	a) Ekstrakt listova C. asiatica, ovisno o dozi, inhibira proliferaciju transformiranih staničnih linija b) antitumorsko djelovanje zbog inhibicije sinteze DNA	
Curcuma longa	kurkumin	a) Inhibira proliferaciju stanica u širokom rasponu staničnih linija	a) Smanjuje VGEF i bFGF posredovanu angiogenezu

		b) Down-regulira NFk-B, AP-1, EGR-1, COX-2, LOX, NO, MMP-9, TNF, Chemokine, EGFR, HER2 c) Inhibira put JNK, put serin/treonin kinaze d) Inhibira metastaziranje smanjenjem MMP-2 e) Inducira apoptozu *in vitro* smanjenjem mitohondrijskog membranskog potencijala, oslobađanjem Cytc, aktivacijom kaspaza 3 i 9 i regulacijom anti-apoptotičkih proteina Bcl-XL i proteina povezana s integrinom	b) Sprječava nastanak karcinooma debelog crijeva i želuca u glodavaca
Phyllanthus amarus	nirtetralin, nirantrin, filantin, filtetralin	a) Inhibira proliferaciju stanica u različitim stanicama karcinoma, inhibira aktivnost cdc 25 tirozin fosfataze b) Inhibira aktivnost topoizomeraze I i II u kulturama mutantnih stanica Sacchromyces cerviacae c) Potiče usporavanje staničnog ciklusa i ometa popravak DNA d) Pročišćeni lignini djeluju kao reverzni agens	a) Oralna primjena ekstrakta povećava životni vijek i smanjuje veličinu tumora kod miševa koji imaju Daltonov limfni ascites (DLA) i Erlich ascites karcinom (EAC) b) Ekstrakt biljke smanjuje pojavu tumora induciranu n-nitrozodietilaminom (NDEA) c) Ekstrakt biljke ima antiangiogene učinke

		MDR	kod miševa koji imaju Lewisov plućni karcinom
Annona atemoya	bulatacin	a) Citotoksično protiv tumorskih staničnih linija b) Potaknuta smrt stanica uzrokovana marginacijom kromatina i kondenzacijom tumorskih stanica	
Mappia foetida	kamptotecin	a) Učinkoviti inhibitori sinteze nukleinskih kiselina u HeLa stanicama i L-120 stanicama b) Inhibira topoizomerazu I c) usporava rast ljudskih stanica karcinoma debelog crijeva i stanica rabdomiosarkoma d) Moćan kemoterapijski lijek protiv leukemije	a) Potiče djelomičnu ili potpunu remisiju karcinoma dojke u ksenograft modela b) Faza II ispitivanja protiv limfoma, leukemije i epitelnih tumora
Withania somnifera	vitaferin A	a) Potiče apoptozu u različitim stanicama karcinoma kroz brzu proizvodnju ROS b) Up-regulacija apikalnih receptora i i promijenjeni omjer članova Bcl2 obitelji proteina koji dovode do nizvodne aktivacije cjepljenja kaspaze-3 i PARP čime se	a) W. somnifera formulacija je vrlo učinkovita u regresiji karcinoma> 50% u EAC i EAT modelima b) Povećava ekspresiju Th1 citokina, CD3, povećava ekspresiju T i CD40 u modelu EAT tumora miša

		dobiva nukleozno cijepanje DNA u HL-60 stanicama c) Kombinacija ekstrakta korijena i listova withaferina pokazuje citotoksičnost prema staničnim linijama karcinoma i inducira apoptozu kroz stvaranje RNOS	
Cedrus deodara	Lignani, vikstromol, matairesinol i dibenzil butirolaktol	a) Lignanski ekstrakti iz stabljike pokazuju citotoksičnost u ljudskim stanicama karcinoma b) Povećava populaciju pod-G0 u HL-60 i MOLT-4 stanicama c) Potiče formiranje DNA ljestvice i stvaranje dušičnog oksida (NO) koji dovodi do apoptoze	Pokazuje regresiju karcinoma u mišjim modelima
Boswellia serrata	triterpenska kiselina	a) Inducira apoptozu u različitim staničnim linijama karcinoma b) Inhibira sintezu DNA i rast stanica HL-60 c) Inhibira topoizomeraze I i II	Učinkovito protiv tumora mozga

Mnoge *in vitro* i *in vivo* studije ukazuju na mogući preventivni učinak preparata češnjaka i njihovih spojeva. Utvrđeno je da češnjak sadrži veliki broj moćnih bioaktivnih spojeva

s antikancerogenim svojstvima, uglavnom alil sulfida. Navedeno je da različiti spojevi češnjaka moduliraju sve veći broj molekularnih mehanizama u karcinogenezi, kao što je stvaranje DNA, mutageneza, uklanjanje slobodnih radikala, proliferacija stanica i diferencijacija, kao i angiogeneza. Stopa rasta stanica karcinoma smanjena je češnjakom, blokadom staničnog ciklusa koja se javlja u G2/M fazi. 1990. godine, američki National Cancer Institute pokrenuo je program isplanirane prehrane kako bi utvrdio koja je hrana odigrala važnu ulogu u prevenciji raka. Zaključili su da češnjak može biti najsnažnija hrana kao preventivna mjera protiv karcinoma. Češnjak ima različite antitumorske učinke, uključujući inhibiciju rasta tumorskih stanica i kemopreventivne učinke. U glodavaca je zabilježeno da češnjak i njegovi spojevi smanjuju razvoj kemijski induciranih tumora u jetri, debelom crijevu, prostati, plućima, koži, mokraćnom mjehuru, jednjaku i želucu. Dialil trisulfid (DATS), organosumporni spoj izoliran iz češnjaka, pokazao je antikancerogeno djelovanje kako u *in vitro* tako i *in vivo* ispitivanjima. Citotoksičnost DATS-a prema epitelnim stanicama prostate je manja u odnosu na PC-3 stanice raka (21).

DATS smanjuje tumorsku masu, mitozu u tumorima, smanjuje aktivnost histon deacetilaze, povećava acetilaciju H3 i H4, inhibira progresiju staničnog ciklusa i smanjuje tumorske markere (survivin, Bcl-2, c-Myc, mTOR, EGFR, VEGF). Češnjak sinergira učinak eikozapentaenske kiseline, supresora raka dojke, i antagonizira učinak linoleinske kiseline, pojačivača karcinoma dojke (21).

Alicin inhibira proliferaciju ljudskih endometrijskih stanica raka dojke i raka debelog crijeva. Inhibicija rasta prati nakupljanje stanica u W/G1 i G2/M fazama staničnog ciklusa. Tako je alicin također odgovoran za antiproliferativni učinak češnjaka. Dialil sulfid i dialil disulfid, inhibiraju aktivnost arilamina N-acetiltransferaze i 2-aminofluorensku DNA u humanim promijelocitnim leukemijskim stanicama. DATS inhibira i rast stanica ljudskog melanoma A375 i stanica karcinoma bazalnih stanica, pojačavanjem razine intracelularnih reaktivnih atoma kisika i oštećenjem DNA, i induciranjem stresa na endoplazmatski retikulum i apoptozu posredovanu mitohondrijima (21).

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su ekstrakti i izolirani spojevi iz biljne vrste *Allium*, odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije: UM-UC-3 (karcinom mokraćnog mjehura) i LN229 (glioblastom).

Utjecaj na stanice karcinoma mokraćnog mjehura UM-UC-3 kod većine korištenih spojeva i ekstrakata je značajniji pri većim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju dialil disulfid i dipropil trisulfid pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

In vitro istraživanje na stanicama glioblastoma LN229 pokazalo je da svi imaju određeni učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica, a najznačajniji učinak dialil disulfid i dipropil trisulfid pri koncentraciji od 100 μg/mL nakon 72h inkubacije.

Na temelju navedenih rezultata, vidljivo je da biljna vrsta *Allium spp.* ima veliki potencijal za liječenje različitih bolesti, a posebno su važna 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 (UM-UC-3) i glioblastoma (LN229) polisulfidima izoliranim iz biljne vrste *Allium spp*. dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.

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

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

4) Citotoksični učinak polisulfida, 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) Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Biologija raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. pp. 1-10.
2) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013., Bilten 38. [Online].; 2015. http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf Datum pristupa: 10.1. 2018.
3) Dobruch, J., et al. (2016). Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology and Outcomes. *European Urology,* 69, pp. 300-310. http://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(15)00782-4/pdf Datum pristupa: 10.12.2017.
4) 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. pp. 146-149.
5) Chen, J., et al. (2017). Expression and clinical significance of androgen receptor in bladder cancer: A meta-analysis. *Molecular and clinical oncology,* doi: 10.3892/mco.2017.1389, pp. 919-927. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5700275/pdf/mco-07-05-0919.pdf Datum pristupa: 15.12.2017.
6) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116 Datum pristupa: 9.1.2018.
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. pp. 105.-108.
8) Hanif, F., et al. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,*18 (1) pp. 3-9. http://journal.waocp.org/article_42593_ac801aaa3721f49b0f79bc0c790bfac0.pdf Datum pristupa: 15.1.2018.
9) Vigneswaran, K., Neill, S., Hadjipanayis, C. (2015.) Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Annals of Translational Medicine,* 3(7):95, doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.57. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430738/ Datum pristupa: 15.1.2018.
10) https://www.britannica.com/plant/allium-plant Datum pristupa: 20.1.2018.

11) Mnayer, D., et al. (2014). Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Six Essentials Oils from the Alliaceae Family. *Molecules*, *19*(12), pp. 20034-2005. http://www.mdpi.com/1420-3049/19/12/20034/htm Datum pristupa: 20.1.2018.
12) Nicastro, H., Ross, S., and Milner J. (2015).Garlic and onions: Their cancer prevention properties. *Cancer Prev Res (Phila)*,8 (3) pp.181-189. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4366009/pdf/nihms655867.pdf Datum pristupa 20.1.2018.
13) https://www.plantea.com.hr/cesnjak/ Datum pristupa 20.1.2018.
14) Bradley, J., Organ, C., Lefer, D. (2016). Garlic-Derived Organic Polysulfides and Myocardial Protection. *The Journal of Nutrition*, 146 (3), pp. 403-409. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4725427/ Datum pristupa 22.1.2018.
15) Majewski M.(2014.) Allium sativum: Facts and myths regarding human health, *Rocz Panstw Zakl Hig,*65(1), pp 1-8.
16) http://lpi.oregonstate.edu/mic/food-beverages/garlic Datum pristupa 20.1.2018.
17) Sultana, S., et al. (2014.) Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,*15(11), pp. 4385-4394. http://journal.waocp.org/article_29255_5aea359ba0421b89c9419048ae1d5ddf.pdf Datum pristupa: 25.1.2018.
18) Mahdavifar, N., et al. (2016.) Epidemiology, Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with the Development Index in the World. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,* 17(1), pp.381-386. http://journal.waocp.org/article_31858_f64d286c22c44d073718f93812b35134.pdf Datum pristupa: 15.12.2017.
19) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470003/ Datum pristupa: 15.1.2018.
20) Desai, A. G, et al. (2008.).Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. *NIH-PA Author Manuscript,* Published in final edited form as: Curr Drug Metab. 2008 September ; 9(7), pp.581–591. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160808/pdf/nihms606544.pdf Datum pristupa: 25.1.2018.
21) Bayan, L., Koulivand, P. H, Gorji, A. (2014.) Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Aviccena Journal of Phytomedicine,* 4(1), pp. 1-14.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj je istraživanja ispitati potencijalno citotoksično djelovanje polisulfida, spojeva izoliranih iz biljne vrste *Allium spp*., na humane karcinomske stanice mokraćnog mjehura (UM-UC-3) i glioblastoma (LN229). Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica, nakon izlaganja polisulfidima, 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 polisulfidimai 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 mjehura svi polisulfidi ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL, pri različitim vremenima inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju dialil disulfid i dipropil trisulfid pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

Kod stanica glioblastoma većina polisulfida najjači citotoksični učinak ima pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL,pri različitim vremenima inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju dialil disulfid i dipropil trisulfid pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

Zaključci:

In vitro izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (UM-UC-3) i glioblastoma (LN229) polisulfidima dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak ovisan je o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje polisulfida nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak polisulfida, 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 polysulfides, a chemical substance isolated from the *Allium spp.* family of plants on human carcinoma cells of urinary bladder (UM-UC-3) and glioblastoma (LN229). The assumption is that after the exposure of carcinoma cells to polysulfides 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 polysulfides 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 polysulfides show better effects in higher concentrations of 50 μg/mL and 100 μg/mL, with different incubation times. The most prominent effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by diallyl disulfide and dipropyl trisulfide at the concentration of 100 μg/mL after 72-hour incubation time.

In glioblastoma cells most polysulfides have the strongest effect in higher concentrations of 50 μg/mL and 100 μg/mL, with different incubation times. The most significant effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by diallyl disulfide and dipropyl trisulfide at the concentration of 100 μg/mL after 72-hour incubation time.

Conclusions:

In vitro exposure of urinary bladder carcinoma cells (UM-UC-3) and glioblastoma (LN229) to polysulfides leads to reduced cell survival rate. Cytotoxic effects depend on incubation time and concentration. Polysulfides effect is not always proportional to the increase in concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurs. The cytotoxic effect of polysulfides 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: Ana Polunić

Datum rođenja: 14.11.1993.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Matoševa 1, 21000 Split

e-mail: ana.polunic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- **2000. – 2008.** Osnovna škola „Spinut", Split, Republika Hrvatska
- **2008. – 2012.** „III. Gimnazija", Split, Republika Hrvatska
- **2012. – 2018.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

RADNO ISKUSTO:

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

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