

Indukcija programirane stanične smrti djelovanjem odabranih izotiocijanata

Žeravica, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:171:447177>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

ANTONELA ŽERAVICA

**INDUKCIJA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI
DJELOVANJEM ODABRANIH IZOTIOCIJANATA**

DIPLOMSKI RAD

**Akadska godina:
2020./2021.**

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

Split, listopad 2021.

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 odobrena na 70. sjednici Vijeća studija Farmacije, 8. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 5. sjednici Vijeća Medicinskog fakulteta.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

INDUKCIJA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI DJELOVANJEM ODABRANIH IZOTIOCIJANATA

Antonela Žeravica, broj indeksa 186

Cilj istraživanja je bio dokazati citotoksični i apoptotički učinak izotocijanata (ITC): 2-metoksifenila, 4-(metilsulfanil)fenila i 4-nitrofenila na staničnim linijama trostruko-negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 i karcinoma mokraćnog mjehura T24. Pretpostavka je da će se nakon tretiranja stanica spojevima smanjiti postotak metaboličkih aktivnih stanica te da navedeni spojevi uzrokuju programiranu staničnu smrt ispitanih stanica. Ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama karcinoma dojke MDA-MB-231 i karcinoma mokraćnog mjehura T24 provedeno je MTT testom. Metabolička aktivnost stanica se određivala unutar 4, 24, 48 i 72 h inkubacije. Rezultati za test citotoksičnosti su prikazani grafovima na kojima su prikazan postotak metabolički aktivnih stanica u ovisnosti o koncentraciji spoja i vremenu izlaganja. Svi spojevi pokazuju najveću citotoksičnu aktivnost u koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL i u vremenu inkubacije od 72 h, a najbolju citotoksičnost pokazuje spoj 4-(metilsulfanil)fenil izotocijanat. Bolji citotoksični učinak izotocijanata je dokazan na staničnoj liniji T24. Nakon toga je ispitan učinak na apoptozu metodom protočne citometrije korištenjem Annexin-V/PI kita. Tretman stanica koncentracijama jednakim IC50 vrijednostima za 48 h inkubacije dokazao je da je mehanizam citotoksične aktivnosti za sva tri uzorka izotocijanata bio poticanje apoptoze. 2-metoksifenil ITC pokazuje najbolji učinak na poticanje apoptoze na staničnoj liniji MDA-MB-231. 4-nitrofenil ITC pokazuje najbolji učinak na poticanje apoptoze na staničnoj liniji T24.

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

Ključne riječi: izotocijanati, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda, protočna citometrija

Rad sadrži: 74 stranice, 48 slika, 5 tablica, 34 reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Mudnić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić, član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 21. 10. 2021.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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 at the 70th session of the Council of Pharmaceutical Studies, the 8th session of the Council of the Faculty of Chemical Technology and 5th session of the Council of the Faculty of Medicine.
Mentor: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić
Technical assistance: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić

INDUCTION OF PROGRAMMED CELL DEATH BY ACTION OF SELECTED ISOTHIOCYANATES

Antonela Žeravica, index number 186

The aim of the study was to demonstrate the cytotoxic and apoptotic effect of isothiocyanates (ITC): 2-methoxyphenyl, 4-(methylsulfanyl) phenyl and 4-nitrophenyl on MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell lines and T24 bladder cancer cell line. It is assumed that after treatment of cells with compounds, the percentage of metabolically active cells will decrease and that these compounds cause programmed cell death of the tested cells. Cytotoxicity testing on MDA-MB-231 breast cancer cell lines and T24 bladder cancer was performed by MTT assay. Metabolic activity of the cells was determined within 4, 24, 48 and 72 h of incubation. The results for the cytotoxicity test are shown by graphs showing metabolically active cells as a function of compound concentration and exposure time. All compounds showed the highest cytotoxic activity at concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL and at an incubation time of 72 h, and the best cytotoxicity was shown by the compound 4-(methylsulfanyl) phenyl ITC. A better cytotoxic effect of ITC was demonstrated on the T24 cell line. The effect on apoptosis was then examined by flow cytometry using the Annexin-V / PI kit. Treatment of cells with concentrations equal to IC50 values for 48 h of incubation proved that the mechanism of cytotoxic activity for all three isothiocyanate samples was the induction of apoptosis. 2-methoxyphenyl ITC shows the best effect on inducing apoptosis on the MDA-MB-231 cell line. 4-nitrophenyl ITC shows the best effect on inducing apoptosis on the T24 cell line.

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

Keywords: isothiocyanates, cancer, cytotoxicity, MTT assay, flow cytometry

Thesis contains: 74 pages, 48 pictures, 5 tables, 34 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assoc. prof. Ivana Mudnić, MD, PhD, chair person
2. Assis. prof. Nikolina Režić Mužinić, PhD, member
3. Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, member - supervisor

Defence date: 21. 10. 2021.

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

Zahvala

Velike zahvale mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš-Čulić na posvećenom vremenu i trudu u izradi ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se mojoj obitelji što su me ohrabrivali ovih pet godina, pružali mi podršku i pomoć u svakom trenutku školovanja. Njima posvećujem svoj rad.

Hvala i mojim prijateljima, kolegama s fakulteta koji su ovo vrijeme studiranja učinili lakšim i zabavnijim.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 TUMOR.....	2
1.2 KARCINOM	3
1.3 ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI	5
1.4 APOPTOZA	7
1.5 KARCINOM DOJKE.....	9
1.5.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA.....	9
1.5.2 PATOHISTOLOGIJA I ODREĐIVANJE STADIJA BOLESTI	10
1.5.3 SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	11
1.5.4 KLASIFIKACIJA.....	11
1.5.5 LIJEČENJE	14
1.6 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA	15
1.6.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA.....	15
1.6.2 PATOHISTOLOGIJA	15
1.6.3 SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA	16
1.6.4 KLASIFIKACIJA.....	16
1.6.5 LIJEČENJE	20
1.7 IZOTIOCIJANATI.....	20
1.7.1 IZOTIOCIJANATI.....	20
1.7.2 PROTUUPALNO I ANTIMIKROBNO DJELOVANJE	21
1.7.3 KEMIJSKA STRUKTURA SPOJEVA	22
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	24
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1 STANIČNE LINIJE	27
3.2 TEST CITOTOKSIČNOSTI	29
3.3 TEST APOPTOZE	30
3.4 PROTOČNA CITOMETRIJA	32
4. REZULTATI.....	34
4.1 MDA-MB-231 stanice.....	35
4.1.1 MTT TEST	35
4.1.2 TEST APOPTOZE	37

4.2	T24 STANICE.....	45
4.2.1	MTT TEST	45
4.2.2	TEST APOPTOZE	48
5.	RASPRAVA	56
6.	ZAKLJUČAK	61
7.	LITERATURA.....	63
8.	SAŽETAK.....	67
9.	SUMMARY	69
10.	ŽIVOTOPIS	71

1. UVOD

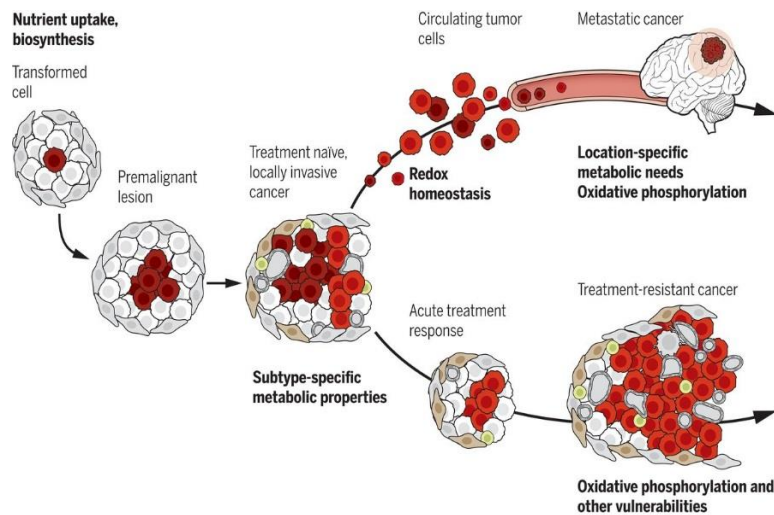
1.1 TUMOR

Novotvorine su patološke tvorbe nastale prekomjernom proliferacijom nenormalnih stanica. Drugi im je naziv neoplazma (*neos* - nov, *plasia* - rast) ili tumori (*tumor* – oteklina). Za zloćudne tumore rabi se izraz rak. Razlikujemo dobroćudne i zloćudne novotvorine. Dobroćudni (benigni) tumori ne ugrožavaju bitno zdravlje i imaju povoljniji klinički ishod (oštro ograničeni od normalnog tkiva). Zloćudni ili maligni tumori imaju nepovoljan klinički ishod, te ako se ne liječe mogu djelovati pogubno i uzrokovati smrt bolesnika. Oni rastu mnogo brže od benignih tumora, nepravilnog su oblika i neoštih rubova, metastaziraju u okolna tkiva. Ne nalikuju na stanice tkiva ili organa iz kojih je tumor nastao. Omjer između jezgre i citoplazme povećan je u korist jezgre (1).

Najbitnije značajke su brzi rast, izbjegavanje kontrole proliferacije, izbjegavanje stanične smrti i sposobnost repliciranja izvan granica koje su u normalnim stanicama te sposobnost da potaknu rast krvnih žila koje im osiguravaju stalnu opskrbu kisikom i hranjivim tvarima (slika 1). Rak je jedan od prvih uzroka smrti u svijetu. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) predviđa da će do 2030. godine biti više od 21 milijuna novih slučajeva raka i više od 13 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom (2).

Tumori su uzrokovani interakcijom između faktora okoliša (karcinogeni) i individualne (genetičke) predispozicije. Njihov disbalans dovodi do razvoja novih genskih promjena koje rezultiraju nekontroliranim rastom stanica. Stoga, razlikujemo:

- 1.) Genski uvjetovane tumore
- 2.) Tumori uzrokovani egzogenim kemijskim ili fizikalnim kancerogenima
- 3.) Tumori uzrokovani virusima (3)



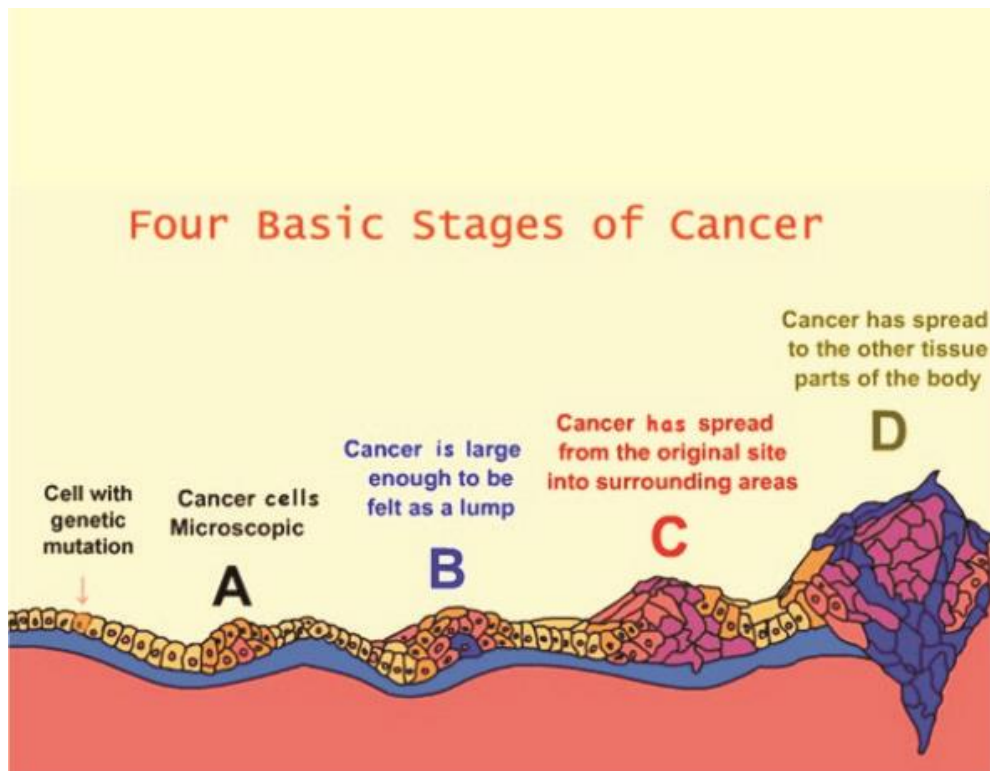
Slika 1. Metabolička evolucija tijekom progresije tumora

Preuzeto sa: <https://science.sciencemag.org/content/368/6487/eaaw5473>

Datum preuzimanja: 15.08.2021.

1.2 KARCINOM

Maligni epitelni tumori nazivaju se karcinomima. Većinom zadržavaju neke značajke epitela iz kojeg su nastali te se zbog toga zovu karcinomi pločastog epitela, karcinomi prijelaznog epitela mokraćnog mjehura ili urotelni karcinomi. Maligni tumor žljezdanog podrijetla jest adenokarcinom (nastaju od stanica probavnog ili dišnog sustava, endometrija, jajnika, epitelnih dijelova dojke). Zloćudni tumori solidnih organa nose nazive organa u kojima su nastali, npr. hepatocelularni karcinom. Karcinomi su invazivni tumori koji se razvijaju postupno iz preinvazivnih promjena u pločastom ili žljezdanom epitelu iz kojeg tumor potječe (4). Postoje četiri faze progresije tumora (slika 2).



Slika 2. Četiri faze progresije tumora

Preuzeto sa: <http://genesismagz.com/health-9-cancer-symptoms-to-keep-an-eye-on/>

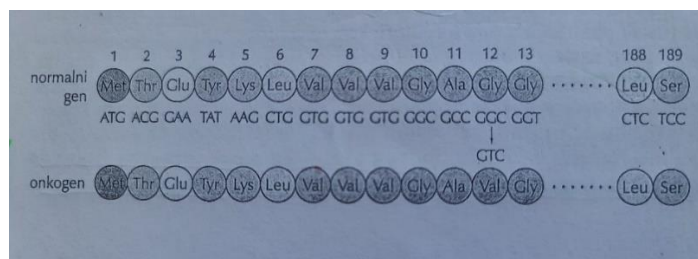
Datum preuzimanja: 15.08.2021.

1.3 ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI

Normalni stanični geni od kojih potiču onkogeni zovu se protoonkogeni. Važni su regulacijski geni koji često kodiraju proteine koji sudjeluju u putevima prijenosa signala kojima se kontrolira proliferacija normalnih stanica (npr. *ras*, *src*, *raf*). Onkogeni su nenormalno eksprimirani ili mutirani oblici odgovarajućih protoonkogenata. Onkogeni dovode do nenormalne proliferacije stanica i tumora. Ekspresija onkogenata jača je od ekspresije protoonkogenata (5).

U razvoju raka postoje dvije vrste regulatornih gena: jedni koji potiču rast tumorskih stanica, zovu se onkogeni, i drugi koji djeluju obrnuto tj. potiskuju rast, supresorski geni. Ovi geni kodiraju nuklearne i citoplazmatske proteine, receptore faktora rasta, faktore rasta, prijenosnike signala i ostale glasnike. Kompletan slijed kontrole staničnog rasta ima nekoliko stupnjeva, a počinje vezanjem faktora rasta koji ulazi u stanicu ili se za receptor veže van stanične membrane. Nakon toga receptor djeluje izravno ili neizravno preko G proteina i drugog glasnika tako da započinje fosforilaciju (aktivaciju) unutarstaničnog proteina. Taj aktivirani protein reagira na više načina, ali se na kraju veže izravno na DNA ili nastaje kompleks s proteinima koji vežu DNA; tako se pokreće ekspresija gena potrebnih za pokretanje diobe stanica. Inaktivacijom transkripcijskih čimbenika koji počinju sintezu DNA ili inaktivacijom molekula koje su aktivirali onkogeni, pristupi su na koje stanica suprimira razvoj karcinoma (6).

Onkogeni koji se najčešće susreću u ljudskim tumorima su porodice gena *ras* (*rasH*, *rasK* i *rasN*). Njih nema u normalnim stanicama, od odgovarajućih protoonkogenata se razlikuju po zamjenama određenih aminokiselina na ključnim mjestima. Mutacije karakteristične za onkogene *ras* održavaju protein Ras konstitutivno u aktivnoj formaciji vezanim za GTP (inaktivan je vezan za protein GDP). Ovakvi onkogeni se aktiviraju točkastim mutacijama. Onkogen *erbB-2* koji kodira receptorsku protein-tirozin kinazu, povezan je s brzim rastom karcinoma dojke i jajnika (7).

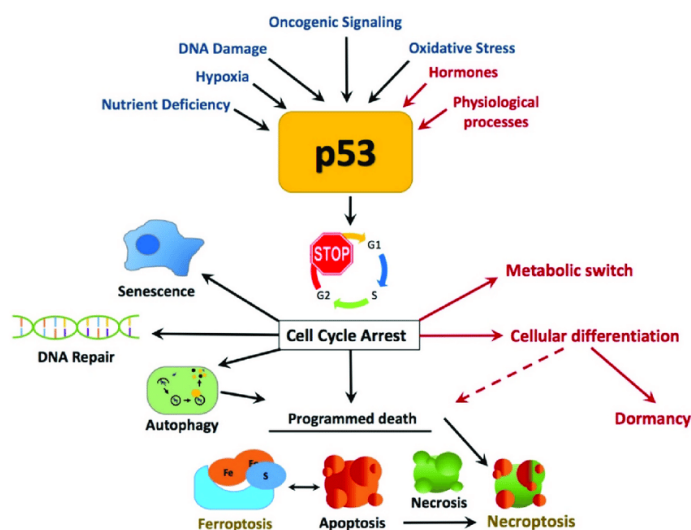


Slika 3. Točkaste mutacije u onkogenima *ras*.

Preuzeto iz: Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

Datum preuzimanja: 15.08.2021.

Tumor supresorski geni normalno inhibiraju staničnu proliferaciju i nastanak tumora. U mnogim tumorima su ti geni inaktivirani zbog čega prestaje njegova negativna regulacija proliferacije. Prvi otkriveni tumor supresorski gen bio je gen retinoblastoma (*RB*). Drugi važan tumor supresorski gen nazvan je *p53*, a djelovanje mu se, kao i za *Rb*, temelji na reakcijama s transkripcijskim čimbenicima i inhibicijom njihovog djelovanja (slika 4). Supresorski gen *p53* potreban je za zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu izazvanu oštećenjem DNA. *BRCA1* i *BRCA2* tumor supresorski geni u dojci djeluju kao stabilizirajući geni koji sudjeluju u popravljaju dvolančanih lomova DNA (8).



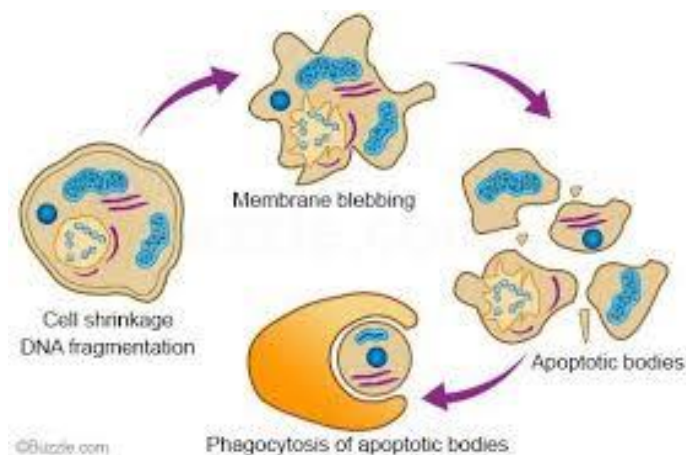
Slika 4. Djelovanje tumor supresorskog gena *p53*

Preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/p53-canonical-and-non-canonical-tumor-suppressor-roles-of-p53-is-activated-by-a_fig1_325657277

Datum preuzimanja: 15.08.2021.

1.4 APOPTOZA

Različito od slučajne smrti stanice koja nastaje kao posljedica akutne ozljede (nekroza), apoptoza (slika 5) je programirana stanična smrt, aktivni proces koji se zbiva kao niz različitih promjena u stanicama. Tijekom apoptoze kromosomska DNA je fragmentirana jer se događa kidanje između nukleosoma. Na kraju se i sama stanica skvrči i raspadne u komadiće s membranom koji se nazivaju apoptotička tjelešca. Makrofagi i susjedne stanice prepoznaju, fagocitiraju i uklanjaju takve stanice iz tkiva. Dva gena nužna za razvoj apoptoze su geni *ced-3* i *ced-4*. Treći gen, *ced-9* djeluje kao negativni regulator apoptoze. *Ced-4* potiče *ced-3*, a *ced-9* inhibira *ced-4*. Kodiranjem gena *ced-3* nastaju proteaze, kaspaze. Kaspaze su konačni efektori programirane smrti, jedna od ključnih meta kaspaza je inhibitor DNAze. Dodatno, kaspaze kidaju jezgrine lamine, uzrokujući fragmentaciju jezgre, citoskeletne proteine, što vodi ka raspadanju citoskeleta te proteine Golgijevog aparata, što uzrokuje raspadanje Golgijevog aparata. Inicijatorske kaspaze se aktiviraju kao odgovor na signale koji uzrokuju apoptozu te zatim aktiviraju i kidaju efektorske kaspaze, odgovorne za razgradnju ciljnih staničnih proteina. U stanica sisavaca glavna inicijatorska kaspaza (kaspaza-9) aktivira se vezanjem za Apaf-1 u kompleksu od više podjedinica nazvanih apoptosom. Za tvorbu tog kompleksa potreban je i citokrom c. Kad je tako aktivirana kaspaza-9, ona kida i aktivira efektorske kaspaze, kaspazu-3 i kaspazu-7 što dovodi do smrti stanice (9).



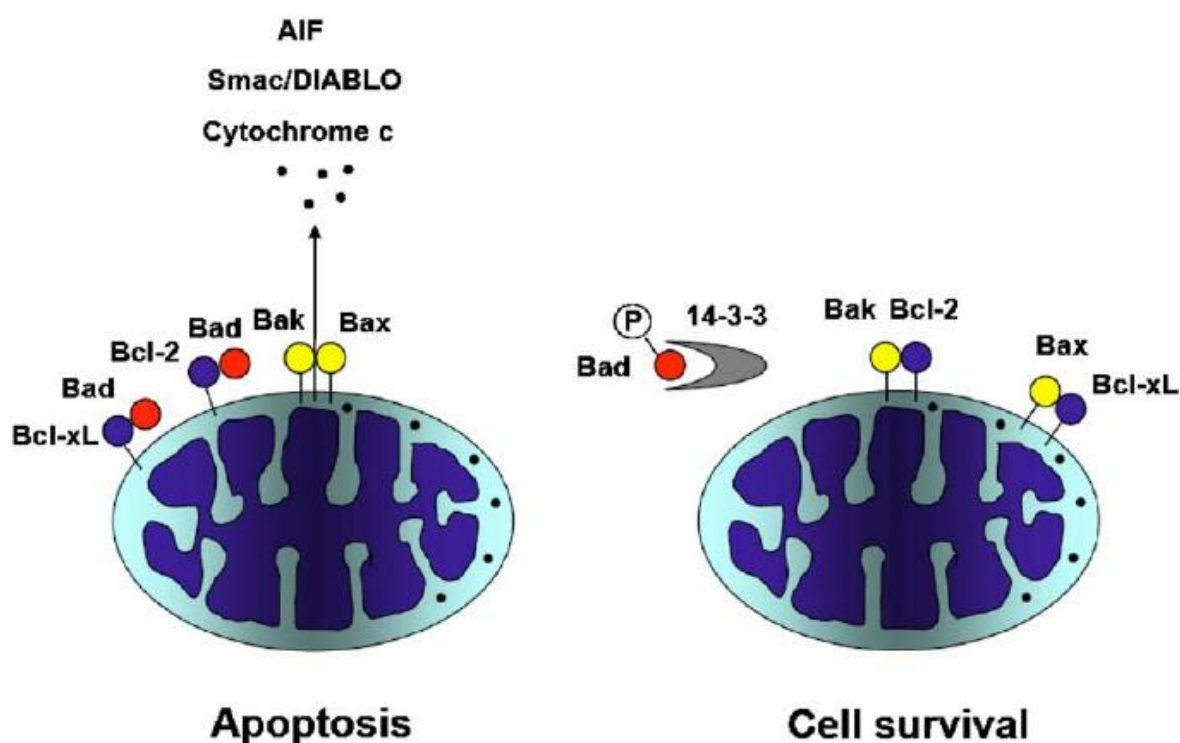
Slika 5. Proces apoptoze

Preuzeto sa: <https://biolozi.bio.bg.ac.rs/attachments/article/2827/Apoptoza%202016.pdf>

Datum preuzimanja: 15.08.2021.

Apoptoza može biti kontrolirana inhibitorima apoptoze (iAP) te proteinskim kompleksom Bcl-2. Kompleks Bcl-2 ima dvostruku ulogu (slika 6): može kočiti ili poticati apoptozu (10).

Život ili smrt stanice određena je ravnotežom aktivnosti proapoptotičkih i antiapoptotičkih članova porodice Bcl-2 koji se međusobno reguliraju. Bax i Bak proapoptotički članovi izravno induciraju apoptozu. Njih inhibiraju interakcije s antiapoptotičkim članovima porodice Bcl-2. iAP članovi porodice izravno stupaju u interakciju s kaspazama i koče apoptozu (11).



Slika 6. Funkcija porodice Bcl-2 proteina

Slika preuzeta sa: https://www.researchgate.net/figure/Function-of-Bcl-2-family-proteins-Named-after-the-founding-member-of-the-family-which_fig2_7844264

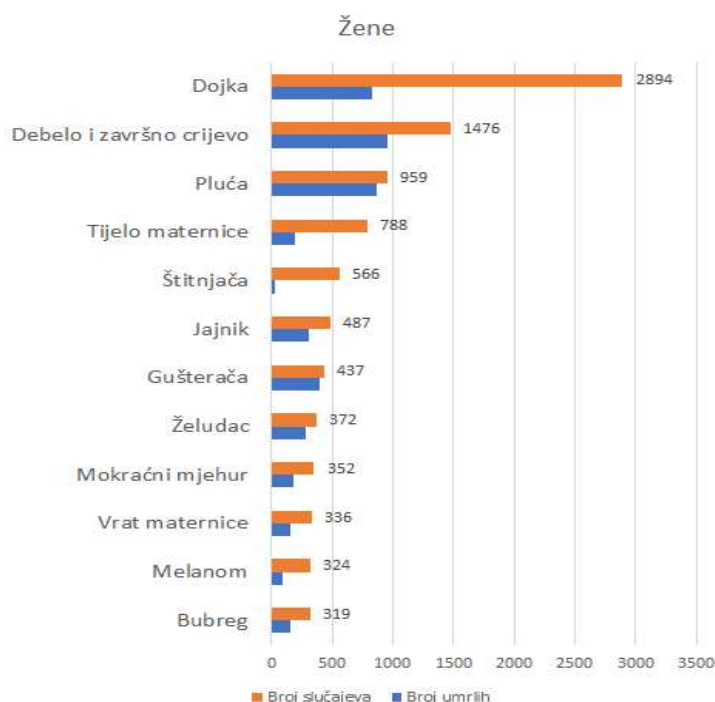
Datum preuzimanja: 17.08.2021.

1.5 KARCINOM DOJKE

1.5.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Rak dojke širom svijeta važan je uzrok ljudske patnje i prerane smrtnosti među ženama. U Sjedinjenim Državama, rak dojke čini najviše smrtnih slučajeva iza raka pluća. Različiti faktori rizika za rak dojke uključuju: rasu, etničku pripadnost, obiteljsku povijest raka i genetske osobine, također i modificiranu izloženost poput povećane konzumacije alkohola, tjelesne neaktivnosti, egzogenih hormona i drugih ženskih reproduktivni čimbenici. Ulazak u menarhu u mlađoj dobi, starija dob u prvoj trudnoći mogu utjecati na rizik od raka dojke dugoročnim učincima na razinu spolnih hormona ili drugim biološkim mehanizmima. Nedavna istraživanja dokazuju da trostruko negativni karcinomi dojke mogu imati različitu etiologiju. Stopa incidencije veća je u razvijenijim zemljama u usporedbi s manje razvijenijim zemljama, ali stopa smrtnosti je gotovo 17% viša u nerazvijenijim zemljama. Procjene preživljavanja unutar 5 godina kreću se od 12% u Africi, do gotovo 90% u Sjedinjenim Državama, Kanadi i Australiji (12).

Prema zadnjim istraživanjima provedenim za 2020.godinu, procijenjeno je da bi trebalo biti dijagnosticirano skoro 3000 novih slučajeva raka dojke što ovaj rak stavlja na treće mjesto po broju novooboljelih ukupno i na prvo mjesto, ako se gleda samo ženski spol (13).



Slika 7. Incidencija raka kod žena u Hrvatskoj

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

Datum preuzimanja: 17.08.2021.

1.5.2 PATOHISTOLOGIJA I ODREĐIVANJE STADIJA BOLESTI

Rak dojke nastaje iz epitela termalnih duktulo-lobularnih jedinica žljezdanog parenhima: žljezdanog parenhima, izvodnih kanalića ili žljezdanih lobula. Obzirom na klasifikaciju s bazalnom membranom, dijelimo ga na *in situ* karcinom (on ne probija bazalnu membranu) i invazivni karcinom (on probija bazalnu membranu). S obzirom na imunohistemijska i genetska obilježja, tumor dojke dijelimo na luminalni tumor tipa A (visoka razina estrogenskih i progesteronskih receptora, HER2- negativnost, Ki67 manji od 20%), tumore tipa B (razina progesteronskih receptora niža od 20%, HER2 pozitivnost, Ki-67 viši od 20%) te trostruko negativne (bez progesteronske, estrogenske i HER2 pozitivnost). Najgoru prognozu imaju tumori s trostruko negativnim obilježjima. Kod patohistološkog opisa raka dojke potrebno je navesti: veličinu tumora u dvije dimenzije, proliferativna aktivnost, stupanj zloćudnosti raka dojke (niski, srednji, visoki), status(pozitivnost) hormonskih receptora (estrogenih i

progesteronskih, negativnost povezana s lošijom prognozom), status (pozitivnost) HER2 receptora (pozitivan status HER2 3+ pokazuje lošiju prognozu), odnos tumora prema raznim rubovima kirurškog zahvata (14).

1.5.3 SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Rak dojke se većinom prepoznaje kao čvor u dojci. Javlja se i smečkasto-krvavi iscjedak, otekline, uvlačenje dojke, navlačenje kože i upala u području tumora. Ako obuhvati limfne čvorove, to je moguće vidjeti ili opipati. Kod uznapredovalih tumora, tumor obuhvaća dio ili cijelu dojku te se širi u područje limfnih čvorova. Posebno izgleda upalni tumor dojke, javlja se upaljena, crvena koža poput kore naranče, ta slika je posljedica širenja raka u limfna područja. Danas redovna kontrola dojke preko MR (magnetska rezonanca) pregleda, mamografije ili ultrazvuka može otkriti rak dojke u pretkliničkom stanju. Rak otkriven kao veći od 2 cm smatra se dijagnostički- preventivskim neuspjehom (15).

Simptomi raka dojke kvalificiraju se u 3 glavne skupine. Osnovna je kvržica na dojci. Druga skupina su ostali simptomi, a to su: bol u dojnama, abnormalnosti kože, bradavice. U treću skupinu spadaju ostali opći simptomi kao što su otežano disanje, umor, aksilarni simptomi, bol u leđima i/ili kvržice na vratu (16).

1.5.4 KLASIFIKACIJA

Stadiji karcinoma dojke određuju se prema TNM klasifikaciji (T – veličina primarnog tumora, N – raširenost bolesti u regionalne limfne čvorove i M – prisustvo udaljenih metastaza). TNM sustav omogućava liječnicima procijeniti ishod i prognozu bolesti. Općenito, tumori većih dimenzija te koji su zahvatili limfne čvorove, ujedno postojanje udaljenih metastaza (u druge organe) svrstava rak u viši stadij te kao takav ima lošiju prognozu (17).

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma dojke (18).

Tis (DCIS)	Duktalni karcinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Pagetova bolest bradavice nepovezana sa invazivnim karcinomom i/ili DCIS u podložećem parenhimu
T1	tumor ≤ 20 mm u najvećem promjeru
T1mi	tumor ≤ 1 mm u najvećem promjeru
T1a	tumor > 1 mm, ali ≤ 5 mm u najvećem promjeru
T1b	tumor > 5 mm, ali ≤ 10 mm u najvećem promjeru
T1c	tumor > 10 mm, ali ≤ 20 mm u najvećem promjeru
T2	tumor > 20 mm, ali ≤ 50 mm u najvećem promjeru
T3	tumor > 50 mm u najvećem promjeru
T4	tumor bilo koje veličine s direktnom invazijom stijenke prsnog koša i/ili kože (ulceracija ili makroskopski kožni čvorovi)
T4a	ekstenzija tumora na stjenku prsnog koša; invazija ili adherencija pektoralnog mišića u odsutnosti invazije struktura stijenke prsnog koša ne kvalificira se kao T4
T4b	ulceracija i/ili ipsilateralni makroskopski satelitski čvor i/ili edem (uključujući 'peau d'orange') kože, koji ne uključuje kriterije inflamiranog karcinoma
T4c	prisutni kriteriji T4a i T4b
T4d	inflamirani karcinom
Nx	ne može se procijeniti (nije uzet uzorak za PHD analizu)
N0	nije identificiralo metastazu u limfnim čvorovima ni ITC (eng. <i>isolated tumor cells</i>)
N0 (i+)	samo ITCs (nakupine malignih stanica ne veće od 0,2 mm) u regionalnim limfnim čvorovima

N0 (mol+)	pozitivan nalaz RT-PCR-om; nije se detektiralo ITCs
N1mi	mikrometastaze ($> 0,2$ mm, ali $\leq 2,0$ mm)
N1a	metastaze u 1 – 3 aksilarna limfna čvora, najmanje 1 metastaza $> 2,0$ mm
N1b	metastaza u ipsilateralne interne mamarne limfne čvorove čuvare, isključujući ITC
N1c	N1a i N1b
N2a	metastaza u 4 – 9 aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit $> 2,0$ mm)
N2b	metastaze klinički detektirane u internim mamarnim limfnim čvorovima, sa ili bez mikroskopske potvrde; s patološki negativnim aksilarnim limfnim čvorovima
N3a	metastaza u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit $> 2,0$ mm) ili metastaza u infraklavikularne limfne čvorove (razina III aksilarnih limfnih čvorova)
N3b	N1a ili N2a u prisutnosti N2b (slikovnim metodama pozitivni interni mamarni limfni čvorovi); ili N2a u prisutnosti N1b
N3c	metastaze u ipsilateralne supraklavikularne limfne čvorove
M0 (i+)	bez kliničkog ili radiološkog dokaza o postojanju metastaze, uz prisutnost depozita tumorskih stanica $< 0,2$ mm dokazanog mikroskopski ili molekularnim metodama
M1	metastaza dokazana klinički ili slikovnim metodama i/ili histološki dokazana metastaza $> 0,2$ mm

Kada se definira TNM status treba se definirati i stadij bolesti:

Tablica 2. Stadiji karcinoma dojke (18).

Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij IA	T1	N0	M0
Stadij IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	
Stadij IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	
	T2	NO	
Stadij IIB	T2	N1	M0
	T3	NO	
Stadij IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1,N2	
Stadij IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadij IIIC	Bilo koji T	N3	M0
Stadij IV	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

1.5.5 LIJEČENJE

Liječenje primarnog, lokalnog raka je operacijski zahvat kojim se uklanja cijela dojka ili samo dio dojke (poštedna operacija) te je ono praćeno određenom radioterapijom, ako je potrebno kemoterapijom. Patolozi tijekom zahvata pregledavaju limfni čvor čuvar. Ako je taj čvor zahvaćen tumorom, uklanja se, ako nije, ostaje. Nakon kirurškog zahvata se procjenjuje stadij bolesti, odnosno stupanj vjerojatnosti pojave lokalnog recidiva ili desiminacije raka dojke.

Adjuvantna radioterapija se odvija mjesec dana od kirurškog zahvata. Kod žena kod kojih postoji pozitivan nalaz hormonskih receptora, nakon kirurškog zahvata i radioterapije se provodi i hormonska terapija. U premenopauzalnih žena to je tamoksifen (SERM), a u postmenopauzalnih žena uzimaju se aromatazni inhibitori (letrozol, anastrozol, egzemestan) u trajanju 5-10 godina. Postoji i adjuvantna imunoterapija, kod žena koje su HER2 pozitivne i imaju tumor veći od 0,5 cm. Duljina preživljenja bolesnice s metastatskim rakom dojke ovisi o stupnju diseminacije bolesti, zahvaćenosti parenhimalnih organa, broju zahvaćenih organa, obilježjima tumora te o bolesničkom statusu i dobi (19).

1.6 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

1.6.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

U zapadnom svijetu rak mokraćnog mjehura četvrti je po učestalosti maligniteta kod muškaraca i osmi kod žena, češći je u muškaraca nego u žena. U Europi i Sjedinjenim Državama rak mokraćnog mjehura čini 5% do 10% svih zloćudnih bolesti kod muškaraca. Rizik od razvoja raka mokraćnog mjehura u dobi <75 godina je 2% do 4% za muškarce i 0,5% do 1% za žene (20).

Rak mjehura pojavljuje se u cijelom svijetu, a glavni čimbenici rizika su pušenje duhana i izloženost određenim kemikalijama u radnom okruženju. Pojavljuju se dokazi o interakcijama gena i okoliša, osobito vezanim za duhan i profesionalnu izloženost. U nekim populacijama stope incidencije opadaju, što se može povezati sa smanjenjem pušenja (21).

1.6.2 PATOHISTOLOGIJA

Karcinom mokraćnog mjehura dijeli na karcinom prijelaznog epitela, pločastih stanica, tumor malih stanica i adenokarcinom. Karcinomi prijelaznog epitela čine 90 do 95% svih slučajeva tumora. Ostali, koji nisu istoga podrijetla su: epitelni tumori (planocelularni karcinom, adenokarcinom), neuroendokrini tumori (karcinoid i neuroendokrini karcinom), neepitelni maligni tumori (sarkomi, melanom). Planocelularni karcinom drugi je prema učestalosti

maligni tumor urotakta. Obično je dobro diferenciran (60%) i pokazuje poprilično orožnjavanje. Prema učestalosti treći maligni tumor urotakta je adenokarcinom. 75% karcinoma mokraćnog mjehura su površinski karcinomi koji ne zalaze u mišićni sloj i zahvaćaju samo površinske slojeve unutarnje stjenke mokraćnog mjehura. Nažalost, 20% karcinoma mokraćnog mjehura su invazivni koji prodiru u mišićni sloj. Metastatski karcinom mokraćnog mjehura koji obično metastazira u limfne čvorove zdjelice, kostiju, jetre, nadbubrežnu žlijezdu i crijeva čini 5% tumora (22).

1.6.3 SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Najčešći simptom je hematurija (krv u mokraći), ako se ona javi bolesniku je potrebno napraviti intravensku urografiju i cistoskopiju. Ako cistoskopija potvrdi tumor, treba se raditi transuretralna resekcija te za potvrdu dijagnoze tumora u gornjem dijelu urotakta rade se retrogradna pijelografija te ureteroskopija. Kako bi provjerili metastazu, služimo se MSCT-om ili MR-om abdomena i zdjelice i RDG slikom pluća. Također, potrebno je provjeriti i koštani sustav (23).

Hematurija nije uvijek uzrokovana rakom mokraćnog mjehura već može biti uzrokovana i drugim uzrocima: rak bubrega, prostate, bubrežni kamenac i trauma. Povećana učestalost mokrenja, hitnost i disurija, manje su česti i pogađaju 30% bolesnika s rakom mokraćnog mjehura. Kasni znakovi i simptomi povezani s težim oblicima, s invazivnim ili metastatskim karcinomom mjehura uključuju edem, zadržavanje mokraće, bol u kostima, bol u zdjelici (24).

1.6.4 KLASIFIKACIJA

Procjenu proširenosti karcinoma izražavamo TNM- klasifikacijom Američkog združenog odbora za rak (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*). Postoje četiri stadija razvoja karcinoma mokraćnog mjehura (slika 8).

Tablica 3. TNM klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto sa <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>

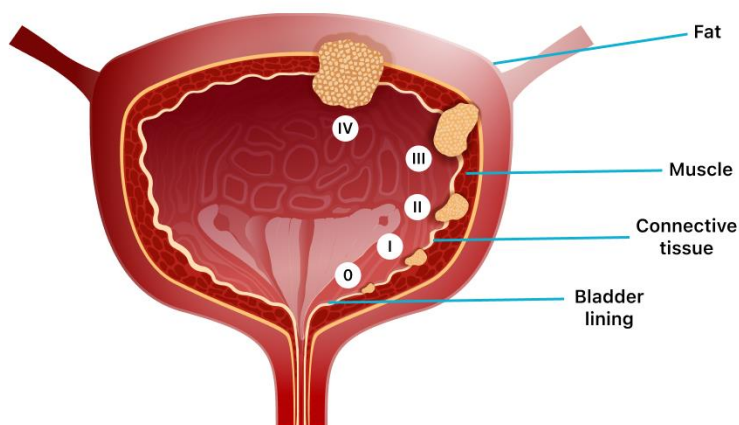
Datum preuzimanja: 14.09.2021.

Stadij	Grupa	Opis stadija
0a	Ta	Neinvazivni papilarni karcinom (Ta). Raste prema šupljem središtu mokraćnog mjehura, ali ne i u vezivno tkivo ili mišiće zida mokraćnog mjehura.
	N0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili udaljena mjesta (M0).
	M0	
0is	Cis	Neinvazivni karcinom (Tis), također poznat kao karcinom <i>in situ</i> (CIS). Karcinom raste samo u unutarnjem sloju.
	N0	Nije narastao prema unutra, prema šupljem dijelu mjehura, niti je rastao u vezivno tkivo ili mišiće zidova mjehura.
	M0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili udaljena mjesta (M0).
I	T1	Karcinom je narastao u sloj vezivnog tkiva ispod zida mokraćnog mjehura, ali nije narastao u sloj mišića u zidu mjehura (T1).
	N0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
	M0	
II	T2a ili T2b	Karcinom je narastao u unutarnji (T2a) ili vanjski (T2b) mišićni sloj zida mjehura, ali nije prošao do sloja masnog tkiva koji okružuje mjehur.
	N0	Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
	M0	
IIIA	T3a, T3b ili T4a	Karcinom je narastao kroz mišićni sloj mokraćnog mjehura i u sloj masnog tkiva koji okružuje mjehur (T3a ili T3b).
	N0	Možda je prošao u prostatu, maternicu ili vaginu, ali ne i u zdjelici ili trbušni zid (T4a).
	M0	

		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 prošao zid mokraćnog mjehura u zdjelicu ili trbušne zidove (T4b). Karcinom se nije proširio na obližnje limfne čvorove (N0) ili na udaljena mjesta (M0).
	ILI	

	Bilo koji T	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T).
	Bilo koji N	Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N).
	M1a	Proširio se na udaljeni skup limfnih čvorova (M1a).
IVB	Bilo koji T	Karcinom je možda ili nije narastao kroz zid mokraćnog mjehura u obližnje organe (bilo koji T).
	Bilo koji N	Možda se ili nije proširio na obližnje limfne čvorove (bilo koji N).
	M1b	Proširio se na 1 ili više udaljenih organa (kosti, jetra ili pluća) (M1b).

Stages of Bladder Cancer



Slika 8. Stadiji tumora mokraćnog mjehura

Preuzeto sa: <https://thekolkatamail.com/guest-blog-all-you-need-to-know-about-bladder-cancer/>

Datum preuzimanja: 14.09.2021.

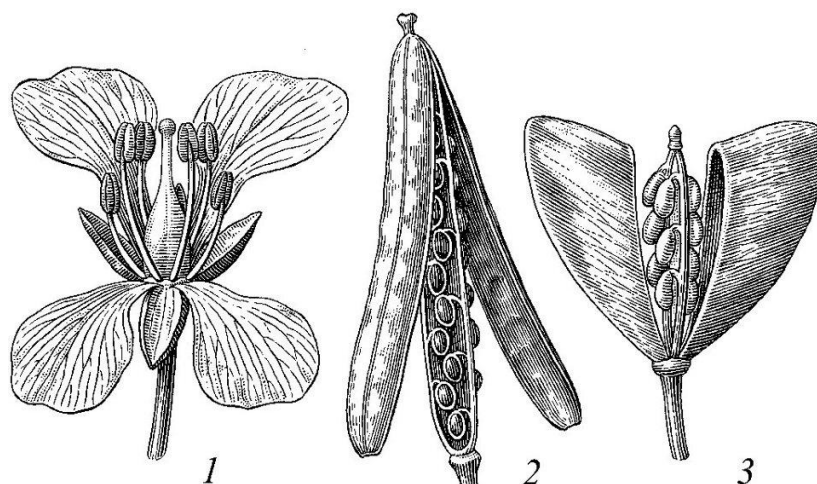
1.6.5 LIJEČENJE

Liječenje površinskog raka jest transuretralna endoskopska resekcija, a nakon resekcije potrebno je u tromjesečnim intervalima ponavljati cistoskopiju, ako je potrebno i imunoterapiju ili kemoterapiju. Kod mišićno-invazivnog raka mokraćnog mjehura koristi se radikalna cistektomija s mogućom kemoterapijom ovisno o stanju bolesnika. U određenih bolesnika se radi kemoiradijacija (usporedna aplikacija radioterapije i kemoterapije temeljene na cisplatini) u svrhu očuvanja mokraćnog mjehura. Metastatska bolest se liječi kemoterapijom i imunoterapijom, od citostatika se koriste: cisplatin, metotreksat, vinblastin, doksorubicin, gemcitabin. Prva linija je kombinacija cisplatine i gemcitabina. U slučaju prisutnih koštanih presadnica primjenjuju se bisfosfonati. Palijativna radioterapija se može primijeniti i zbog zaustavljanja krvarenja iz mokraćnog mjehura. Terapija raka prijelaznog epitela gornjeg dijela urotrakta je nefroureterektomija. Uznapredovali slučajevi se liječe kemoterapijom temeljenoj na cisplatini (25).

1.7 IZOTIOCIJANATI

1.7.1 IZOTIOCIJANATI

Izotiocijanati su najzastupljeniji sekundarni metaboliti u krstašicama (slika 9). Nastaju enzimatskom hidrolizom glukozinolata (GL) enzimom mirozinaza. Kada dođe do oštećenja biljnog tkiva uzrokovanim usitnjavanjem, mirozinaza dolazi u kontakt sa GL i utječe na njihovu hidrolizu i proizvodnju izotiocijanata. Opća kemijska formula izotiocijanata je $R-N=C=S$. Spojevi su jake arome, jakog okusa, hlapljivi su i nastaju pri neutralnom pH. Različita količina ITC nastaje ovisno o načinu primjene. Izotiocijanati su vrlo toksični te se zbog toga smatraju pogodnim kandidatima za pesticidnu aktivnost te su izrazito reaktivni spojevi. Poznato je da ITC imaju brojne učinke na ljudsko zdravlje osobito tijekom redovite konzumacije jestivih dijelova povrća iz porodice *Brassicaceae* bogatih GL. Dokazano je da imaju povoljno djelovanje na kardiovaskularni i središnji živčani sustav, infekcije s *Helicobacter pylori* i *E. coli* te pomažu u obnovi kožne barijere (26).



Slika 9. Cvijet, plod komuška i komuščica (biljka krstašica)

Preuzeto sa: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=34206>

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

Rak mokraćnog mjehura značajan je zdravstveni problem zbog velike prevalencije, rizika od mortaliteta, morbiditeta. Epidemiološki dokazi ukazuju na to da je prehrana bogata povrćem krstašica, osobito brokulom, povezana s manjim rizikom od raka mjehura. Fitokemikalije u povrću krstašice, poput glukozinolata, koji se enzimski hidroliziraju u bioaktivne izotiocijanate, mogući su posrednici u djelovanju protiv raka. *In vitro* studije pokazale su inhibiciju staničnih linija raka mokraćnog mjehura, zaustavljanje staničnog ciklusa i indukciju apoptoze od strane izotiocijanata (27).

Sulforafan, jedan od izotiocijanata, se opsežno istražuje i u interesu je medicine zbog njegovih zdravstvenih prednosti. Pokazalo se da ovaj spoj može zaštititi od različitih vrsta raka, također može smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti te pomoći u autizmu i osteoporozi (28).

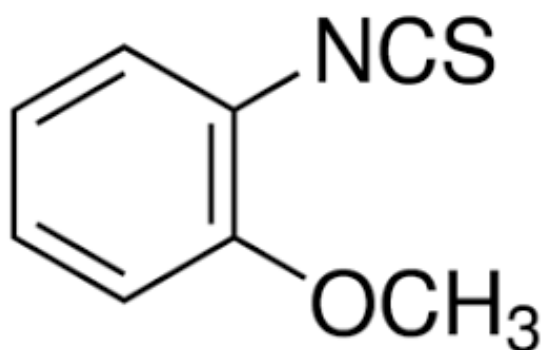
1.7.2 PROTUUPALNO I ANTIMIKROBNO DJELOVANJE

Upala potiče proliferaciju stanica, inhibira apoptozu te povećava rizik od razvoja raka. Feniletil izotiocijanat i sulfarafan smanjuju javljanje upalnih signalnih molekula iz leukocita; ovi spojevi smanjuju i vezanje DNA i NF- κ B, protuupalnog transkripcijskog faktora (29,30).

Izotiocijanati imaju antibakterijski učinak na neke bakterije, osobito je istaknuto antikancerogeno djelovanje na *Helicobacter pylori*, bakteriju koja je čest uzrok karcinoma želuca. Alil izotiocijanat uzrokuje oksidativni stres, oštećenje DNA i poticanje smrti stanica kod bakterija, a potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se otkrila druga djelovanja izotiocijanata kao antibakterijskih tvari. Osim djelovanja protiv bakterija, dokazano je djelovanje protiv određenih gljiva i protozoa, čiji se mehanizmi djelovanja također ispituju (31).

1.7.3 KEMIJSKA STRUKTURA SPOJEVA

2-METOKSIFENIL IZOTIOCIJANAT



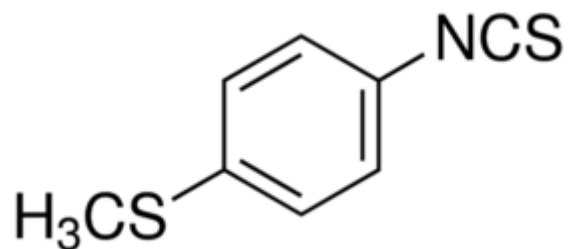
Slika 10. Struktura 2-metoksifenil ITC

Preuzeto sa: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/253707>

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

2-metoksifenil ITC pokazao je najbolju inhibiciju acetilkolinesteraze s IC₅₀ od 0,57 mM (32).

4-(METILSULFANIL)FENIL IZOTIOCIJANAT

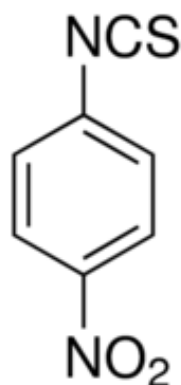


Slika 11. Struktura 4-(metilsulfanil)fenil ITC

Preuzeto sa: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/468509>

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

4-NITROFENIL IZOTIOCIJANAT



Slika 12. Struktura 4-nitrofenil ITC

Preuzeto sa: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/283541>

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je dokazati moguće citotoksično i apoptotičko djelovanje tri spoja izotiocijanata: 2MP (2-metoksifenil ITC), 4MSP (4-(metilsulfanil)fenil ITC), 4NP (4-nitrofenil ITC) na humanim staničnim linijama karcinoma.

Hipoteza o mogućoj citotoksičnosti i pokretanju procesa apoptoze ispitivat će se na stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231) te na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura T24.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 STANIČNE LINIJE

In vitro ispitivanje citotoksičnosti i procesa apoptoze spojeva izotiocijanata provelo se na staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231 i staničnoj liniji karcinoma mokraćnog mjehura T24. U tablicama se nalaze osnovni podaci o navedenim staničnim linijama.

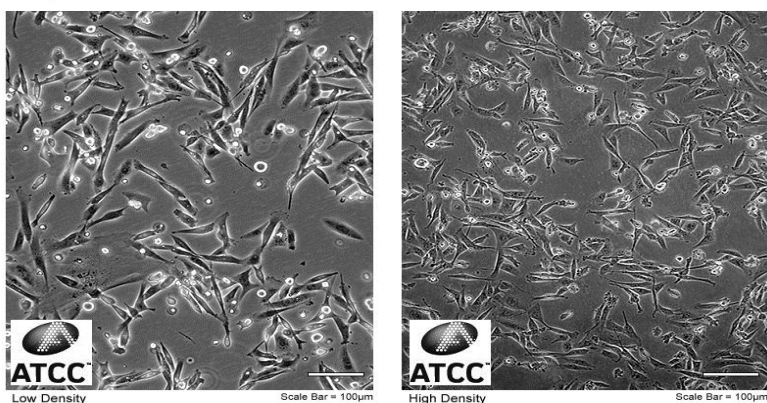
Tablica 4. Karakteristike stanične linije MDA-MB-231

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	mliječna žlijezda / dojka; izvađeno iz metastatskog mjesta: pleuralni izljev
Tip stanica	epitelne
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	adenokarcinom
Dob	51 godina
Spol	žensko
Etnicitet	bijela rasa
Primjena	ova stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju.
Uvjeti pohrane	parna faza tekućeg dušika

ATCC Number: **HTB-26**™
Designation: **MDA-MB-231**



Slika 13. Stanice karcinomske linije MDA-MB-231

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

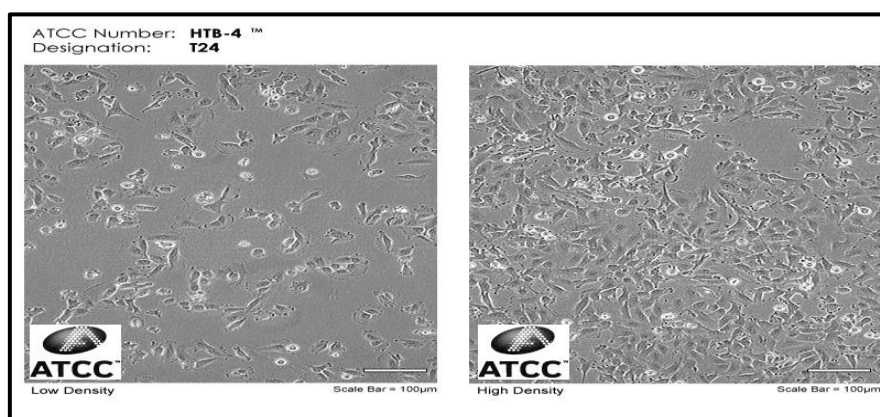
1

Tablica 5. Karakteristike stanične linije T24.

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-4.aspx>

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	Mokraćni mjehur
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznog epitela
Dob	81 godina
Spol	žensko
Etnicitet	bijela rasa
Primjena	ova stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju.



Slika 14. Stanice karcinomske linije T24

Preuzeto sa: www.lgcstandards-atcc.org

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

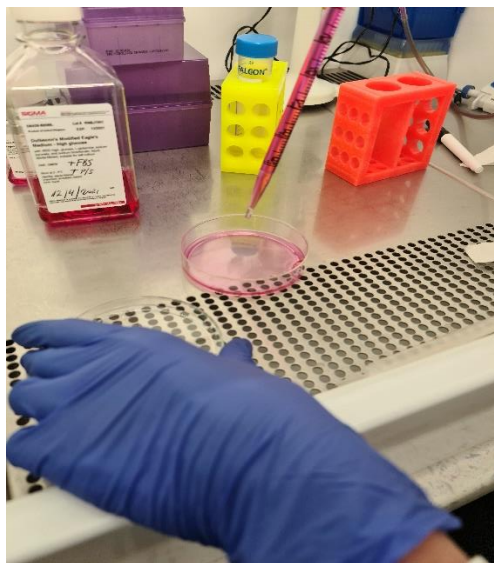
3.2 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Vitalnost stanica određena je mjerenjem staničnog metabolizma, korištenjem MTT metode. 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 spojeva jer mrtve stanice ne vežu MTT. Metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Intracelularni ljubičasti formazan koji nastaje može se izmjeriti spektrofotometrijski. Kako bismo mogli očitati apsorbanciju 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.

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

3.3 TEST APOPTOZE

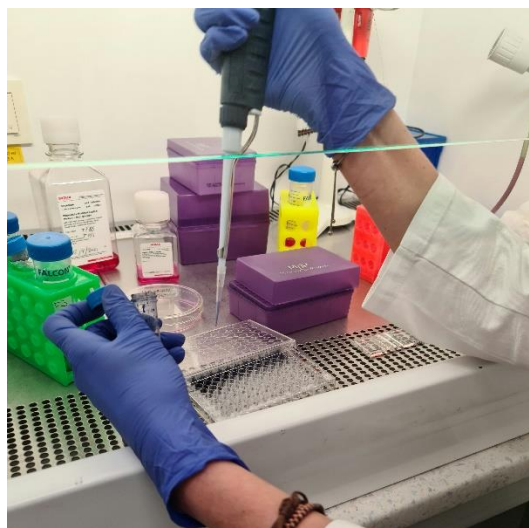
Stanice su se čuvale u tekućem dušiku te nakon odmrzavanja, uzgajale u DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mediju u inkubatoru na temperaturi od 37°C uz 5% CO₂. Medij sadrži glukozu, fenolno crvenilo, FBS (*fetal bovin serum*), aminokiseline, hranjive tvari. Kada medij promjeni boju iz crvene u narančasto- žutu, treba promijeniti medij jer su ga stanice prerasle.



Slika 15. Dodavanje DMEM hranjivog medija stanicama

Kada su stanice adherirale na površinu, uklanjamo DMEM, dodajemo tripsin koji mijenja oblik stanicama, odnosno cijepa peptidne veze i omogućava odvajanje stanica od podloge i njihovo presađivanje.

Kako bi smo izbrojali stanice pod mikroskopom, 50 µl stanica miješamo s bojom Trypan Blue u omjeru 1:1. Trypan Blue boja mrtve stanice, a žive ostaju prozirne što nam omogućava da izbrojimo žive stanice. Zatim se jednak broj stanica presađuje u 6 jažica u 3 replikata, vraćaju se u inkubator na 24 sata da se uhvate za podlogu.



Slika 16. Dodavanje boje Trypan Blue stanicama

Nakon 24 sata isisamo medij sa stanica te stanice tretiramo sa spojevima izotiocijanata u koncentracijama koje su određene kao IC50 koncentracije MTT testom; 2MP: 80 $\mu\text{g/mL}$, 4MSP: 34 $\mu\text{g/mL}$ i 4NP: 82 $\mu\text{g/mL}$ na stanicama karcinoma dojke i u koncentracijama 2MP: 12 $\mu\text{g/mL}$, 4MSP: 11 $\mu\text{g/mL}$ i 4NP: 16 $\mu\text{g/mL}$ za stanice karcinoma mokraćnog mjehura. Stanice vraćamo na 48 sati u inkubator. U tri jažice koje nam predstavljaju kontrolu dodajemo samo medij.



Slika 17. Stanice tretirane izotiocijanatima

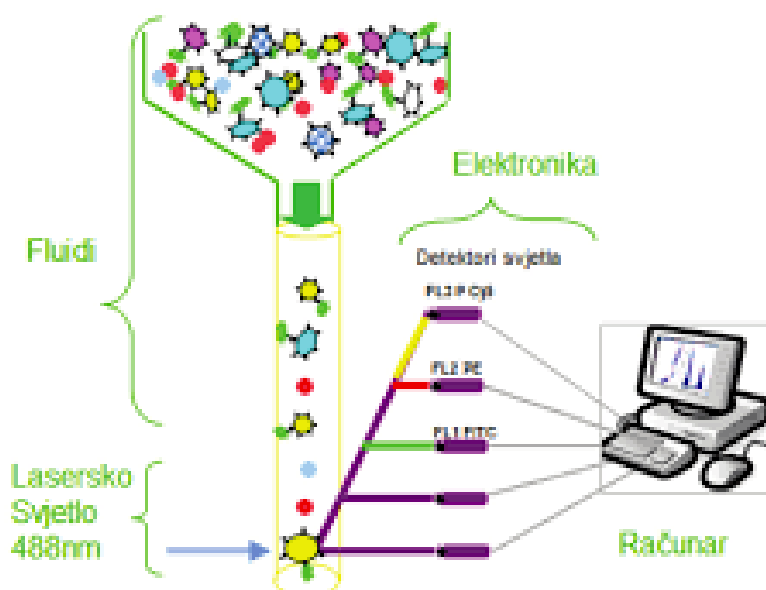
Nakon 48 sati stanice tretirane spojevima se vade iz inkubatora te se ispituje njihova apoptoza. Usisava se medij stanica, stanice se odvajaju od podloge tripsinom te se tretiraju fosfatnim puferom (PBS), centrifugiraju se, zatim se resuspendiraju u 100 μ l pufera za vezanje koji sadrži kalcij, te je dodan mix od 15 μ l Annexin V-FITC (fluorescein izotiocijanat) i propidij jodida (PI) (Annexin V FITC-Apoptoza Detection Kit I, BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Stanice su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, a zatim se analiziraju protočnim citometrom (BD Accuri C6, BD Biosciences). Postotak apoptotskih stanica je izražen kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, čija je vrijednost postavljena kao 100%.

Fosfolipidi se prebacuju s unutarnje na vanjsku stranu membrane u procesu apoptoze. Annexin V se veže na fosfatidilserin koji je negativno nabijen, a za vezanje je potreban kalcij. PI se selektivno veže unutar stanice, na nukleinske kiseline kad je zbog apoptoze stanična membrana postala propusna. Kombinacija bojanja Annexin V konjugiranim s FITC-om i PI omogućuje razlikovanje između živih stanica (Annexin-V-/PI-), rane (AnnexinV+/ PI-) i kasne (Annexin-V+/PI+) apoptoze stanica.

3.4 PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočna citometrija je kvantitativna metoda za određivanje apoptoze, s tim da je dovoljan malen broj stanica u ispitivanom uzorku. Za citometrijsko određivanje se koriste različite stanične promjene počevši od plazmolize stanice preko aktivacije kaspaze, gubitka mitohondrijskoga membranskog potencijala, aktivacije endogenih endonukleaza, sve do gubitka integriteta stanice i formiranja apoptotskih tijela.

Rezultati se dobivaju pomoću prednjeg i bočnog svjetlosnog snopa zajedno s rezultatima analize staničnih markera, tj. specifičnih fluorescentnih protutijela za pojedine apoptotske molekule kao što su Bcl-2, p53, Fas, FasL.



Slika 18. Protočna citometrija

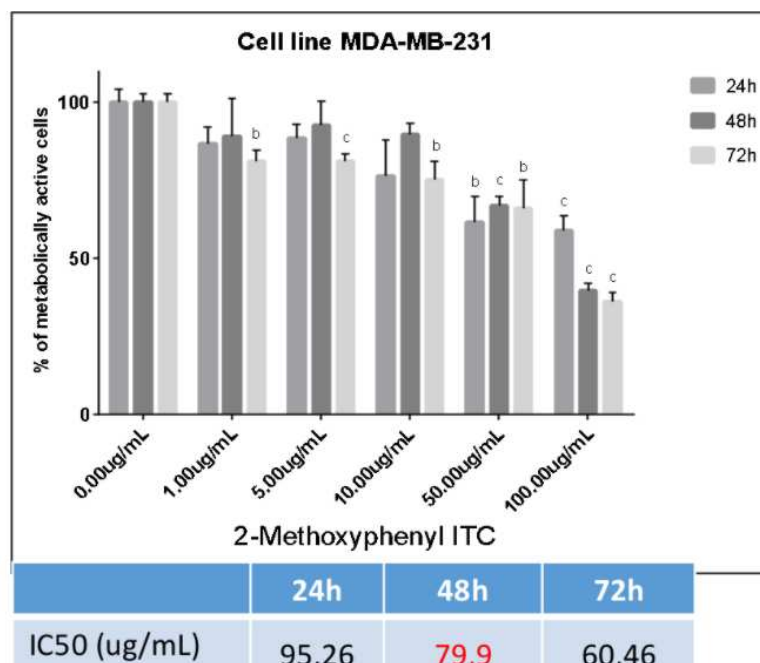
Preuzeto sa: https://www.researchgate.net/profile/Jasenko-Karamehic/publication/327955250_PROTOCNA_CITOMETRIJA

Datum preuzimanja: 15.09.2021.

4. REZULTATI

4.1 MDA-MB-231 stanice

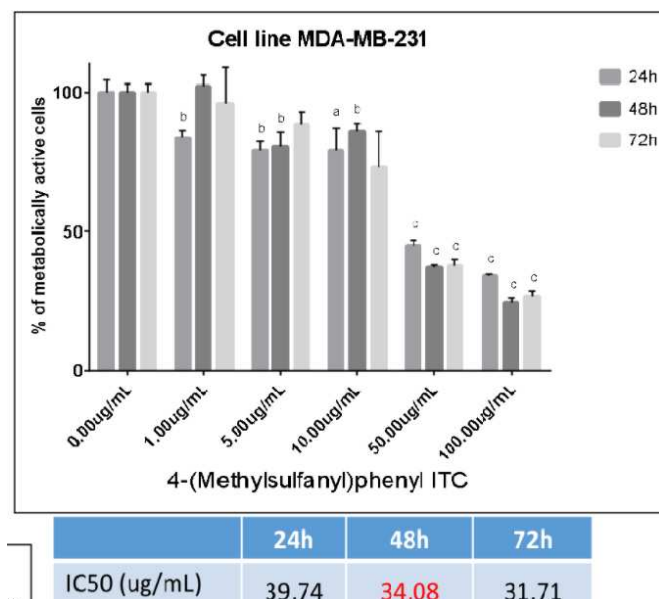
4.1.1 MTT TEST



Slika 19. Citotoksična aktivnost 2-metoksifenil ITC na staničnoj liniji MDA-MB-231

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001; IC50, koncentracija spoja pri kojoj je 50% stanica metabolički aktivno)

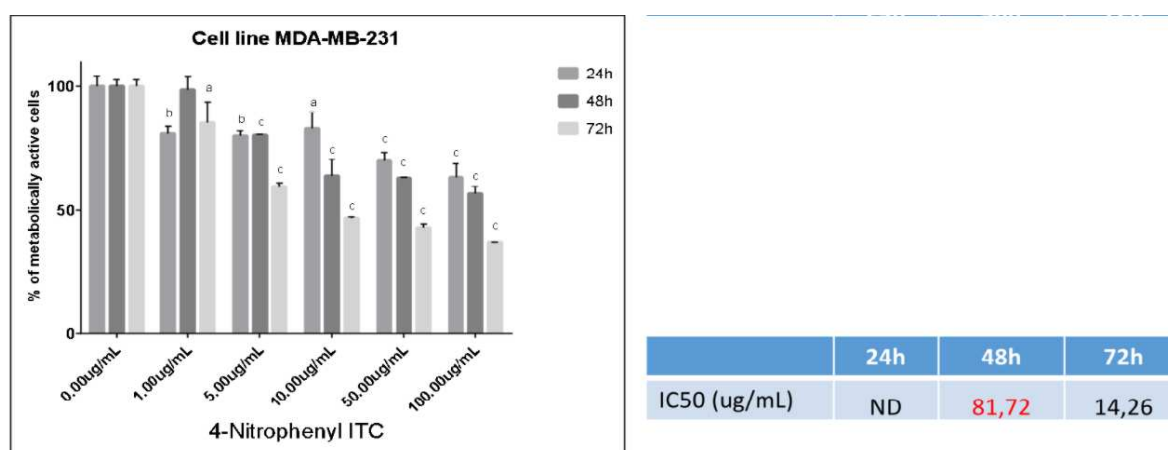
2-metoksifenil ITC pokazuje značajniji citotoksični učinak nakon 48 h samo pri većim koncentracijama od 50 i 100 µg/mL, najveće smanjenje metabolički aktivnih stanica se događa pri koncentraciji od 100 µg/mL (IC50 vrijednost je 79,9 µg/mL). Ne pokazuje citotoksični učinak nakon 4 h inkubacije, dok nakon 24 h pokazuje slabiju citotoksičnost, potrebna je veća koncentracija spoja (IC50 vrijednost 95,26 µg/mL). Nakon 72 h inkubacije ovaj ITC pokazuje najveću citotoksičnost (IC50 vrijednost 60,46 µg/mL).



Slika 20. Citotoksična aktivnost 4-(metilsulfanil)fenil ITC na staničnoj liniji MDA-MB-231

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001; IC50, koncentracija spoja pri kojoj je 50% stanica metabolički aktivno)

4-(metilsulfanil)fenil ITC pokazuje značajniji citotoksični učinak nakon 48 h inkubacije pri većim koncentracijama od 50 i 100 µg/mL, najveće smanjenje metabolički aktivnih stanica je pri koncentraciji od 100 µg/mL (IC50 vrijednost 34,08 µg/mL). Ne pokazuje citotoksični učinak nakon 4 h inkubacije, dok nakon 24 h pokazuje slabiju citotoksičnost, potrebna je veća koncentracija spoja (IC50 vrijednost 39,74 µg/mL). Nakon 72 h pokazuje najbolju citotoksičnost (IC50 vrijednost 31,71 µg/mL).



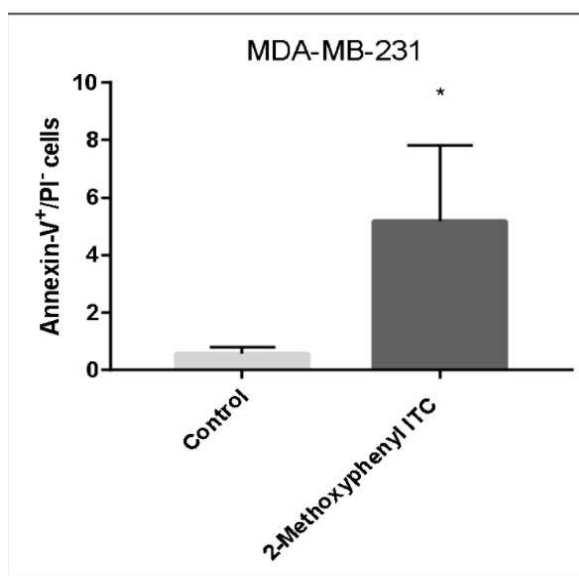
Slika 21. Citotoksična aktivnost 4-nitrofenil ITC na staničnoj liniji MDA-MB-231

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001; IC50, koncentracija spoja pri kojoj je 50% stanica metabolički aktivno)

4-nitrofenil ITC pokazuje značajniju citotoksičnost nakon 48 h inkubacije pri većim koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$, a najveće smanjenje metabolički aktivnih stanica je pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} vrijednost 81,72 $\mu\text{g/mL}$). Nakon 4 i 24 h inkubacije ne pokazuje citotoksičnu aktivnost, dok nakon 72 h ovaj ITC pokazuje najbolju citotoksičnost (IC_{50} vrijednost 14,26 $\mu\text{g/mL}$).

4.1.2 TEST APOPTOZE

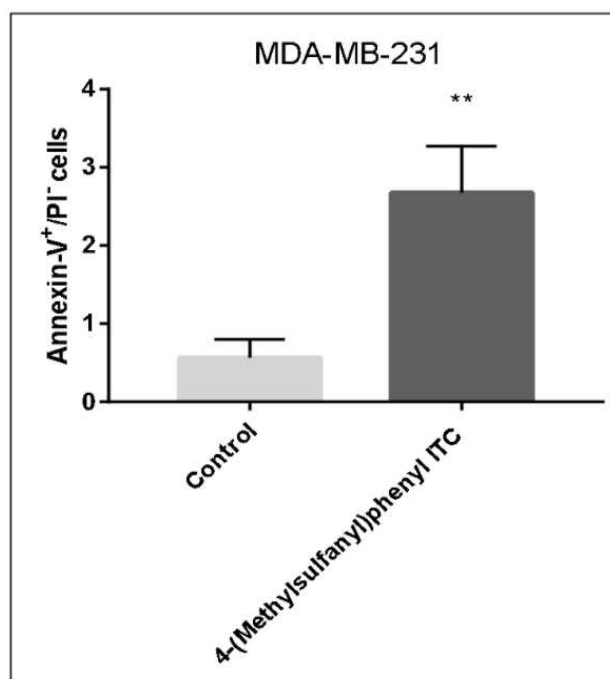
RANA APOPTOZA



RANA APOPTOZA			
2MP	2-Methoxyphenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,038	0,57	5,2

Slika 22. Utjecaj 2-metoksifenil ITC na ranu apoptozu stanične linije MDA-MB-231

(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

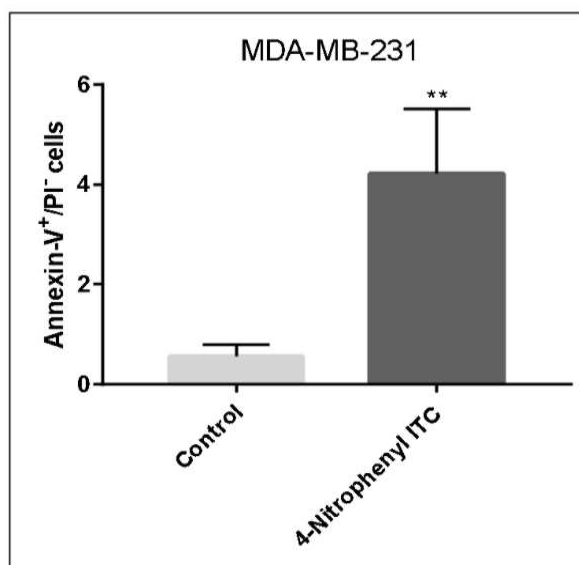


RANA APOPTOZA

4MSP	4-(Methylsulfonyl)phenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,00434	0,57	2,68

Slika 23. Utjecaj 4-(metilsulfanil)fenil ITC na ranu apoptozu stanične linije MDA-MB-321

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



RANA APOPTOZA

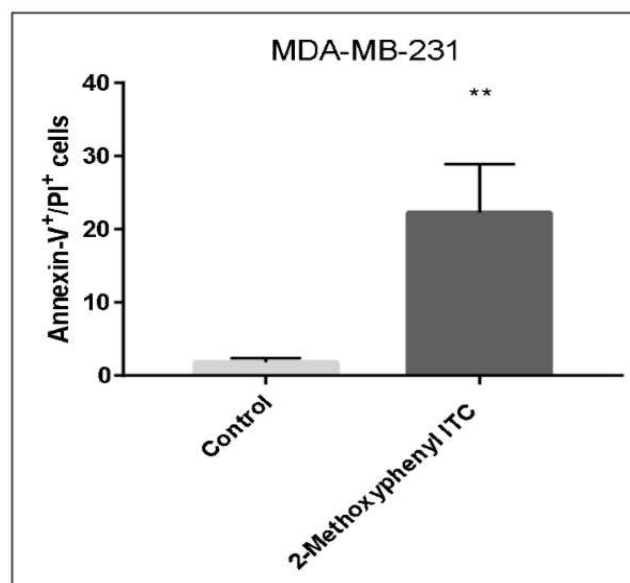
4NP	4-Nitrophenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,0087	0,57	4,22

Slika 24. Utjecaj 4-nitrofenil ITC na ranu apoptozu stanične linije MDA-MB-231

(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

2-metoksifenil ITC u IC₅₀ koncentraciji određenoj nakon 48 h inkubacije ima najveći učinak na povećanje postotka stanica (5,2) u ranoj apoptozi u odnosu na postotak kontrolnih stanica (0,57) stanične linije MDA-MB-231 ($P < 0.05$). Malo manji učinak na povećanje postotka stanica (4,22) u ranoj apoptozi, ali i dalje značajan s obzirom na kontrolne stanice (0,57) ima 4-nitrofenil ITC ($P < 0.01$). Dvostruko manji učinak od 2-metoksifenil ITC-a na postotak stanica (2,68) u ranoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice (0,57) ima 4-(metilsulfanil)fenil ITC ($P < 0.01$).

KASNA APOPTOZA

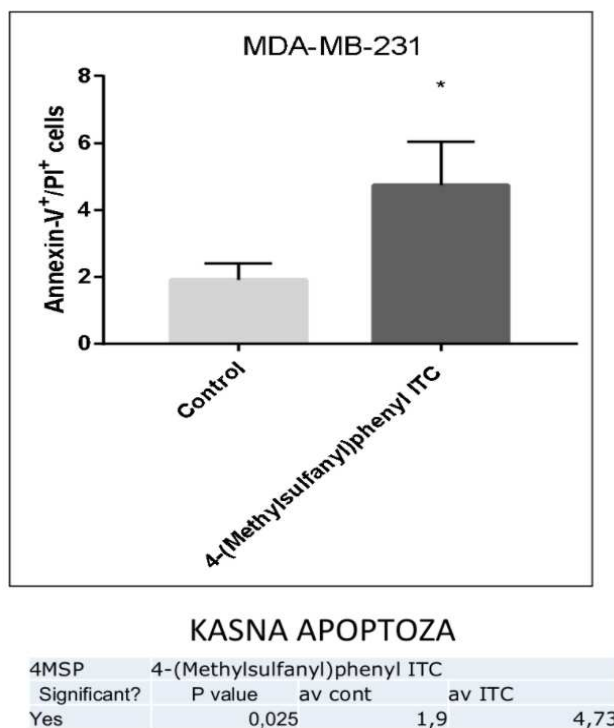


KASNA APOPTOZA

2MP	2-Methoxyphenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,0059	1,9	22,37

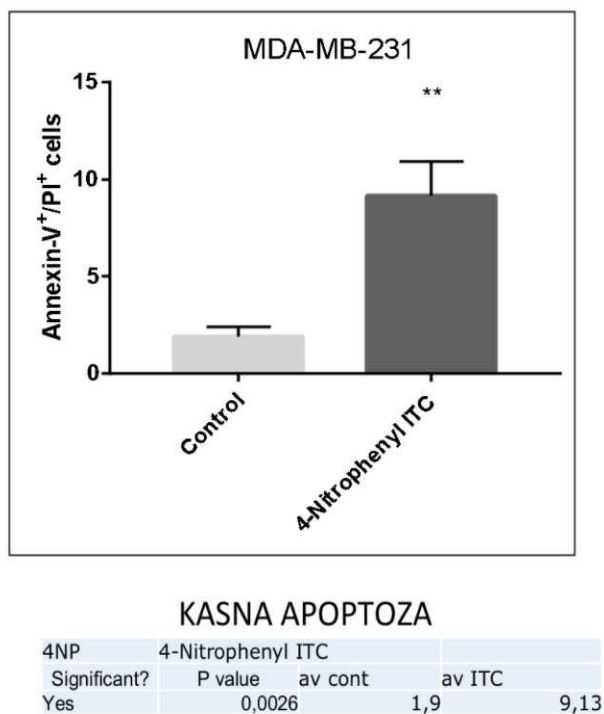
Slika 25. Utjecaj 2-metoksifenil ITC na kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



Slika 26. Utjecaj 4-(metilsulfanil)fenil ITC na kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)

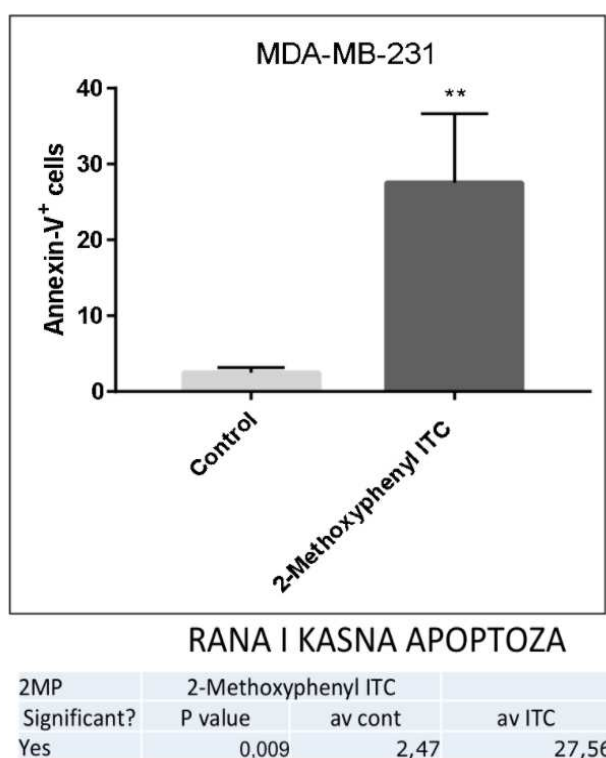


Slika 27. Utjecaj 4-nitrofenil ITC na kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)

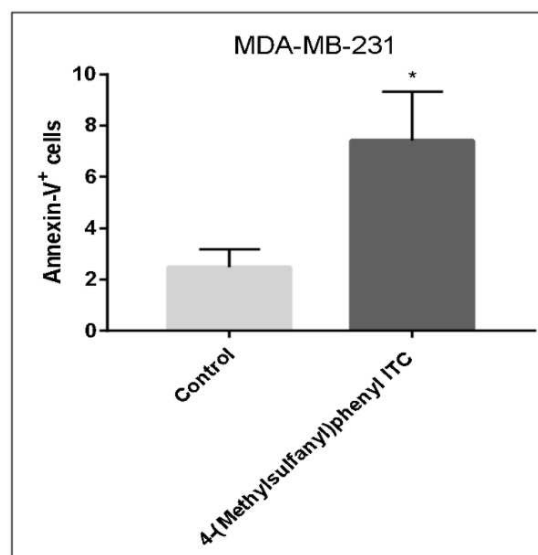
2-metoksifenil ITC u IC50 koncentraciji određenoj nakon 48 h inkubacije ima najveći učinak na povećanje postotka stanica (22,37) u kasnoj apoptozi u odnosu na postotak kontrolnih stanica (1,9) stanične linije MDA-MB-231 ($P < 0.01$). Više od dvostruko manjeg učinka na povećanje postotka stanica (9,13) u kasnoj apoptozi, ali i dalje značajan s obzirom na kontrolne stanice (1,9) ima 4-nitrofenil ITC ($P < 0.01$). Najmanji učinak na postotak stanica (4,73) u kasnoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice (1,9) ima 4-(metilsulfanil)fenil ITC ($P < 0.05$).

RANA I KASNA APOPTOZA



Slika 28. Utjecaj 2-metoksifenil ITC na ranu i kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231

(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

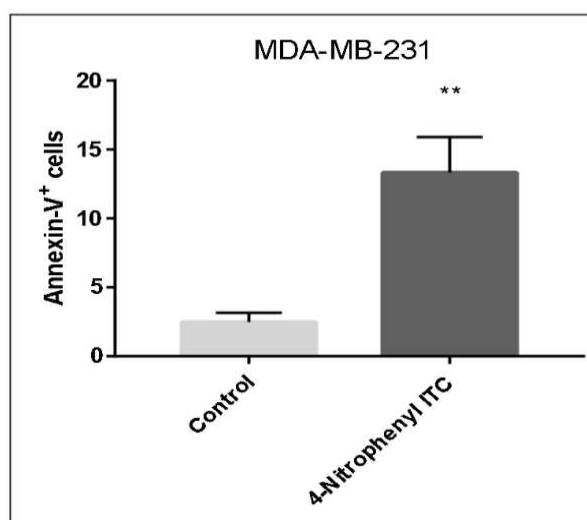


RANA I KASNA APOPTOZA

4MSP	4-(Methylsulfanyl)phenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,0136	2,47	7,41

Slika 29. Utjecaj 4-(metilsulfanil)fenil ITC na ranu i kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



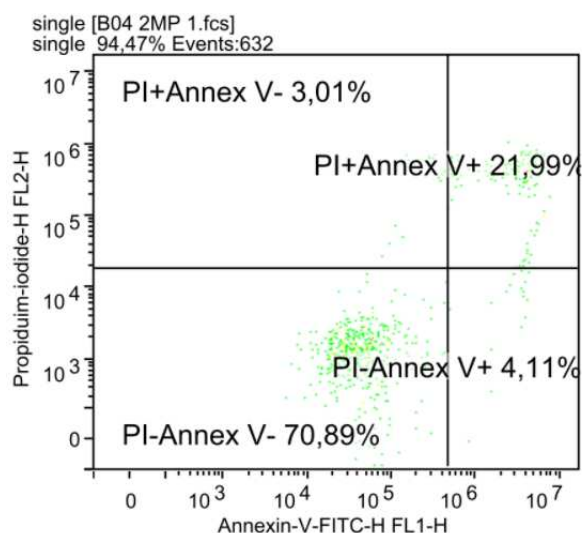
RANA I KASNA APOPTOZA

4NP	4-Nitrophenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,0022	2,47	13,35

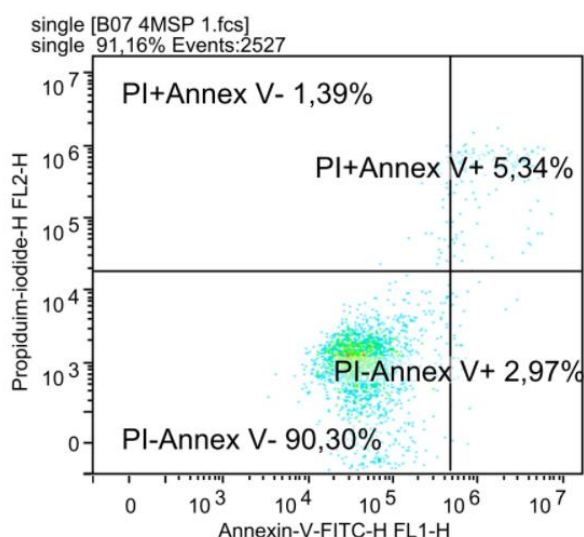
Slika 30. Utjecaj 4-nitrofenil ITC na ranu i kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)

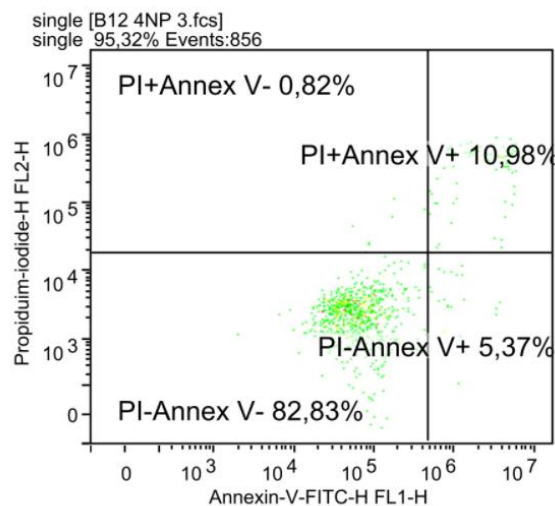
2-metoksifenil ITC u IC50 koncentraciji određenoj nakon 48 h inkubacije ima najveći učinak na povećanje postotka stanica (27,56 %) u ranoj i kasnoj apoptozi u odnosu na postotak kontrolnih stanica (2,47) stanične linije MDA-MB-231 ($P<0.01$). Dvostruko manji učinak na povećanje postotka stanica (13,35) u ranoj i kasnoj apoptozi, ali i dalje značajan s obzirom na kontrolne stanice (2,47) ima 4-nitrofenil ITC ($P<0.01$). Puno manji učinak od 2-metoksifenil ITC na postotak stanica (7,41) u ranoj i kasnoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice (2,47) ima 4-(metilsulfanil)fenil ITC ($P<0.05$).



Slika 31. Točkasti dijagram stanica tretiranih 2-metoksifenil ITC



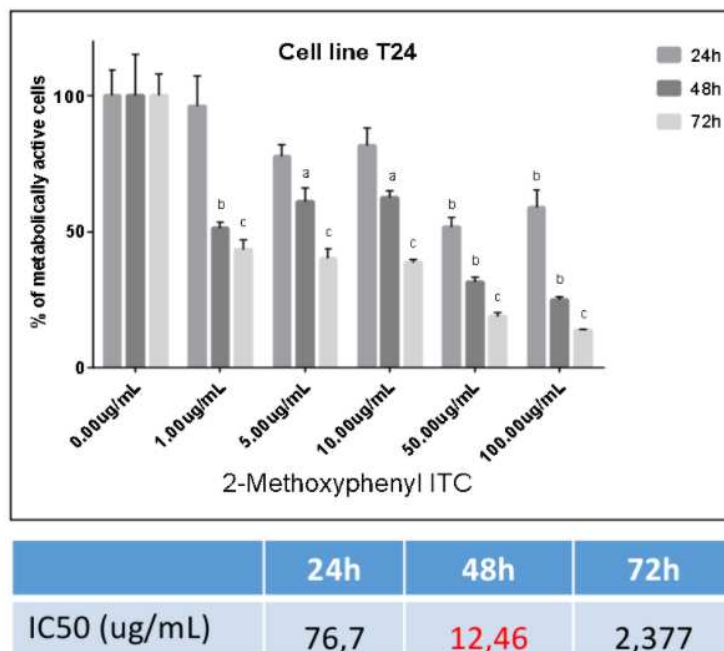
Slika 32. Točkasti dijagram stanica tretiranih 4-(metilsulfanil)fenil ITC



Slika 33. Točkasti dijagram stanica tretiranih 4-nitrofenil ITC

4.2 T24 STANICE

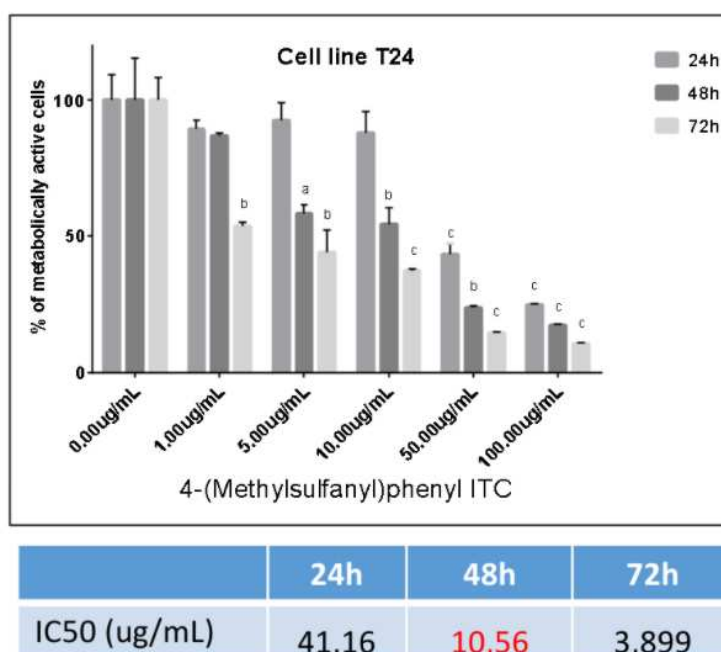
4.2.1 MTT TEST



Slika 34. Citotoksična aktivnost 2-metoksifenil ITC na staničnoj liniji T24

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001; IC50, koncentracija spoja pri kojoj je 50% stanica metabolički aktivno)

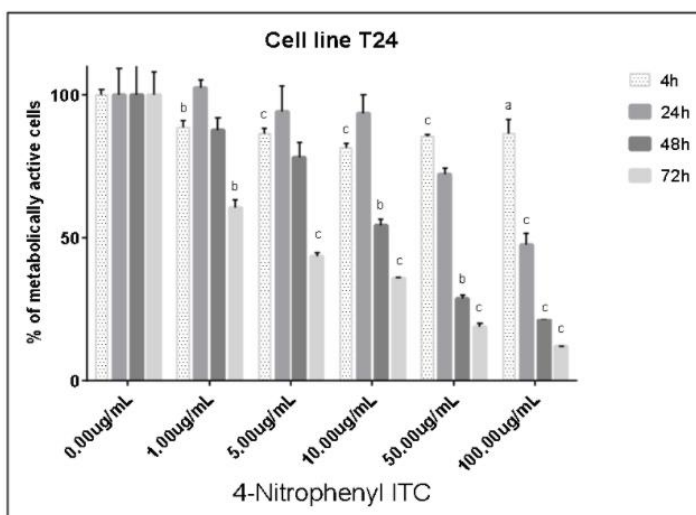
2-metoksifenil ITC pokazuje značajniji citotoksični učinak nakon 48 h inkubacije pri većim koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$, najveće smanjenje metabolički aktivnih stanica se događa pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ (IC₅₀ vrijednost 12,46 $\mu\text{g/mL}$). Nakon 24 h inkubacije pokazuje slabiju citotoksičnost, potrebna je veća koncentracija spoja (IC₅₀ vrijednost 76,7 $\mu\text{g/mL}$), a nakon 72 h pokazuje najveću citotoksičnost (IC₅₀ vrijednost 2,377 $\mu\text{g/mL}$).



Slika 35. Citotoksična aktivnost 4-(metilsulfanil)fenil ITC na staničnoj liniji T24

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001; IC₅₀, koncentracija spoja pri kojoj je 50% stanica metabolički aktivno)

4-(metilsulfanil)fenil ITC pokazuje značajniji citotoksični učinak nakon 48 h samo pri većim koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$, najveće smanjenje metabolički aktivnih stanica se događa pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ (IC₅₀ vrijednost 10,56 $\mu\text{g/mL}$). Ne pokazuje citotoksični učinak nakon 4 h inkubacije, dok nakon 24 h pokazuje slabiju citotoksičnost, potrebna je veća koncentracija spoja (IC₅₀ vrijednost 41,16 $\mu\text{g/mL}$). Nakon 72 h inkubacije ovaj ITC pokazuje najveću citotoksičnost (IC₅₀ vrijednost 3,89 $\mu\text{g/mL}$).



	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	ND	16,1	3,723

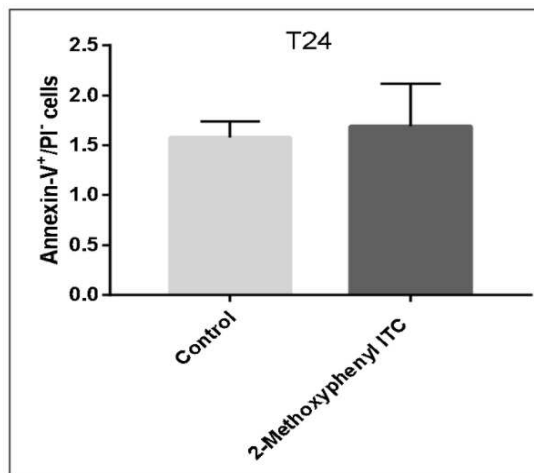
Slika 36. Citotoksična aktivnost 4-nitrofenil ITC na staničnoj liniji T24

(a, P vrijednost < 0.05; b, P vrijednost < 0.01; c, P vrijednost < 0.001; IC50, koncentracija spoja pri kojoj je 50% stanica metabolički aktivno)

4-nitrofenil ITC pokazuje značajniji citotoksični učinak nakon 48 h inkubacije pri većim koncentracijama od 50 i 100 µg/mL, najveće smanjenje metabolički aktivnih stanica se događa pri koncentraciji od 100 µg/mL (IC50 vrijednost 16,1 µg/mL). Nakon 4 i 24 h inkubacije ne pokazuje citotoksični učinak, a nakon 72 h inkubacije je pokazana najveća citotoksičnost (IC50 vrijednost 3,72 µg/mL).

4.2.2 TEST APOPTOZE

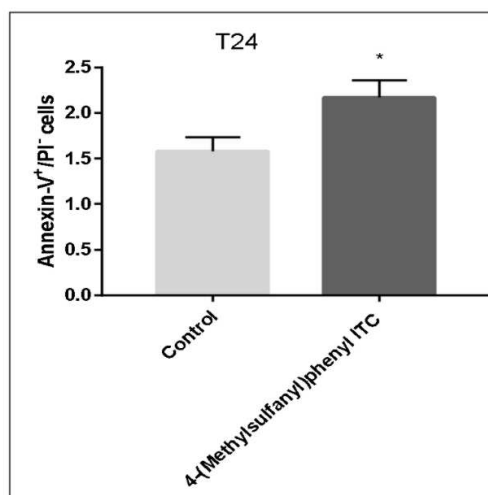
RANA APOPTOZA



RANA APOPTOZA			
2MP	2-Methoxyphenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,688	1,58	1,69

Slika 37. Utjecaj 2-metoksifenil ITC na ranu apoptozu stanične linije T24

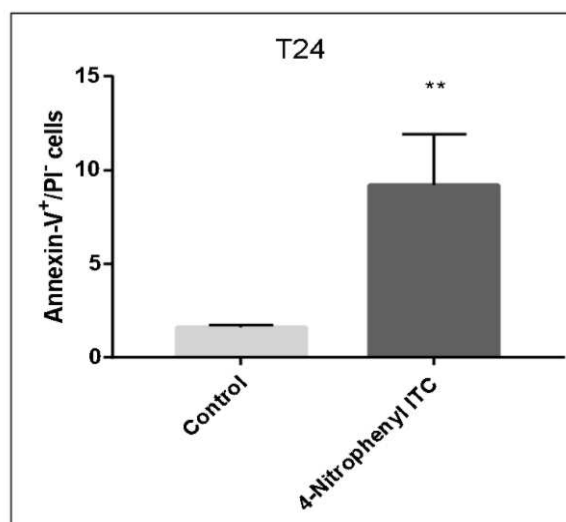
(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



RANA APOPTOZA			
4MSP	4-(Methylsulfonyl)phenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,015	1,58	2,17

Slika 38. Utjecaj 4-(metilsulfanil)fenil ITC na ranu apoptozu stanične linije T24

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



RANA APOPTOZA

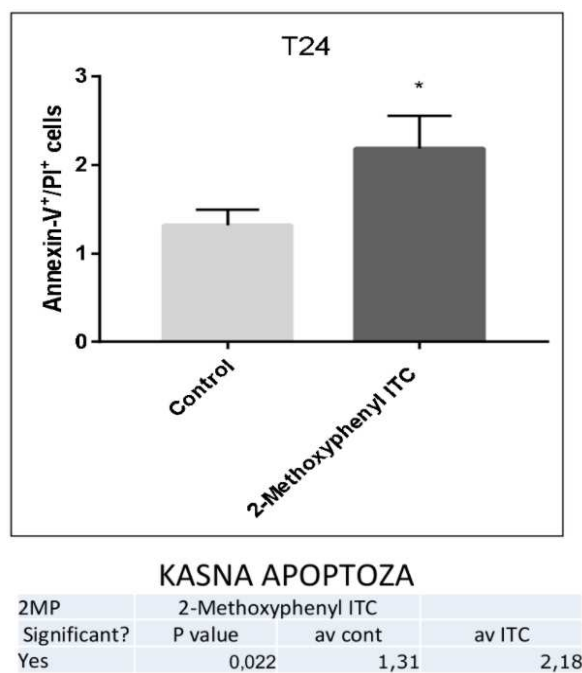
4NP	4-Nitrophenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	0,0085	1,58	9,2

Slika 39. Utjecaj 4-nitrofenil ITC na ranu apoptozu stanične linije T24

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)

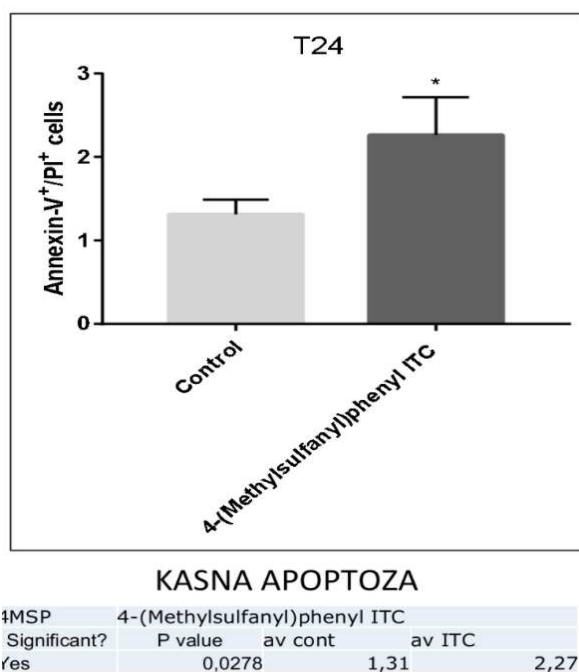
4-nitrofenil ITC u IC₅₀ koncentraciji određenoj nakon 48 h inkubacije ima najveći učinak na povećanje postotka stanica (9,2) u ranoj apoptozi u odnosu na postotak kontrolnih stanica (1,58) stanične linije T24 (P<0.01). Manji učinak na povećanje postotka stanica (2,17) u ranoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice (1,58) ima 4-(metilsulfanil)fenil ITC (P<0.05). Najmanji i beznačajni učinak na postotak stanica (1,69) u ranoj apoptozi s obzirom na postotak kontrolnih stanica (1,58) ima 2-metoksifenil ITC (P>0.05).

KASNA APOPTOZA



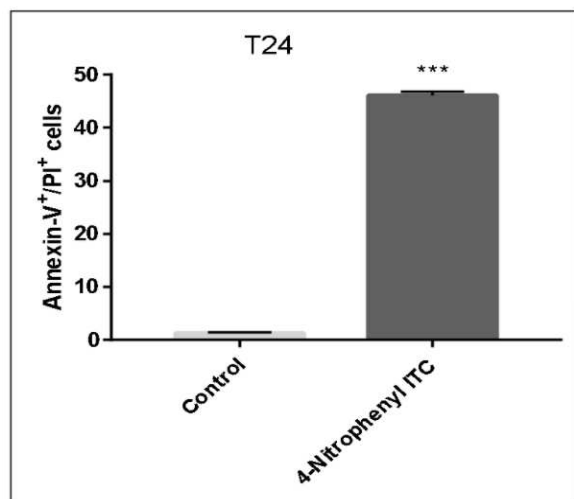
Slika 40. Utjecaj 2-metoksifenil ITC na kasnu apoptozu stanične linije T24

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



Slika 41. Utjecaj 4-(metilsulfanil)fenil ITC na kasnu apoptozu stanične linije T24

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



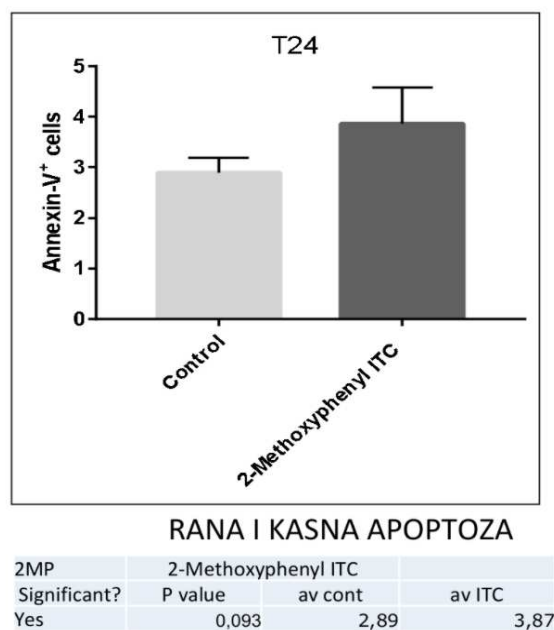
KASNA APOPTOZA			
4NP	4-Nitrophenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	3,5153E-08	1,31	42,13

Slika 42. Utjecaj 4-nitrofenil ITC na kasnu apoptozu stanične linije T24

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)

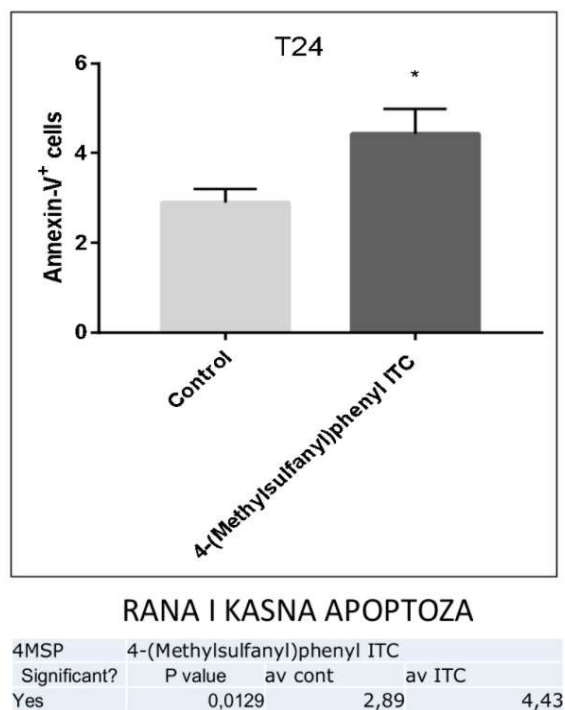
4-nitrofenil ITC u IC₅₀ koncentraciji određenoj nakon 48 h inkubacije ima najveći učinak na povećanje postotka stanica (42,13) u kasnoj apoptozi u odnosu na postotak kontrolnih stanica (1,31) stanične linije T24 (P<0.001). 4-(metilsulfanil)fenil ITC ima mali učinak (P<0.05) na povećanje postotka stanica (2,27) u kasnoj apoptozi, s obzirom na kontrolne stanice (1,31). Najmanji učinak na postotak stanica (2,18) u kasnoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice (1,31) ima 2-metoksifenil ITC (P<0.05).

RANA I KASNA APOPTOZA



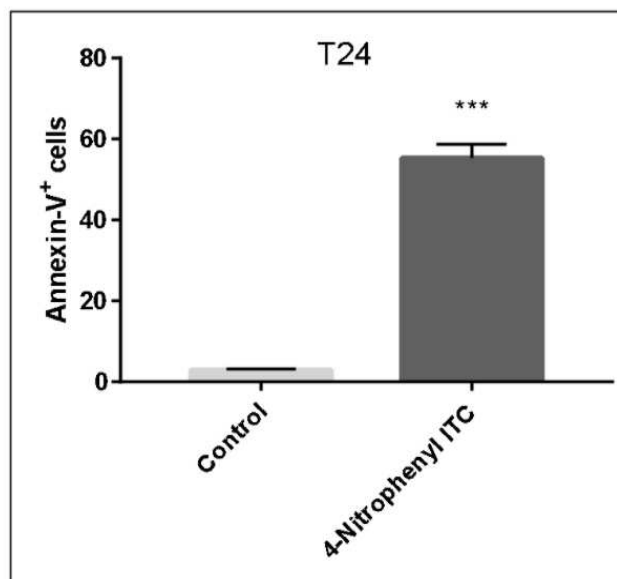
Slika 42. Utjecaj 2-metoksifenil ITC na ranu i kasnu apoptozu stanične linije T24

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



Slika 43. Utjecaj 4-(metilsulfanil)fenil ITC na ranu i kasnu apoptozu stanične linije T24

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)



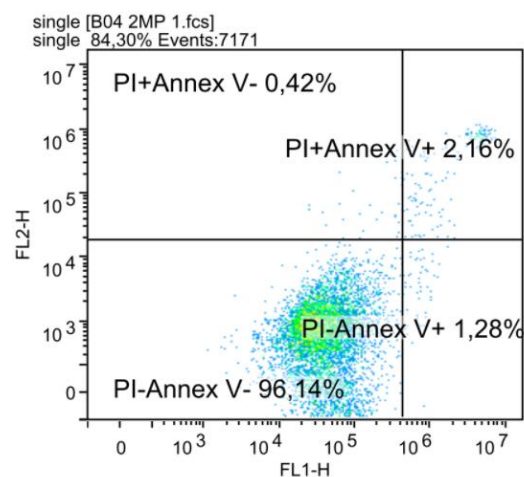
RANA I KASNA APOPTOZA

4NP	4-Nitrophenyl ITC		
Significant?	P value	av cont	av ITC
Yes	1,08087E-05	2,89	55,33

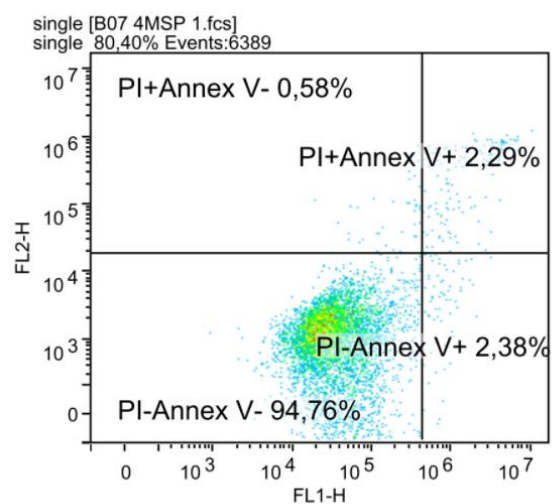
Slika 44. Utjecaj 4-nitrofenil ITC na ranu i kasnu apoptozu stanične linije T24

(*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)

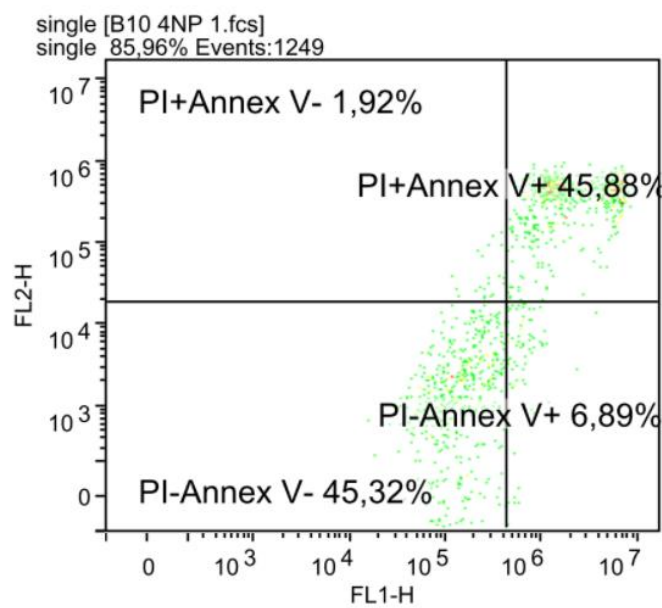
4-nitrofenil ITC u IC₅₀ koncentraciji određenoj nakon 48 h inkubacije ima najveći i značajan učinak na povećanje postotka stanica (55,33) u ranoj i kasnoj apoptozi u odnosu na postotak kontrolnih stanica (2,89) stanične linije T24 (P<0.001). Puno manji učinak na povećanje postotka stanica (4,43) u ranoj i kasnoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice (2,89) ima 4-(metilsulfanil)fenil ITC (P<0.05). Najmanji i beznačajan učinak na postotak stanica (3,87) u ranoj i kasnoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice (2,89) ima 2-metoksifenil ITC (P>0.05).



Slika 45. Točkasti dijagram stanica tretiranih 2-metoksifenil ITC



Slika 46. Točkasti dijagram stanica tretiranih 4-(metilsulfanil)fenil ITC



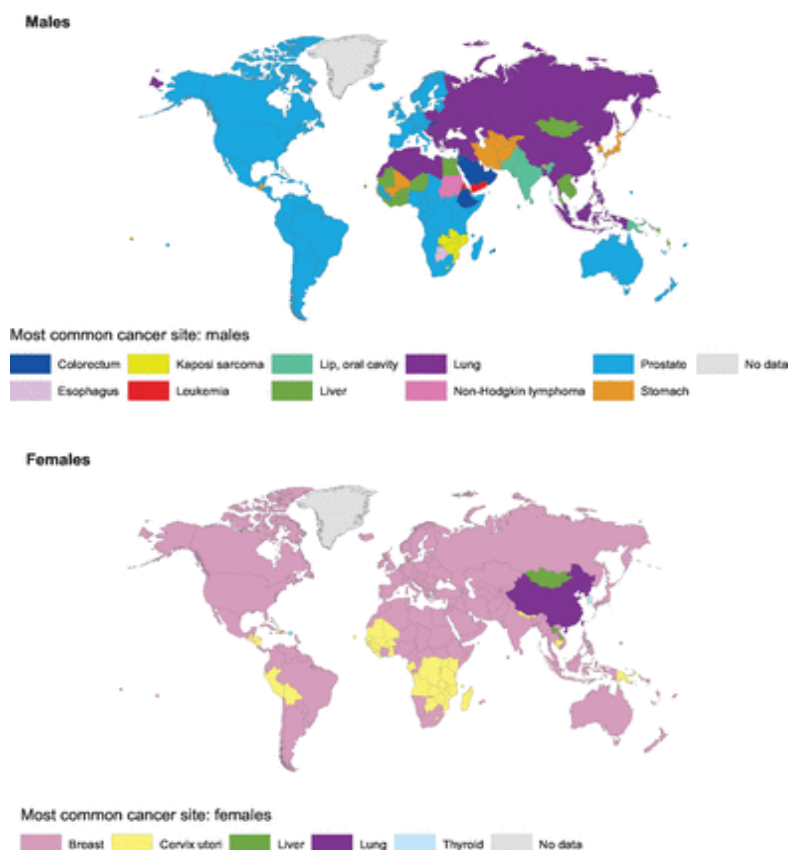
Slika 47. Točkasti dijagram stanica tretiranih 4-nitrofenil ITC

5. RASPRAVA

Rak je jedna od najstrašnijih bolesti 20. stoljeća i dalje se širi s nastavkom i povećanjem učestalosti u 21. stoljeću. Situacija je toliko ozbiljna da svaka četvrta osoba doživotno ima rizik od raka. Indija svake godine registrira više od 11 milijuna novih slučajeva raka, dok je ta brojka u svijetu veća od 14 milijuna. Svi su rakovi izlječivi ako se otkriju rano. Stanice raka nastavljaju rasti i umnožavati se ako se ne dogodi jedna od četiri navedene stvari:

- rak se uklanja kirurški
- korištenjem kemoterapije ili druge vrste lijekova specifičnih za rak, poput hormonske terapije
- primjenom terapije zračenjem
- stanice raka se smanjuju i nestaju same od sebe (33)

U raznim zemljama incidencija raka u muškaraca i žena je različita (slika 48.). Rak dojke je najčešće dijagnosticirani rak i vodeći uzrok smrti od raka među ženama, čineći 23% ukupnih slučajeva raka i 14% smrtnih slučajeva od raka. Rak pluća vodeće je mjesto raka kod muškaraca, čineći 17% od ukupnog broja novih slučajeva i 23% od ukupnog broja umrlih od raka. Rak dojke sada je također vodeći uzrok smrti od raka među ženama u zemljama u gospodarskom razvoju. Iako je ukupna stopa incidencije raka u zemljama u razvoju upola manja nego u razvijenim zemljama u oba spola, ukupne stope smrtnosti od raka općenito su slične. Znatan dio svjetskog tereta raka mogao bi se spriječiti primjenom postojećih znanja o kontroli raka i provedbom programa za kontrolu duhana, cijepljenja (protiv raka jetre i vrata maternice), ranog otkrivanja i liječenja, kao i kampanjama javnog zdravlja koje promiču tjelesna aktivnost i zdraviji unos prehrane (34).



Slika 48. Najčešći tipovi raka u različitim zemljama za muškarce i žene

Preuzeto sa: <https://cebp.aacrjournals.org/content/25/1/16.long>

Datum preuzimanja: 23.09.2021.

Rak dojke širom svijeta važan je uzrok ljudske patnje i prerane smrtnosti među ženama. Različiti faktori rizika za rak dojke uključuju: rasu, etničku pripadnost, obiteljsku povijest raka i genetske osobine, također i modificiranu izloženost poput povećane konzumacije alkohola, tjelesne neaktivnosti, egzogenih hormona i drugih ženskih reproduktivnih čimbenika (12).

Rak mjehura pojavljuje se u cijelom svijetu, a glavni čimbenici rizika su pušenje duhana i izloženost određenim kemikalijama u radnom okruženju. Pojavljuju se dokazi o interakcijama gena i okoliša, osobito vezanim za duhan i profesionalnu izloženost. U nekim populacijama stope incidencije opadaju, što se može povezati sa smanjenjem pušenja (21).

Izotiocijanati su najzastupljeniji sekundarni metaboliti u krstašicama (*Brassicaceae*). Spojevi su jake arome, jakog okusa, hlapljivi su i nastaju pri neutralnom pH. Različita količina izotiocijanata nastaje ovisno o načinu primjene. Izotiocijanati su vrlo toksični te se zbog toga smatraju pogodnim kandidatima za pesticidnu aktivnost. Poznato je da ITC imaju brojne učinke na ljudsko zdravlje osobito tijekom redovite konzumacije jestivih dijelova povrća iz porodice

Brassicaceae bogatih glukozinolatima. Dokazano je da pogodno djeluju na kardiovaskularni i središnji živčani sustav, infekcije s *Helicobacter pylori* i *E. coli* te pomažu u obnovi kožne barijere (26).

Predmet našeg istraživanja su tri spoja izotiocijanta: 2-metoksifenil ITC, 4-(metilsulfanil)fenil ITC i 4-nitrofenil ITC te njihov učinak na programiranu staničnu smrt na staničnoj liniji T24 te staničnoj liniji MDA-MB-231.

Testom citotoksičnosti promatrali smo učinak spojeva na stanice nakon inkubacije od 4, 24, 48 i 72 sata. IC₅₀ koncentraciju, pri kojoj je 50% stanica metabolički neaktivno, smo određivali nakon inkubacije od 48 h. Svi spojevi pokazuju najveću aktivnost pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Niža djelotvornost spojeva je nakon inkubacije od 24 h, potrebna je veća koncentracija spojeva da bi se dokazala citotoksičnost, za spoj 4-nitrofenil ITC citotoksičnost nakon 24 h nije definirana. Najveća djelotvornost za sve spojeve u obje vrste staničnih linija je dokazana nakon inkubacije od 72 h kad se najviše smanji broj metabolički aktivnih stanica. Najnižu IC₅₀ koncentraciju, odnosno najveću djelotvornost u obe stanične linije je pokazao 4-(metilsulfanil)fenil ITC (IC₅₀ za MDA-MB-231: 34,08 µg/mL i IC₅₀ za T24: 10,56 µg/mL). Koncentracije s kojima smo kasnije tretirali stanice od ostala dva spoja, bile su veće; 2-metoksifenil (IC₅₀ za MDA-MB-213: 79,9 µg/mL i IC₅₀ za T24: 12,46 µg/mL) i 4-nitrofenil (IC₅₀ za MDA-MB-231: 81,72 µg/mL i IC₅₀ za T24: 16,1 µg/mL).

Bolja citotoksičnost spojeva je dokazana na staničnoj liniji T24 nego na staničnoj liniji MDA-MB-231, a osobito nakon inkubacije od 72 h.

Tretman MDA-MB-231 stanica koncentracijama jednakim IC₅₀ vrijednostima dobivenih nakon 48 h inkubacije dokazao je da je mehanizam citotoksične aktivnosti za sva tri uzorka izotiocijanata bio poticanje apoptoze. Najveći utjecaj na povećanje postotka stanica u ranoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice imao je spoj 2-metoksifenil ITC (P=0,038), malo manji učinak je pokazao 4-nitrofenil ITC (P=0,009), a dvostruko manji učinak pokazuje 4-(metilsulfanil)fenil ITC (P=0,004). Najveće djelovanje na stanice u kasnoj apoptozi i porast njihovog broja u toj fazi također pokazuje 2-metoksifenil ITC (P=0,006), dvostruko manji učinak ima 4-nitrofenil ITC (P=0,003), a s obzirom na ova dva spoja, puno manje značajan je utjecaj 4-(metilsulfanil) ITC (P=0,025). Gledajući ukupno ranu i kasnu apoptozu, najveći učinak ima spoj 2-metoksifenil ITC (P=0,009), dvostruko manji učinak ima 4-nitrofenil ITC (P=0,002), a najslabije djelovanje pokazuje 4-(metilsulfanil)fenil ITC (P=0,014).

Tretman T24 stanica koncentracijama jednakim IC50 vrijednostima dobivenih nakon 48 h inkubacije dokazao je da je mehanizam citotoksične aktivnosti za sva tri uzorka izotiocijanata bio poticanje apoptoze. Najveći utjecaj na povećanje postotka stanica u ranoj apoptozi s obzirom na kontrolne stanice imao je spoj 4-nitrofenil ITC ($P=0,009$), puno manji učinak je pokazao 4-(metilsulfanil)fenil ($P=0,015$), a najmanji učinak pokazuje 2-metoksifenil ITC ($P=0,688$). Najveće djelovanje na stanice u kasnoj apoptozi i porast njihovog broja s obzirom na broj kontrolnih stanica također ima 4-nitrofenil ITC ($P<0,001$), manji učinak pokazuju 4-(metilsulfanil)fenil ITC ($P=0,028$) i 2-metoksifenil ITC ($P=0,022$). Gledajući ukupno ranu i kasnu apoptozu, najveći učinak ima spoj 4-nitrofenil ITC ($P<0,001$), puno manji učinak pokazuju 4-(metilsulfanil)fenil ITC ($P=0,013$) i 2-metoksifenil ITC ($P=0,093$).

Na temelju navedenih rezultata, vidljivo je da promatrani spojevi djeluju tako da je veći broj tretiranih stanica u kasnoj fazi, nego u ranoj fazi apoptoze.

Izotiocijanati prisutni u našim ispitivanjima imaju veliki potencijal za nadopunu liječenja različitih bolesti, a posebno su bitna njihova antitumorska svojstva, koja smo u našem *in vitro* ispitivanju dokazali na staničnim linijama MDA-MB-231 i T24. Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica povezan je s vremenom izlaganja i koncentracijom spoja, te je glavna hipoteza potvrđena i cilj istraživanja je ostvaren. Potrebno je provesti dodatna *in vitro* i *in vivo* istraživanja koja bi pokazala pozitivne učinke, kako bi se izotiocijanati uvrstili u načine liječenja različitih bolesti i karcinoma.

6. ZAKLJUČAK

- 1) *In vitro* izlaganja stanica (koje pripadaju staničnoj liniji karcinoma dojke, MDA-MB-231 i staničnoj liniji karcinoma mokraćnog mjehura, T24) trima spojevima izotiocijanata: 2-metoksifenil, 4-(metilsulfanil)fenil i 4-nitrofenil dovodi do smanjenja preživljavanja tih stanica.
- 2) Dokazan je citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu izlaganja spoja.
- 3) Najveća citotoksičnost je pokazana nakon inkubacije od 72 h, a najbolju citotoksičnost pokazuje spoj 4-(metilsulfanil)fenil ITC.
- 4) Citotoksični učinak je veći na stanicama linije T24 nego MDA-MB-231.
- 5) Tretman stanica koncentracijama jednakim IC50 vrijednostima dobivenim nakon 48 h inkubacije pokazao je da je mehanizam citotoksične aktivnosti za sve uzorke bio poticanje apoptoze.
- 6) 2-metoksifenil ITC pokazuje najbolji učinak na poticanje apoptoze na staničnoj liniji MDA-MB-231
- 7) 4-nitrofenil ITC pokazuje najbolji učinak na poticanje apoptoze na staničnoj liniji T24.

7. LITERATURA

1. Ivan Damjanov, Sven Seiwerth, Stanko Jukić i Marin Nola; Patologija peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018., pp. 149-152.
2. Cree IA. Cancer biology. *Methods Mol Biol.* 2011;731:1-11.
3. Ivan Damjanov, Sven Seiwerth, Stanko Jukić i Marin Nola; Patologija peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018., pp. 157.
4. Ivan Damjanov, Sven Seiwerth, Stanko Jukić i Marin Nola ; Patologija peto, prerađeno i dopunjeno izdanje, Zagreb: Medicinska naklada; 2018.,pp.157-159.
5. Geoofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 740-743.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7; 100(1): pp. 57-70.
7. Geoofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 744-747.
8. Geoofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 752-756.
9. Geoofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Stanična smrt i stanična obnova. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 694-699.
10. Hongmei Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review [Internet]. Apoptosis and Medicine. 2012 [cited 2016 Sep 19]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review>.
11. Geoofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Stanična smrt i stanična obnova. In: Gordan Lauc,editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 700-701.
12. Coughlin SS. Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1152:9-29.
13. <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/> Datum pristupa: 15.08.2021.
14. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they. *Mol Oncol.* 2010 Jun;4(3):192-208
15. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Rak dojke U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 205.

16. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, McPhail S, Rubin GP, Lyratzopoulos G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2017 06;48:140-6.
17. . Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(17):3628-36.
18. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 203-13.
19. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 208-211.
20. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology.* 2005 Dec;66(6 Suppl 1):4-34. doi: 10.1016/j.urology.2005.07.062. PMID: 16399414.
21. Cumberbatch MGK, Jubber I, Black PC, Esperto F, Figueroa JD, Kamat AM, Kiemeny L, Lotan Y, Pang K, Silverman DT, Znaor A, Catto JWF. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *Eur Urol.* 2018 Dec;74(6):784-795. doi: 10.1016/j.eururo.2018.09.001. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30268659.
22. https://lijecnicki-vjesnik.hlz.hr/pdf/5-6-2018/01_ljubic.pdf Datum pristupa: 14.09.2021.
23. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Rak dojke. U: Raič A., ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 158-159.
24. Farling KB. Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management. *Nurse Pract.* 2017 03 7;42(3):26-33.
25. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Rak dojke. U: Raič A., ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 157-158
26. Brzović P. Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama *Lepidium* spp. (Brassicaceae) i *Moringa oleifera* (Moringaceae) : diplomski rad [Diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017 Datum pristupa: 19.09.2021.

27. Abbaoui B, Lucas CR, Riedl KM, Clinton SK, Mortazavi A. Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates, and Bladder Cancer Prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Sep;62(18):e1800079. doi: 10.1002/mnfr.201800079. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30079608; PMCID: PMC6196731.
28. Vanduchova A, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. *J Med Food*. 2019 Feb;22(2):121-126. doi: 10.1089/jmf.2018.0024. Epub 2018 Oct 27. PMID: 30372361.
29. Župčić M. (2017). Citotoksično djelovanje izotiocijanata iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom. Diplomski rad. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet.
30. <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates> Datum pristupa: 15.09. 2020
31. Gličić A. 2020. SUVREMENA PROIZVODNJA I LJEKOVITA SVOJSTVA HRENA. Diplomski rad. Osijek: SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK.
32. Franko Burčul, Ivana Generalić Mekinić, Mila Radan, Patrick Rollin & Ivica Blažević (2018) Isothiocyanates: cholinesterase inhibiting, antioxidant, and anti-inflammatory activity, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33:1, 577-582, DOI: 10.1080/14756366.2018.1442833
33. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016 Jul-Sep;53(3):441-442. doi: 10.4103/0019-509X.200658. PMID: 28244479.
34. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):134. PMID: 21296855.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj istraživanja je dokazati moguće citotoksično i apoptotičko djelovanje tri spoja izotiocijanata: 2MP (2-metoksifenil ITC), 4MSP (4-(metilsulfanil)fenil ITC), 4NP (4-nitrofenil ITC) na humanim staničnim linijama karcinoma.

Materijali i metode:

Ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama karcinoma dojke MDA-MB-231 i karcinoma mokraćnog mjehura T24 provedeno je MTT testom. Usporedbom apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih uzorcima izotiocijanata i apsorbancije kod kontrolnih, netretiranih stanica, dobili smo postotak preživljenja karcinomskih stanica. Metabolička aktivnost stanica se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije.

Protočnom citometrijom se pratio učinak izotiocijanta na apoptozu staničnih linija MDA-M231 i T24.

Rezultati:

Rezultati za MTT test citotoksičnosti su prikazani grafovima na kojima su prikazane metabolički aktivne stanice u ovisnosti o koncentraciji spoja i vremenu izlaganja. Svi spojevi pokazuju najveću citotoksičnu aktivnost u koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL i u vremenu inkubacije od 72 sata. Bolje djelovanje izotiocijanta je dokazano na staničnoj liniji T24. Nakon toga je ispitan učinak na apoptozu metodom protočne citometrije preko Annexin-V/PI bojanja, gdje je postotak apoptotskih stanica izražen kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, čija je vrijednost postavljena kao 100%. Tretman stanica koncentracijama jednakim IC50 vrijednostima za 48 h inkubacije dokazao je da je mehanizam citotoksične aktivnosti za sva tri uzorka izotiocijanta bio poticanje apoptoze.

Zaključci:

In vitro izlaganja stanica (koje pripadaju staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231 i staničnoj liniji karcinoma mokraćnog mjehura T24) trima spojevima izotiocijanata: 2-metoksifenil, 4-(metilsulfanil)fenil i 4-nitrofenil dovodi do smanjenja preživljavanja tih stanica. Dokazan je citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu izlaganja spoja. Mehanizam citotoksične aktivnosti za sve uzorke bio je poticanje apoptoze. 2-metoksifenil ITC pokazuje najbolji učinak na poticanje apoptoze na staničnoj liniji MDA-MB-231. 4-nitrofenil ITC pokazuje najbolji učinak na poticanje apoptoze na staničnoj liniji T24.

9. SUMMARY

The aim of research:

The aim of the study was to demonstrate the possible cytotoxic and apoptotic effects of three isothiocyanate compounds: 2MP (2-methoxyphenyl ITC), 4MSP (4- (methylsulfanyl) phenyl ITC), 4NP (4-nitrophenyl ITC) on human cancer cell lines.

Materials and methods:

Cytotoxicity testing on MDA-MB-231 breast cancer cell lines and T24 bladder cancer was performed by MTT assay. By comparing the absorbance of the formed formazan in cells treated with isothiocyanate samples and the absorbance in control, untreated cells, we obtained the survival rate of cancer cells. Metabolic activity of the cells was determined within 4, 24, 48 and 72 hours of incubation.

Flow cytometry was used to monitor the effect of isothiocyanate on apoptosis of MDA-M231 and T24 cell lines.

The results:

The results for the MTT cytotoxicity test are shown in graphs showing metabolically active cells as a function of compound concentration and exposure time. All compounds show the highest cytotoxic activity at concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL and an incubation time of 72 hours. Better isothiocyanate activity was demonstrated at the T24 cell line. The effect on apoptosis was then examined by flow cytometry via Annexin-V/PI staining, where the percentage of apoptotic cells was expressed as the number of positive cells in the total number of cells, the value of which was set as 100%. Treatment of cells with concentrations equal to IC₅₀ values for 48 h of incubation proved that the mechanism of cytotoxic activity for all three isothiocyanate samples was the induction of apoptosis.

Conclusions:

In vitro exposure of cells (belonging to the MDA-MB-231 breast cancer cell line and the T24 bladder cancer cell line) to three isothiocyanate compounds: 2-methoxyphenyl, 4- (methylsulfanyl) phenyl and 4-nitrophenyl leads to a decrease in the survival of these cells. Concentration and time-dependent cytotoxic effects have been demonstrated. The mechanism of cytotoxic activity for all samples was the induction of apoptosis. 2-methoxyphenyl ITC shows the best effect on inducing apoptosis on the MDA-MB-231 cell line. 4-nitrophenyl ITC shows the best effect on inducing apoptosis on the T24 cell line.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI:

Ime i prezime: Antonela Žeravica

Datum rođenja: 09.02.1998.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Kacetine Stinice 26, Kaštel Sućurac

e-mail: antonelazera@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- **2004. – 2012.** Osnovna škola kneza Mislava, Kaštel Sućurac, Republika Hrvatska
- **2012. – 2016.** Opća gimnazija “Marko Marulić” Split, Republika Hrvatska
- **2016. - 2021.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:

- Ljekarne Splitsko- dalmatinske županije, Ljekarna Kaštel Sućurac
- Galenski laboratorij Split
- Analitički laboratorij Split
- Bolnička Ljekarna
- Trajanje: 6 mjeseci (22.02.2021.-27.08.2021.)

RADNO ISKUSTVO:

- **2020.-2021.** Rad u Galenskom laboratoriju Ljekarni SDŽ-a, ispomoć u proizvodnji
- **CPSA Split** (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

NAGRADE:

- Dekanova nagrada za najboljeg studenta za prvu godinu studija (2016./2017.)

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski jezik, talijanski jezik

Vozačka dozvola: B kategorija