Citotoksično djelovanje Lepidium spp. na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

Katičić, Maja

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:171:791976

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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 FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Maja Katičić

CITOTOKSIČNO DJELOVANJE LEPIDIUM SPP. NA RAZLIČITE STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA MJERENO MTT METODOM

Diplomski rad

Akademska godina:

2017./2018.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, srpanj, 2018. godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska kemija i biokemija
Tema rada 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 Lepidium spp. na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

Maja Katičić, broj indeksa 76

Sažetak:

Cilj istraživanja je bio ispitati citotoksični učinak određenih izotiocijanata iz biljnih vrsta roda *Lepidium* na dvije stanične linije humanih karcinoma: UM-UC-3 i LN229. Korišteni su destilat i ekstrakt iz biljnih vrsta *Lepidium graminifolium* i *Lepidium latifolium,* te alil izotiocijanat, fenil izotiocijanat i benzil izotiocijanat. Obje 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 72 h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama izotiocijanata i apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih izotiocijanata. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju UM-UC-3 imao je benzil izotiocijanat pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje broja metabolički aktivnih stanica stanične linije LN229 pokazao je benzil izotiocijanat pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 48h inkubacije. Ispitivani izotiocijanati pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje izotiocijanata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak izotiocijanata, što je ujedno i hipoteza ovog ispitivanja, potvrđen je, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma mokraćnog mjehura i glioblastoma kod životinja.

Ključne riječi: biljke, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda
Rad sadrži: 75 stranica, 30 slika, 5 tablica, 52 reference
Jezik izvornika: hrvatski
Sastav povjerenstva za obranu:
1. Prof.dr.sc. Maja Valić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Janoš Terzić, član
3. Izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 20.07.2018.

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 Čikeš Čulić, PhD
Technical assistence: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

The cytotoxic effect of the Lepidium spp. on human cancer cell lines measured by the MTT assay

Maja Katičić, index number 76

Summary:

The aim of this research was to examine cytotoxic effects of certain isothiocyanates from the *Lepidium* family of plants on two cell lines of human carcinomas, UM-UC-3 and LN229. We used distillate and extract of *Lepidium graminifolium* and *Lepidium latifolium* and allyl isothiocynate, phenyl isothiocyanate and benzyl isothiocyanate. Both cell lines were treated with concentrations of 1 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, 50 μg/mL and 100 μg/mL. Cytotoxicity was measured after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours, using the MTT assay. The ratio of absorbances of cells treated with isothiocyanates in aqueous solutions and the ones not treated showed the cytotoxic activity of used isothiocyanates. In cell line UM-UC-3, the most significant cytotoxic effect was achieved by benzyl isothiocyanate at the concentrations of 50 μg/mL and 100 μg/mL after 24-hour incubation time. The most prominent effect on the reduction of the number of metabolically active cells in cell line LN229 was achieved by benzyl isothiocyanate at the concentrations of 50 μg/mL and 100 μg/mL after 48-hour incubation time. Tested isothiocyanates showed cytotoxic effects dependent on incubation time and concentration. The effectiveness of isothiocyanates was not always correspondent to the increase of concentration and incubation time and, in some cases, cell recovery occurred. The cytotoxic effect of isothiocyanates is confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next step is the analysis of these effects by *in vivo* studies on the models of animal urinary bladder and glioblastoma cancers.

Keywords: plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay
Thesis contains: 75 pages, 30 figures, 5 tables, 52 references
Original in: Croatian
Deffence committee:
1. Maja Valić, PhD, full prof, chair person
2. Janoš Terzić, PhD, full prof, member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member - supervisor

Defence date: July 20th , 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. KARCINOM 2
      1.1.1. ONKOGENI I TUMOR-SUPRESORSKI GENI 2
   1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA 5
      1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA 5
      1.2.2. PATOHISTOLOGIJA 5
      1.2.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA 7
      1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA 8
      1.2.5. LIJEČENJE 10
   1.3. GLIOBLASTOM 11
      1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA 11
      1.3.2. PATOHISTOLOGIJA 12
      1.3.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA 13
      1.3.4. KLASIFIKACIJA TUMORA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA 14
      1.3.5. LIJEČENJE 15
   1.4. *LEPIDIUM SPP.* 16
      1.4.1. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* 17
      1.4.2. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* 18
   1.5. IZOTIOCIJANATI 21
      1.5.1. ALIL IZOTIOCIJANAT 22
      1.5.2. BENZIL IZOTIOCIJANAT 24
      1.5.3. FENIL IZOTIOCIJANAT 25
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 27
3. MATERIJALI I METODE 30
   3.1. STANIČNE LINIJE 30
   3.2. POSTUPAK 31
   3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI 32
4. REZULTATI 34
   4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA-STANIČNA LINIJA UM-UC-3 35
      4.1.1. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* DESTILAT 35
      4.1.2. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* EKSTRAKT 36

4.1.3. ALIL IZOTIOCIJANAT 37
4.1.4. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* DESTILAT 38
4.1.5. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* EKSTRAKT 39
4.1.6. FENIL IZOTIOCIJANAT 40
4.1.7. BENZIL IZOTIOCIJANAT 41
4.2. GLIOBLASTOM-STANIČNA LINIJA LN229 42
4.2.1. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* DESTILAT 42
4.2.2. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* EKSTRAKT 43
4.2.3. ALIL IZOTIOCIJANAT 44
4.2.4. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* DESTILAT 45
4.2.5. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* EKSTRAKT 46
4.2.6. FENIL IZOTIOCIJANAT 47
4.2.7. BENZIL IZOTIOCIJANAT 48
5. RASPRAVA 49
6. ZAKLJUČAK 55
7. LITERATURA 57
8. SAŽETAK 63
9. SUMMARY 65
10. ŽIVOTOPIS 68

Posveta

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima. Danas sam to što jesam zahvaljujući Vama. Uvijek ste mi bili podrška i uzor. Dopustili ste mi da narastem i pomogli ste mi da naučim letjeti. Hvala Vam.

1. **UVOD**

1.1. KARCINOM

Karcinom je najčešća vrsta raka u ljudi koja obuhvaća oko 90% svih slučajeva raka. Rak može nastati zbog poremećaja proliferacije bilo koje vrste stanica u tijelu, tako da postoji više od stotinu vrsta raka koji se jako razlikuju po ponašanju i odgovoru na liječenje. Karcinom je zloćudna bolest epitelnih stanica koja nastaje kao posljedica sloma regulacijskih mehanizama koji upravljaju ponašanjem normalne stanice. Umjesto da na odgovarajući način reagiraju na signale koji kontroliraju ponašanje normalnih stanica, stanice karcinoma nekontrolirano rastu i dijele se, šireći se u normalna tkiva i organe i naposljetku po čitavom tijelu. Generalizirani gubitak kontrole rasta karakterističan za stanice karcinoma nastaje zbog nakupljanja poremećaja različitih staničnih regulacijskih sustava i odražava se na različite aspekte ponašanja po kojima se stanice karcinoma razlikuju od odgovarajućih normalnih stanica (1).

Obilježja po kojima se karcinomi razlikuju od zdravoga tkiva su: samodostatnost s obzirom na signale rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, zaobilaženje programirane stanične smrti (apoptoze), neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza, sposobnost tkivne invazije i presađivanja, poremećen metabolizam, sposobnost izbjegavanja imunosnog odgovora, genomska nestabilnost i upala (2).

Karcinom je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu s 8.8 milijuna umrlih u 2015. godini, a taj broj još raste. Karcinom predstavlja skup različitih bolesti koje utječu ne samo na život oboljelog, već i na cjelokupno društvo, i to u okviru fizičkih, psihičkih, emocionalnih, socijalnih, pa sve do ekonomskih aspekata (3).

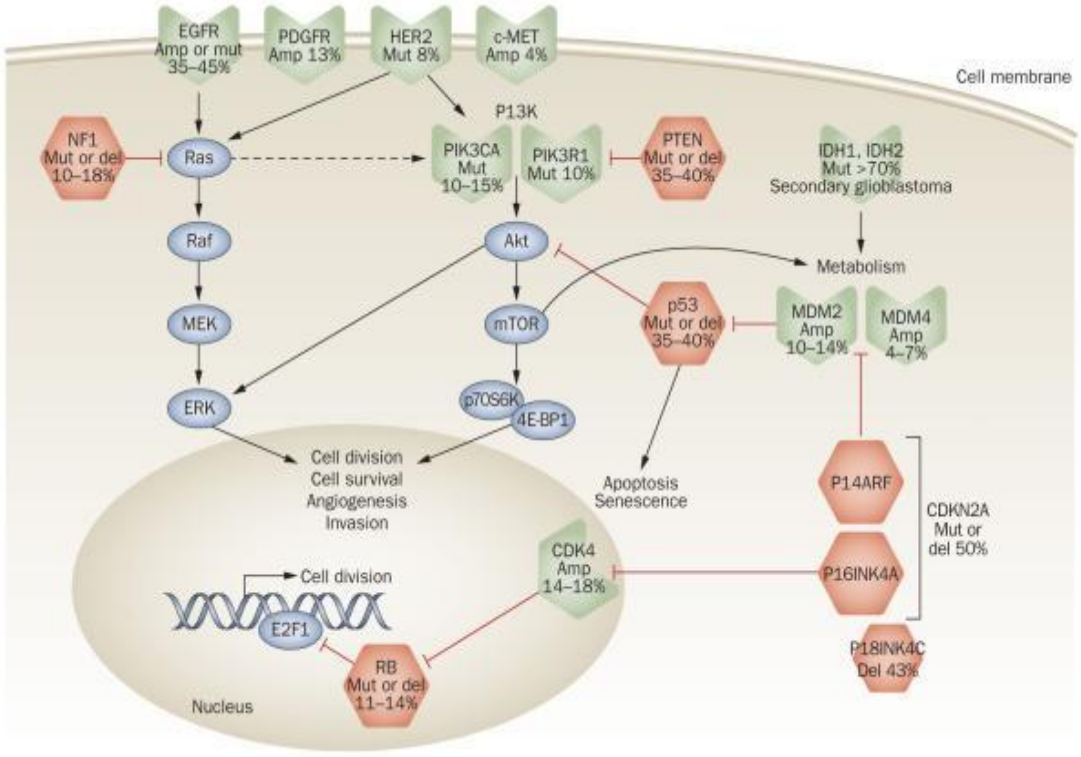
1.1.1. ONKOGENI I TUMOR-SUPRESORSKI GENI

Normalni stanični geni od kojih su potekli retrovirusni onkogeni zovu se protoonkogeni. To su važni regulacijski stanični geni, koji često kodiraju proteine što sudjeluju u putevima prijenosa signala kojima se kontrolira proliferacija normalnih stanica (npr. *src, ras* i *raf*). Onkogeni su abnormalno eksprimirani ili mutirani oblici odgovarajućih protoonkogena. Zbog tih promjena, onkogeni dovode do abnormalne proliferacije stanica i nastanka karcinoma. Onkogeni, koji se najčešće susreću u ljudskim karcinomima, tri su vrlo srodna člana porodice *ras* gena (*ras*H, *ras*K i *ras*N). *Ras* onkogena nema u normalnim stanicama, u stanicama karcinoma nastaju zbog mutacija koje se događaju tijekom razvoja

karcinoma. Načini na koje iz protoonkogena nastaju onkogeni su točkaste mutacije, translokacije, duplikacije i delecije kromosoma, te amplifikacija gena, koja dovodi do pojačane ekspresije gena. *Ras* onkogeni se od odgovarajućih protoonkogena razlikuju po zamjenama pojedinačnih aminokiselina na ključnim mjestima. *Ras* geni kodiraju proteine koji vežu gvaninske nukleotide i sudjeluju u prijenosu mitogenih signala od različitih receptora za faktore rasta. Mutacije karakteristične za *ras* onkogene održavaju Ras protein konstitutivno u aktivnom stanju, čime on potiče nekontroliranu proliferaciju stanica. Drugi onkogeni proteini djeluju na diferencijaciju i izbjegavanje apoptoze. Većina onkogenih proteina dijelovi su signalnih puteva koji reguliraju proliferaciju i preživljavanje stanica nakon stimulacije faktorima rasta. Takvi onkogeni proteini mogu biti polipeptidni faktori rasta, receptori za faktore rasta, dijelovi unutarstaničnih signalnih puteva (Ras i Raf) ili transkripcijski faktori. Ras i Raf aktiviraju ERK/MAP kinazni put, dovodeći do indukcije drugih gena koji kodiraju potencijalno onkogene proteine, regulatore transkripcije. Sastavni dijelovi drugih signalnih puteva, uključujući signalne puteve povezane s G proteinima, također mogu postati onkogeni (4).

Tumor-supresorski geni imaju suprotnu ulogu u kontroli staničnoga rasta. Oni normalno inhibiraju staničnu proliferaciju i nastanak karcinoma. U mnogim karcinomima, ovi geni su nestali ili su inaktivirani, zbog čega prestaje funkcionirati negativna regulacija stanične proliferacije što pridonosi nastanku poremećaja proliferacije karakterističnom za stanice karcinoma. Prvi tumor-supresorski gen, otkriven istraživanjem retinoblastoma, je *Rb*. *Rb* gen funkcionira kao negativni regulator tumorogeneze. U retinoblastomu i drugim vrstama karcinoma (karcinom mjehura), *Rb* nedostaje ili je mutiran. Drugi otkriveni tumor-supresorski gen, često inaktiviran u nizu karcinoma, je *p53*. Za razliku od protoonkogenih i onkogenih proteina, proteini koje kodira većina tumor-supresorskih gena inhibiraju staničnu proliferaciju ili preživljavanje. Produkt *p53* gena regulira napredovanje staničnoga ciklusa i apoptozu. Oštećenje DNA brzo dovodi do indukcije p53 koji aktivira transkripciju p21, inhibitora Cdk proteina. Inhibitor p21 zaustavlja napredovanje staničnoga ciklusa tako što inhibira sve Cdk/ciklin komplekse, a replikaciju DNA inhibira tako što veže PCNA (jezgreni antigen stanica u proliferaciji). Tako dolazi do zaustavljanja staničnoga ciklusa, što vjerojatno daje stanici vremena za popravak oštećene DNA prije replikacije. Ako nema p53, nakon oštećenja DNA ne dolazi do zaustavljanja staničnoga ciklusa, što dovodi do povećanja učestalosti mutacija i nestabilnosti čitavoga staničnoga genoma. Takva genetička nestabilnost zajednička je značajka svih stanica karcinoma i pridonosi nastanku dodatnih promjena onkogena i tumor-

supresorskih gena tijekom napredovanja karcinoma. p53 je također nužan za apoptozu induciranu oštećenjem DNA. Učinak p53 na apoptozu posredovan je aktivacijom transkripcije jednoga člana Bcl-2 porodice (PUMA) koji inducira staničnu smrt. Stanice bez p53, nakon izlaganja tvarima koje oštećuju DNA, poput zračenja i mnogih lijekova koji se koriste u kemoterapiji, ne umiru apoptozom. Ovaj izostanak apoptoze nakon oštećenja DNA pridonosi otpornosti mnogih karcinoma na kemoterapiju. Osim toga, izgleda da gubitak p53 ometa apoptozu uzrokovanu drugim podražajima, kao što su pomanjkanje faktora rasta ili kisika. Smatra se da su ovi učinci p53 na preživljavanje stanica odgovorni za veliku učestalost mutacija p53 u ljudskim karcinomima (5).



Slika 1. Produkti onkogena (zelene strelice) i tumor-supresorskih gena (crveni šesterokuti) u glioblastomu

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3387541/

1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom mokraćnog mjehura je čest urološki karcinom koji ima najveću stopu recidiva od svih zloćudnih tumora (6). U 2012. godini diljem svijeta zabilježeno je 429,793 novih slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura i 165,084 smrtnih slučajeva (7). U razvijenim zemljama najčešći tip je karcinom prijelaznog epitela, a u zemljama u razvoju najčešći je karcinom pločastih stanica (6).

U 2015. godini od karcinoma mokraćnog mjehura u Republici Hrvatskoj je oboljelo 686 muškaraca (6%) i 243 žene (2%) (8).

Do 80% slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura povezano je s izlaganjem različitim okolišnim čimbenicima. Trajanje i intenzitet pušenja izravno su povezani s povećanim rizikom. Rizik od razvoja karcinoma mokraćnog mjehura je 2-6 puta veći u pušača nego u nepušača. Rizik je sličan u muškaraca i žena. Brojna zanimanja uključuju izlaganje tvarima koje mogu povećati rizik od karcinoma mokraćnog mjehura, primjerice naftni derivati, otapala, organske kemikalije i boje. Među slučajevima karcinoma mokraćnog mjehura zbog profesionalne izloženosti, stopa incidencije je najviša u radnika izloženih aromatskim aminima, dok je smrtnost najveća u onih izloženih policikličkim, aromatskim ugljikovodicima i teškim metalima. Medicinski čimbenici rizika, povezani s povećanim rizikom, su zračenje zdjelice, neki lijekovi poput ciklofosfamida i shistosomijaza, uzrokovana parazitom *Schistosoma haematobium*, odgovorna za većinu slučajeva karcinoma pločastih stanica u zemljama u razvoju. Iako se čini da pojedini zajednički genetski polimorfizmi povećavaju osjetljivost u profesionalno izloženih osoba, nema uvjerljivih dokaza za nasljedni čimbenik u razvoju karcinoma mokraćnog mjehura. Ipak, zabilježene su grupe sličnih slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura (6).

1.2.2. PATOHISTOLOGIJA

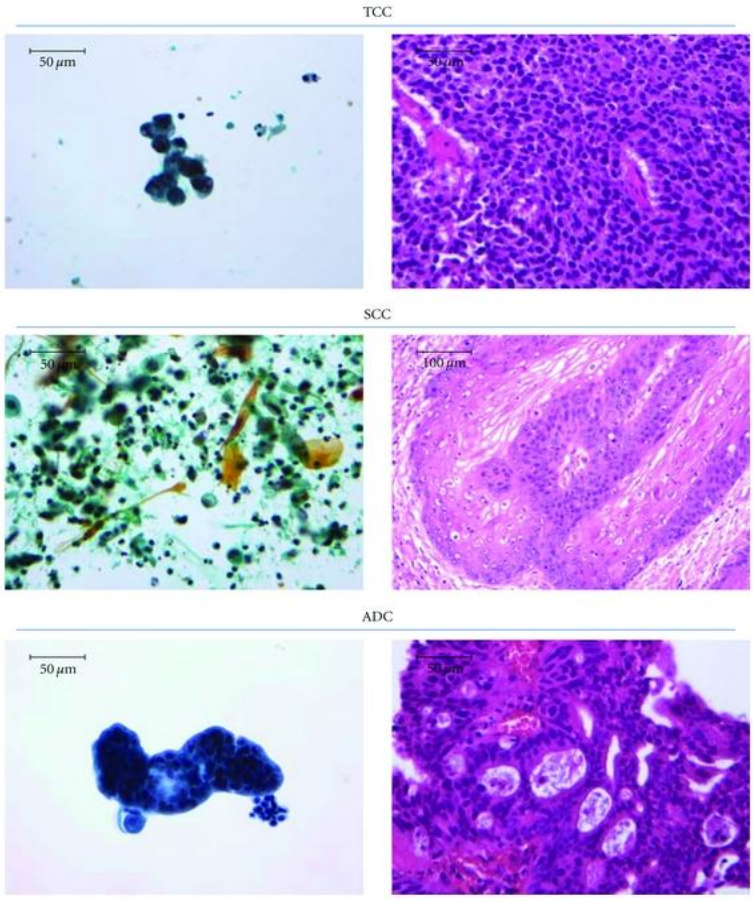
S obzirom na vrstu stanica koje postaju maligne, postoje tri vrste karcinoma mokraćnog mjehura.

Karcinom prijelaznog epitela (urotelni karcinom) nastaje iz stanica prijelaznog epitela. Ovisno o genetskim promjenama ovih stanica, karcinom prijelaznog epitela može biti niskog ili visokog stupnja. Karcinomi niskog stupnja su neinvazivni i rijetko se šire u okolno tkivo, dok su karcinomi visokog stupnja invazivni i imaju izrazitu sklonost metastaziranju. Karcinom prijelaznog epitela visokog stupnja najčešće počinje kao papilarni tumor koji prolazi kroz lumen mokraćnog mjehura, te ukoliko se ne liječi, na kraju prodire kroz laminu propriu i dolazi do mišićnog tkiva, odakle može metastazirati.

Karcinom pločastih stanica nastaje iz pločastih stanica epitela mokraćnog mjehura. Ova vrsta karcinoma je povezana s dugotrajnom upalom, zbog dugotrajne upotrebe katetera ili kamenaca u mokraćnom mjehuru, i infekcijama, kao što je shistosomijaza. Karcinom pločastih stanica je manje sklon metastaziranju od karcinoma prijelaznog epitela.

Adenokarcinom obuhvaća manje od 2% primarnih karcinoma mokraćnog mjehura, a također je povezan s dugotrajnom upalom.

Neurotelni karcinomi mokraćnog mjehura izrazito su rijetki, a mogu uključivati karcinom malih stanica, karcinosarkom, primarni limfom i sarkom (6).



Slika 2. Tri glavne patohistološke vrste karcinoma mokraćnog mjehura: karcinom prijelaznog epitela (TCC), karcinom pločastih stanica (SCC) i adenokarcinom (ADC)

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3175393/

1.2.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Približno 80-90% pacijenata s karcinomom mokraćnog mjehura ima bezbolnu hematuriju. Iritativni simptomi kao što su dizurija, urgencija i frekvencija mokrenja javljaju se u 20-30% pacijenata. U pacijenata s uznapredovalom bolešću može se javiti bol u zdjelici ili kostima, edem donjih ekstremiteta, zbog pritiska na ilijačnu arteriju, ili bol u slabinama zbog ureteralne opstrukcije. U rijetkim slučajevima površinskog karcinoma mokraćnog mjehura, masa je palpabilna tijekom fizičkog pregleda (6).

Dijagnostika karcinoma mokraćnog mjehura obuhvaća sljedeće pretrage urina: biokemijska analiza urina, mikrobiološka analiza urina, za isključenje sumnje na infekciju, citologija urina i testiranje urina na tumorske markere (6).

Citologija urina je standardna, neinvazivna dijagnostička metoda, niske osjetljivosti na karcinom niskog stupnja i karcinom ranog stadija. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) može poboljšati preciznost citologije (6).

Cistoskopija je primarna metoda dijagnoze karcinoma mokraćnog mjehura, zbog niskog rizika i zato što se mogu uzimati uzorci za biopsiju, a papilarni tumori se mogu odstraniti tijekom jednog postupka (9).

Preporuča se kompjuterizirana tomografija (CT) abdomena i zdjelice s kontrastnim sredstvom. Dvije često korištene, alternativne tehnike su magnetska rezonanca (MR) i ultrazvuk bubrega. Međutim, ova rutinska snimanja ne prikazuju dovoljno dobro epitel mokraćnog mjehura, zbog čega se mogu propustiti manji karcinomi (10).

Noviji molekulski i genetički markeri, uključujući otkrivanje mutacija u genima kao što su RAS, FGFR3, PIK3CA i TP53, te metilacijskih puteva u mokraćnom sedimentu, mogu pomoći u ranom otkrivanju i predviđanju urotelnih karcinoma. Međutim, još uvijek nije dokazano da ovi testovi mogu djelotvorno zamijeniti citologiju urina i cistoskopiju, s ili bez biopsije, za dijagnozu karcinoma mokraćnog mjehura (10).

1.2.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Međunarodna unija protiv raka (*The International Union Against Cancer*) i Američki združeni komitet za rak (*American Joint Committee on Cancer Staging*, AJCCS) razvili su sustav za procjenu proširenosti bolesti koji se izražava TNM (T-primarni tumor, N-regionalni limfni čvorovi, M-udaljene presadnice)-klasifikacijom (Tablica 1.) (11).

WHO podijelila je karcinome mokraćnog mjehura na niski (stadij 1 i 2) ili visoki stupanj (stadij 3). Tumori se također klasificiraju uzorkom rasta na papilarne (70%), sesilne ili miješane (20%) i nodularne (10%) (6).

Tablica 1. TNM-klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: https://emedicine.medscape.com/article/2006834-overview

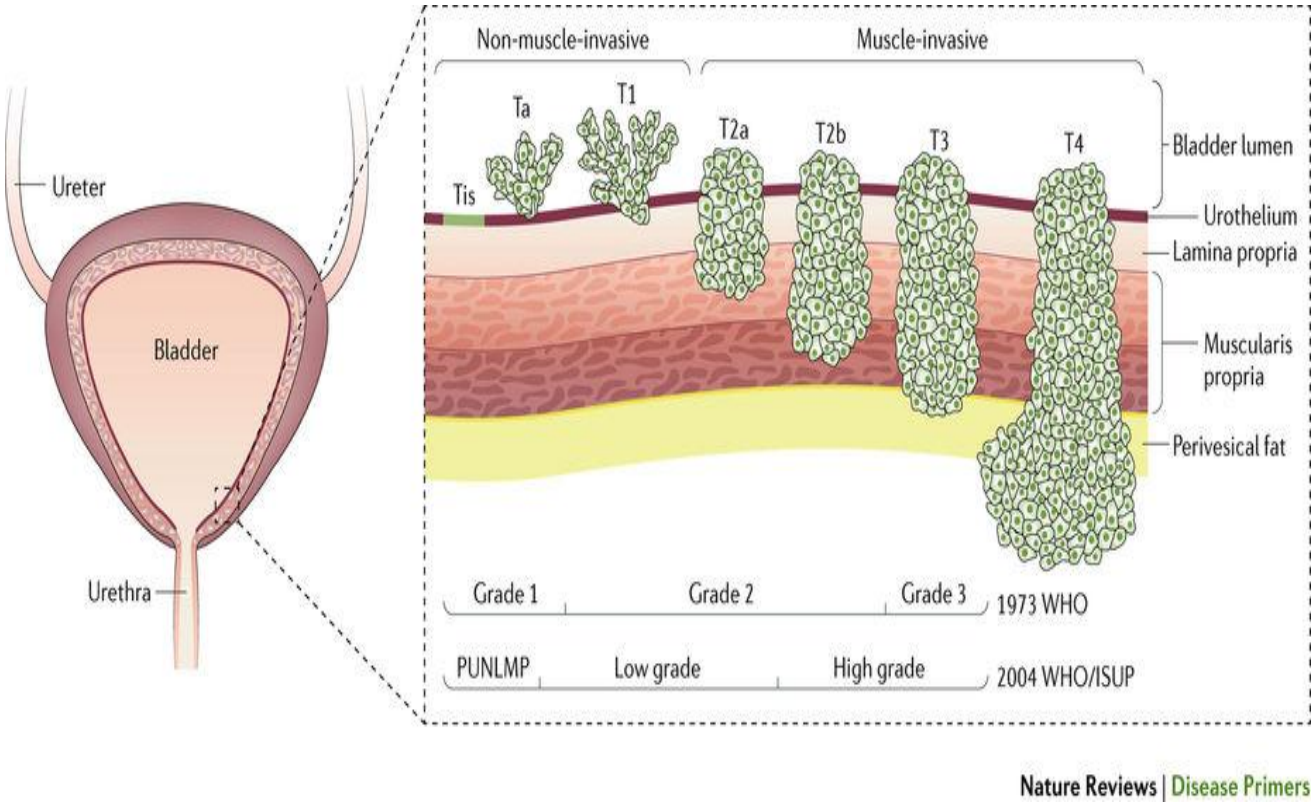
Primarni tumor (T)	
TX	primarni tumor se ne može opisati
T0	nema dokaza primarnog tumora
Ta	neinvazivni papilarni karcinom
Tis	karcinom *in situ*
T1	tumor invadira subepitelno vezivno tkivo
T2	tumor invadira mišićni sloj
pT2a	tumor invadira površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)
pT2b	tumor invadira duboki mišićni sloj (vanjska polovica)
T3	tumor invadira perivezikalno tkivo
pT3a	mikroskopska invazija perivezikalnoga tkiva
pT3b	makroskopska invazija perivezikalnoga tkiva
T4	tumor invadira jedno od navedenoga: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina, stijenka zdjelice,

	trbušna stijenka
T4a	tumor invadira stromu prostate, maternicu, vaginu
T4b	tumor invadira stijenku zdjelice, trbušnu stijenku
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Regionalni limfni čvorovi uključuju primarne i sekundarne drenažne regije. Svi ostali limfni čvorovi iznad račvišta aorte smatraju se udaljenim limfnim čvorovima.	
NX	limfni čvorovi ne mogu biti određeni
N0	nema zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova
N1	jedan zahvaćeni regionalni limfni čvor u zdjelici
N2	više od jednog zahvaćenog limfnog čvora u zdjelici
N3	metastaze u zajedničkim ilijačnim limfnim čvorovima
Udaljene presadnice (M)	
MO	nema udaljenih presadnica
M1	udaljene presadnice

Tablica 2. Anatomski stadiji/ prognostičke skupine

Preuzeto s: https://emedicine.medscape.com/article/2006834-overview

Stadij	**T**	**N**	**M**
Stadij 0a	Ta	N0	M0
Stadij 0is	Tis	N0	M0
Stadij I	T1	N0	M0
Stadij II	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
Stadij III	T3a	N0	M0
	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Stadij IV	T4b	N0	M0
	Any T	N1-3	M0
	Any T	Any N	M1



Slika 3. Vrste i stadiji karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: https://www.nature.com/articles/nrdp201722/figures/1

1.2.5. LIJEČENJE

Neinvazivni, površinski karcinom mokraćnog mjehura (Ta, T1 i karcinom *in situ,* CIS) liječi se transuretralnom endoskopskom resekcijom (TUR). Daljnji tijek liječenja ovisi o stadiju karcinoma. Karcinom mokraćnog mjehura niskog stupnja, Ta, liječi se postoperativno jednokratnom, intravezikalnom kemoterapijom. Ta, T1 i CIS urotelni karcinomi visokog rizika tretiraju se intravezikalno s BCG cjepivom (*Baccillus Calmette-Guérin*) kao imunoterapijom. Dugotrajna ili bolest s visokim rizikom od recidiva liječi se još jednom resekcijom prije dodatne intravezikalne terapije, primjerice interferonom alfa ili interferonom gama. Kod visoko rizičnih karcinoma, valja uzeti u obzir i cistektomiju (6).

Osnovni oblik liječenja invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura (T2-T4) je radikalna cistektomija. Ovim zahvatom, osim mokraćnog mjehura i njegovih limfnih čvorova, kod muškaraca se može odstraniti i prostata, sjemeni mjehurići i dio uretre, a kod žena se može odstraniti maternica, prednja stijenka vagine i uretra. Istovremeno s ovim zahvatom,

trebala bi se provoditi i bilateralna limfadenektomija zdjelice, zbog mogućih metastaza u limfnim čvorovima. Neoadjuvantna kemoterapija cisplatinom je standardna terapija koja može poboljšati preživljenje pacijenata. Pacijenti podvrgnuti radikalnoj cistektomiji kod kojih je karcinom zahvatio veći dio zida mokraćnog mjehura ili limfne čvorove, mogu imati koristi od adjuvantne kemoterapije. Još jedan oblik liječenja je kombinacija TURe s radioterapijom i kemoterapijom (trojna terapija). Međutim, ova terapija ima značajnu stopu recidiva, pa stoga zahtijeva temeljito i često cistoskopsko praćenje (12).

Kombinacija metotreksata, vinblastina, doksorubicina (Adriamycina) i cisplatina (MVAC) standardna je terapija za metastatski karcinom mokraćnog mjehura. Ova terapija pokazuje značajnu toksičnost, zbog čega se mora napraviti omjer rizika i koristi. Najveća dozno ovisna toksičnost je mijelosupresija. Nove kombinirane terapije jednako su učinkovite kao i MVAC terapija, ali su manje toksične. Kombinacija gemcitabina i cisplatina je trenutno prva linija u liječenju metastatskog karcinoma mokraćnog mjehura. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila je primjenu PDL1 (ligand 1 programirane stanične smrti) inhibitora (atezolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab, pembrolizumab) za liječenje uznapredovalog urotelnog karcinoma (13).

1.3. GLIOBLASTOM

1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Glioblastom je najčešći i najzloćudnji tumor mozga koji čini oko 12-15% svih intrakranijskih neoplazmi i 50-60% svih astrocitnih tumora. U većini europskih i sjevernoameričkih zemalja, godišnja incidencija iznosi oko 2-3 novih slučajeva na 100.000 stanovnika. Može se pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi. Ipak, najčešće se javlja u odraslih osoba životne dobi 45-70 godina. U jednom preglednom istraživanju na 1003 biopsije glioblastoma, otkrivena je češća pojavnost tumora u muškaraca, s omjerom muškaraca i žena 3:2 (14).

U 2015. godini od karcinoma mozga, u Republici Hrvatskoj, oboljelo je 208 muškaraca (2%) i 188 žena (2%) (8).

Ova maligna bolest ima vrlo lošu prognozu. Bez terapije, pacijenti s glioblastomom umiru unutar 3 mjeseca od postavljanja dijagnoze. Pacijenti liječeni optimalnom terapijom, koja uključuje kirurško odstranjenje, radioterapiju i kemoterapiju, imaju prosječno preživljenje od oko 12 mjeseci, s manje od 25% pacijenata koji prežive do 2 godine i manje od 10% pacijenata koji prežive do 5 godina (14).

Etiologija glioblastoma u većini slučajeva ostaje nepoznata. Nasljedni gliomi čine oko 5% zloćudnih glioma, a manje od 1% glioma povezano je s poznatim genetskim sindromima (npr. neurofibromatoza, Turkotov sindrom ili Li-Fraumeni sindrom). Istraživanja povezanosti s ozljedama glave, N-nitrozo spojevima, opasnosti na radu i izloženosti elektromagnetskom polju nisu potvrđena (15).

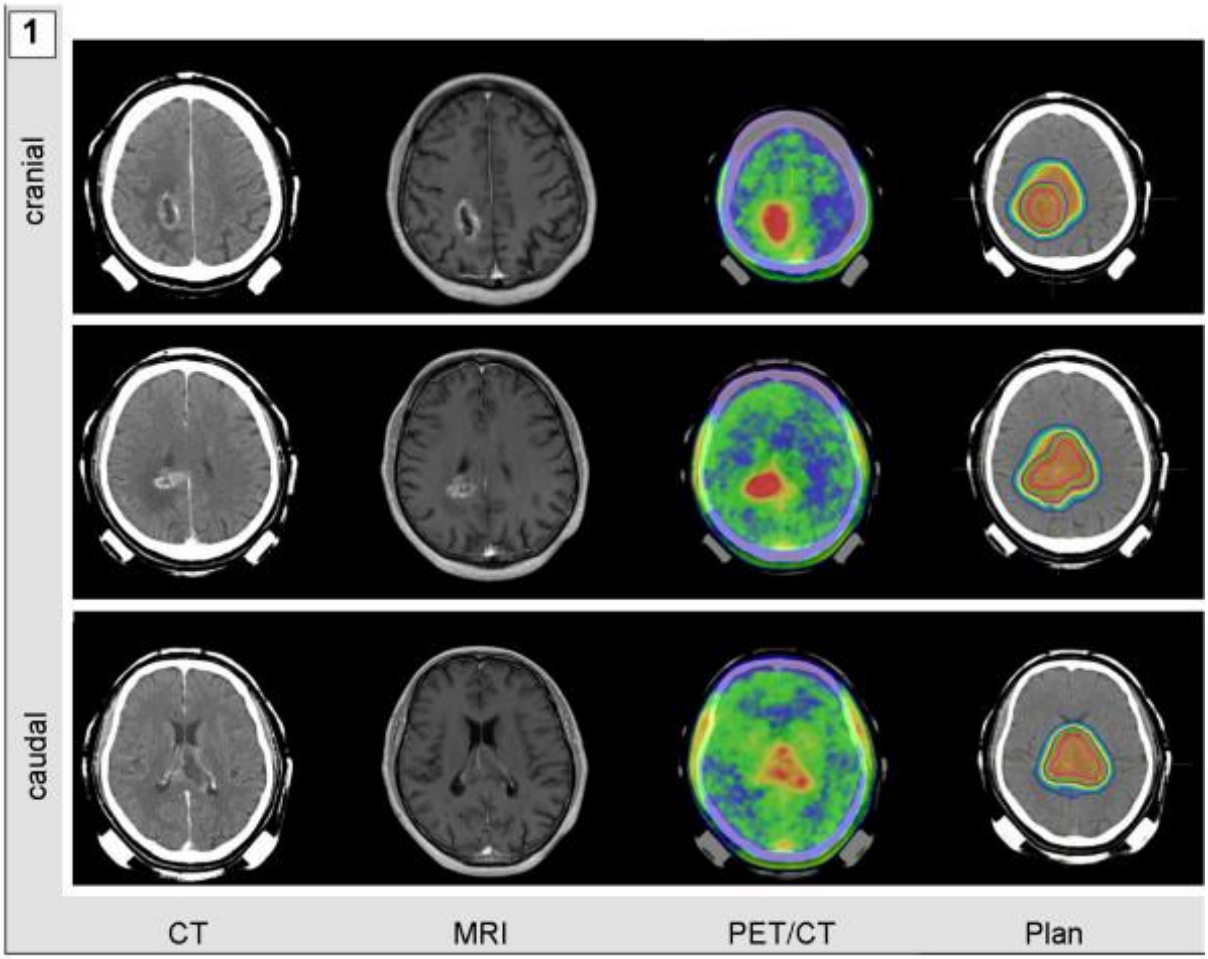
1.3.2. PATOHISTOLOGIJA

Glioblastom se sastoji od heterogene skupine slabo diferenciranih, neoplastičnih astrocita. Najčešće je lokaliziran u moždanim hemisferama, a mnogo rjeđe je smješten u moždanom deblu (osobito u djece) i kralježničnoj moždini. Ovi se tumori mogu razviti iz astrocitoma nižeg stupnja (WHO stupanj II) ili anaplastičnih astrocitoma (WHO stupanj III), ali mnogo češće se razvijaju *de novo*, bez ikakvih dokaza o manje zloćudnoj, prethodnoj tvorbi. Prema tome, glioblastomi mogu biti primarni ili sekundarni. Primarni glioblastomi su učestaliji u starijih osoba i ovi tumori nastaju *de novo*, a manifestiraju se nakon kratke kliničke povijesti, obično manje od 3 mjeseca. Sekundarni glioblastomi se češće javljaju u mlađih pacijenata, kao posljedica progresije primarne bolesti. Vrijeme potrebno za progresiju značajno varira, od manje od 1 godine do više od 10 godina, s prosječnim intervalom od 4-5 godina. Sve veći broj dokaza upućuje na to da su primarni i sekundarni glioblastomi dvije različite bolesti koje se razvijaju različitim genetskim putevima, pogađaju pacijente različite dobne skupine i drugačije reagiraju na terapiju. Od svih astrocitnih neoplazmi, glioblastomi sadrže najveći broj genetskih promjena, koje su u većini slučajeva posljedica akumulacije višestrukih mutacija (14).

1.3.3. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA

Klinička povijest pacijenata s glioblastomom je obično kratka zbog brze progresije bolesti. Uobičajeni simptomi koji se pojavljuju uključuju progresivni neurološki manjak, primjerice oslabljene motoričke funkcije, generalizirane simptome povećanog intrakranijalnog tlaka kao što su glavobolja, mučnina, povraćanje i kognitivno oštećenje, te napadaje. Neurološki simptomi i znakovi mogu biti opći ili žarišni, ovisno o lokalizaciji karcinoma. Opći neurološki simptomi su glavobolja, mučnina, povraćanje, promjene osobnosti i usporavanje kognitivne funkcije. Žarišni znakovi su hemipareza, gubitak vida, poremećaji drugih osjetila i afazija.

Ne postoji specifično laboratorijsko ispitivanje za dijagnozu glioblastoma. Snimanje mozga ima ključnu ulogu u postavljanju dijagnoze, a može uključivati kompjuteriziranu tomografiju (CT), magnetsku rezonancu (MR) s ili bez kontrastnog sredstva, pozitron emisijsku tomografiju (PET/CT), MR-spektroskopiju (MRS) i angiografiju mozga, koja nije nužna. Drugi dijagnostički postupci koji se mogu uzeti u obzir su elektroencefalografija, lumbalna punkcija, koja je inače kontraindicirana, ali ponekad neophodna za odstranjivanje limfoma, te analiza likvora, koja ne olakšava značajno dijagnozu glioblastoma. U većini slučajeva potpuno postavljanje dijagnoze nije ni praktično, ni moguće. Naime, ovi tumori nemaju jasno definirane rubove. Nastoje se proširiti lokalno i duž bijele tvari, stvarajući izgled više zloćudnih novotvorina ili multicentričnih glioma na snimkama (14).

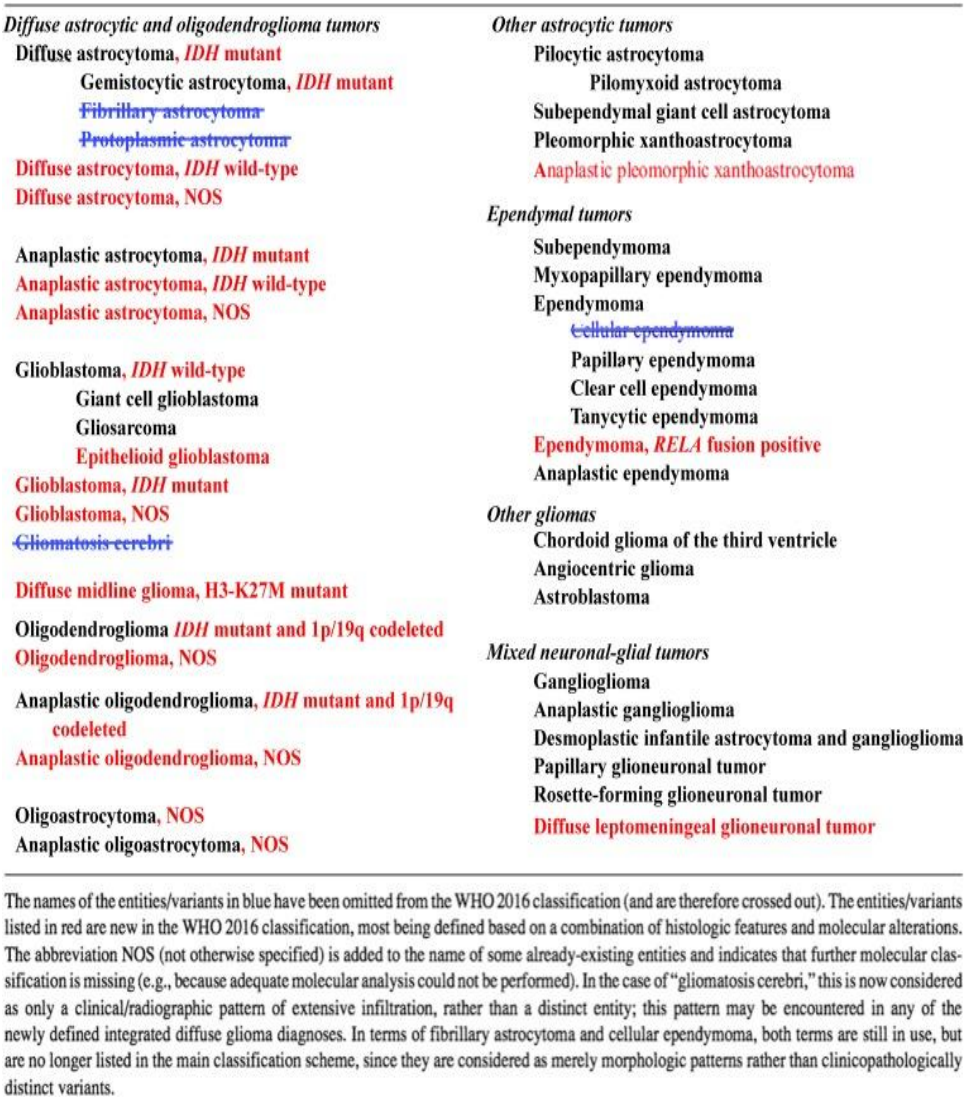


Slika 4. CT , MR i PET/CT snimke glioblastoma, te spojene snimke za plan radioterapije

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/Extensive-glioblastoma-multiforme-in-a-62-year-old-man-Contrast-agent-enhanced-CT-and_fig1_221902736

1.3.4. KLASIFIKACIJA TUMORA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

Temeljem novih spoznaja o genetskim karakteristikama pojedinih vrsta tumora i uključivanjem tih molekularnih parametara, napravljena je nova klasifikacija tumora središnjeg živčanog sustava. Prema novoj klasifikaciji WHO glioblastomi se dijele na glioblastome velikih stanica, gliosarkome, glioblastome IDH-divlji tip, koji odgovaraju primarnim glioblastomima, glioblastome IDH-mutant, koji odgovaraju sekundarnim glioblastomima i glioblastome nepoznatog IDH tipa, NOS (not otherwise specified). Ovoj podjeli pridružena je još jedna nova vrsta glioblastoma, epiteloidni glioblastom (16).



Diffuse astrocytic and oligodendroglioma tumors

Diffuse astrocytoma, *IDH* mutant
- Gemistocytic astrocytoma, *IDH* mutant
- ~~Fibrillary astrocytoma~~
- ~~Protoplasmic astrocytoma~~

Diffuse astrocytoma, *IDH* wild-type

Diffuse astrocytoma, NOS

Anaplastic astrocytoma, *IDH* mutant

Anaplastic astrocytoma, *IDH* wild-type

Anaplastic astrocytoma, NOS

Glioblastoma, *IDH* wild-type
- Giant cell glioblastoma
- Gliosarcoma
- Epithelioid glioblastoma

Glioblastoma, *IDH* mutant

Glioblastoma, NOS

~~Gliomatosis cerebri~~

Diffuse midline glioma, H3-K27M mutant

Oligodendroglioma *IDH* mutant and 1p/19q codeleted

Oligodendroglioma, NOS

Anaplastic oligodendroglioma, *IDH* mutant and 1p/19q codeleted

Anaplastic oligodendroglioma, NOS

Oligoastrocytoma, NOS

Anaplastic oligoastrocytoma, NOS

Other astrocytic tumors

Pilocytic astrocytoma
- Pilomyxoid astrocytoma

Subependymal giant cell astrocytoma

Pleomorphic xanthoastrocytoma

Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma

Ependymal tumors

Subependymoma

Myxopapillary ependymoma

Ependymoma
- ~~cellular ependymoma~~
- Papillary ependymoma
- Clear cell ependymoma
- Tanycytic ependymoma

Ependymoma, *RELA* fusion positive

Anaplastic ependymoma

Other gliomas

Chordoid glioma of the third ventricle

Angiocentric glioma

Astroblastoma

Mixed neuronal-glial tumors

Ganglioglioma

Anaplastic ganglioglioma

Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma

Papillary glioneuronal tumor

Rosette-forming glioneuronal tumor

Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor

The names of the entities/variants in blue have been omitted from the WHO 2016 classification (and are therefore crossed out). The entities/variants listed in red are new in the WHO 2016 classification, most being defined based on a combination of histologic features and molecular alterations. The abbreviation NOS (not otherwise specified) is added to the name of some already-existing entities and indicates that further molecular classification is missing (e.g., because adequate molecular analysis could not be performed). In the case of "gliomatosis cerebri," this is now considered as only a clinical/radiographic pattern of extensive infiltration, rather than a distinct entity; this pattern may be encountered in any of the newly defined integrated diffuse glioma diagnoses. In terms of fibrillary astrocytoma and cellular ependymoma, both terms are still in use, but are no longer listed in the main classification scheme, since they are considered as merely morphologic patterns rather than clinicopathologically distinct variants.

Slika 5. Razlike u klasifikacijskim sustavima WHO iz 2007. i 2016. godine

Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5398991/

1.3.5. LIJEČENJE

U posljednjih 25 godina postignut je skroman napredak u liječenju glioblastoma. S trenutno dostupnom terapijom nije moguće izlječenje od ove bolesti. Liječenje glioblastoma je palijativno, a uključuje kirurški zahvat, radioterapiju te istovremenu, adjuvantnu kemoterapiju temozolomidom. U pacijenata starijih od 70 godina, ponekad se razmatra manje agresivna terapija, uključujući samo zračenje ili temozolomid (14).

U potpornom liječenju simptoma glioblastoma koriste se antikonvulzivi i kortikosteroidi. Za liječenje napadaja obično se koriste levetiracetam, fenitoin i karbamazepin.

Levetiracetam se često koristi jer ne djeluje na citokrom P450, za razliku od fenitoina i karbamazepina, što može ometati djelovanje citostatika. Vazogeni edem mozga obično se liječi kortikosteroidima (npr. deksametazon), u kombinaciji s antiulkusnim lijekovima (17).

Kirurško liječenje uključuje potpuno uklanjanje (bolje preživljenje), djelomično uklanjanje i biopsiju tumora. S obzirom da izlječenje nije moguće ovim putem, ciljevi ove vrste terapije su postavljanje patološke dijagnoze, olakšanje simptoma i ukoliko je moguće, uklanjanje tumora u cjelosti kako bi se olakšala adjuvantna terapija.

Uz kirurški zahvat, dodatno liječenje radioterapijom produljuje preživljenje pacijenata, s tim da odgovor glioblastoma na ovu vrstu terapije varira. Intersticijska brahiterapija je ograničene upotrebe i rijetko se koristi. Radiosenzitizatori, kao što su noviji kemoterapijski lijekovi, molekularno ciljani lijekovi i antiangiogene tvari, mogu povećati terapijski učinak radioterapije. Upotreba radioterapije i/ ili kirurškog zahvata u liječenju recidiva je kontroverzna.

Optimalna kemoterapija za glioblastom još uvijek nije definirana, ali čini se da adjuvantna kemoterapija značajno pridonosi preživljenju više od 25% pacijenata. Sljedeći citostatici koriste se u liječenju glioblastoma: temozolomid, nitrozoureje (npr. karmustin), MGMT (O-6-metilgvanin-DNA metiltransferaza) inhibitori (npr. O-6-benzilgvanin), cisplatin, bevacizumab, sam ili s irinotekanom, za recidive, inhibitori tirozin kinaze (npr. gefitinib, erlotinib), te noviji lijekovi, uključujući gensku terapiju, peptidna i cjepiva dendritskih stanica, sintetske klorotoksine, radioaktivno označene lijekove i protutijela (14).

1.4. *LEPIDIUM SPP.*

Rod *Lepidium,* grbica, jedan je od najvećih biljnih rodova porodice *Brassicaceae* (*Cruciferae*), krstašice ili kupusnjače. Sadrži oko 175 do 220 različitih vrsta (18). Široko je rasprostranjen, prvenstveno u umjerenim i suptropskim područjima, uključujući Južnu Europu, Sredozemlje i Aziju. Rod je slabo zastupljen u arktičkim klimatskim područjima, a u tropskim područjima raste u planinama (19). Pojedine vrste (*L. latifolium*) udomaćene su u Sjevernoj Americi, Australiji i Meksiku, gdje su postale invazivne (20). *Lepidium* raste na sunčanim staništima: travnjacima, kamenjarskim pašnjacima, bušicima, uz putove, po kultiviranim i ruderalnim površinama, često i u blizini vodotoka (21).

Vrste ovog roda su najčešće trajnice s karakterističnim dugim korijenom. Široki prizemni listovi razlikuju se od uskih listova stabljike. Mali cvjetovi zeleno do bijele boje, sastavljeni su od četiri latice i uglavnom tvore grozdasti cvat. Sjemenke se nalaze u komuškama (22). Razmnožavaju se vegetativno i sjemenjem (20).

Biljne vrste roda *Lepidium* poznate su po svojoj nutritivnoj vrijednosti pa se koriste kao dodaci prehrani. Osim kao začinsko bilje i salata (*L. sativum*) imaju dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini u liječenju različitih stanja kao što su astma, bronhitis i kašalj (*L. sativum*) (23), bubrežni kamenci i bol u želucu (*L. latifolium*) (24), kao afrodizijak (*L. meyenii*) (25) itd. Provode se brojna istraživanja pojedinih vrsta za primjenu u medicini i mnogim drugim poljima.

Carstvo: Plantae
Podcarstvo: Cormobionta, više biljke, stablašice
Koljeno: Magnoliophyta (Spermatophyta), sjemenjače
Podkoljeno: Magnoliophytina (Angiospermae, Anthophyta), kritosjemenjače, cvjetnjače
Razred: Magnoliopsida (Magnoliatae, Dicotyledonae), dvosupnice
Podrazred: Dilleniidae
Red: Capparales
Porodica: Brassicaceae (Cruciferae), krstašice, kupusnjače
Rod: *Lepidium*
Vrsta: *Lepidium graminifolium, Lepidium latifolium*

1.4.1. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM*

Uskolisna ili travolisna grbica (*Lepidium graminifolium L.)*, poznata u narodu kao divlji hren i kreša, pripada porodici *Brassicaceae.* Uskolisna grbica je trajnica, rjeđe jednoljetnica, jako razgranjena i odrvenjela korijena te uspravnih i razgranjenih stabljika. Visoka je između 40 i 60 (80) cm. Prizemni su listovi duboko urezano nazubljeni ili rasperani, dok su listovi stabljike izmjenični, cjeloviti i linealno-lancetasti, dugi 1-4 cm i široki 1-5 mm. Cvjetići su promjera oko 1 mm, bijelih vjenčića građenih od četiri bijele latice, skupljeni u dugačak grozdasti cvat. Cvate od svibnja do rujna (21). Cvjetovi su dvospolni i oprašuju se insektima (26). Plod je jajasta ili eliptična, neokriljena, ušiljena komuška na vrhu s ostatkom

vrata plodnice, na dugačkom dršku otklonjena od stabljike. Naziv roda potječe od grčke riječi *lepis*, što u prijevodu znači ljuska, a odnosi se na oblik i položaj plodova na stabljici (21).

Grbice ponegdje nazivaju i biberikama, aludirajući na biber, jer im je okus veoma oštar i pikantan. Mlade, proljetne, prizemne rozete mogu se jesti. U Dalmaciji se grbice nazivaju "kreša" i pripremaju u proljeće kao svježa salata. Osim što se koristi kao salata ili začinska biljka, u Engleskoj je čest dodatak sendvičima, ova biljna vrsta već je stoljećima poznata u indijskoj i ajurvedskoj medicini. Mlijeko u kojem su prokuhane sjemenke ima laksativno djelovanje i rabi se za izbjegavanje poslijeporođajnih komplikacija (21).

Ekstrakt uskolisne grbice prema jednom istraživanju ima i insekticidno djelovanje (27).



Slika 6. *Lepidium graminifolium L.*

a) plod, b) cijela biljka, c) cvijet, d) list stabljike, e) stabljika s plodovima

Preuzeto s : http://dbiodbs.univ.trieste.it/carso/chiavi_pub26_palm?spez=817

1.4.2. *LEPIDIUM LATIFOLIUM*

Širolistna grbica (*Lepidium latifolium L.)* je trajnica s jako dugim, debelim korijenom koji je minimalno razgranat, a može činiti čak i do 40% ukupne mase biljke. Visoka je između 30 cm i 1 m, može narasti i do 2 m (21). Prizemni listovi su eliptično-ovalni ili duguljasti s nazubljenim krajevima, dok su listovi stabljike kraći, bez peteljke i cijelih rubova. Listovi

mogu biti prekriveni dlačicama, ali su uglavnom bez dlačica, voštani i sivo-zelene boje. Cvjetići građeni od bijelih latica i šest prašnika, tvore grozdasti cvat. Cvate od svibnja do rujna. Plod je jajasta ili eliptična komuška s dvije crveno-smeđe sjemenke (20).

Širolistna grbica je invazivna vrsta koja značajno utječe na okoliš i poljoprivredu. Širenjem na poljoprivredne kulture, žitarice i lucernu, smanjuje se vrijednost zemljišta, količina stočne hrane i kvaliteta sijena. Nadalje, korištenje herbicida dodatno povećava ekonomske gubitke. *Lepidium latifolium L.* mijenja ekosistem u kojem raste, a to su svojstva tla, povećana erozija tla i niži salinitet, te potiskivanje izvornih biljnih vrsta, čime se smanjuje stanište divljih životinjskih vrsta. Ona uspijeva kao invazivna vrsta jer je izrazito kompetitivna, prilagodljiva i ima sposobnost veće proizvodnje i iskorištavanja dušika od drugih biljnih vrsta (20).

Listovi, izdanak i plodovi biljke su jestivi (28). Širolistna grbica se ubraja u tzv. fitohranu. Naime, ova biljka je bogata nezasićenim masnim kiselinama, osobito linolenskom kiselinom, i glukozinolatima, osobito sinigrinom. Prisutnost velike količine sinigrina je od osobitog značaja, budući da njegov ragradni produkt alil izotiocijanat ima blagotvorne učinke na zdravlje. Veći sadržaj glukoze i proteina, zajedno s većim omjerom dušika i sumpora dodatno doprinose nutritivnoj vrijednosti. Osim hranjivih svojstava, pokazalo se da ima i značajnu antioksidacijsku aktivnost, zahvaljujući visokom udjelu fenola i flavonoida (29).

Tablica 3. Analiza ukupnih proteina, fenola, flavonoida i antioksidativnog kapaciteta lišća i korijenja u *Lepidium latifolium*
Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732271/

	Top Leaf	Middle Leaf	Bottom Leaf	Root
Total Protein (mg g $^{-1}$ FW)	29.3	39.4	28.1	25.8
Total Phenols (mg GAE g $^{-1}$)	32.2	35.4	37.0	20.8*
Total Flavanoids (mg QE g $^{-1}$)	59.6	61.3	53.8	26.2*
Antioxidant Capacity (% Inhibition)				
$O_2^{\cdot -}$	81.8	82.6	80.8	62.4*
$OH^{\cdot}$	37.7	41.7	40.6	41.6
DPPH	39.9	35.9	41.4	24.6*

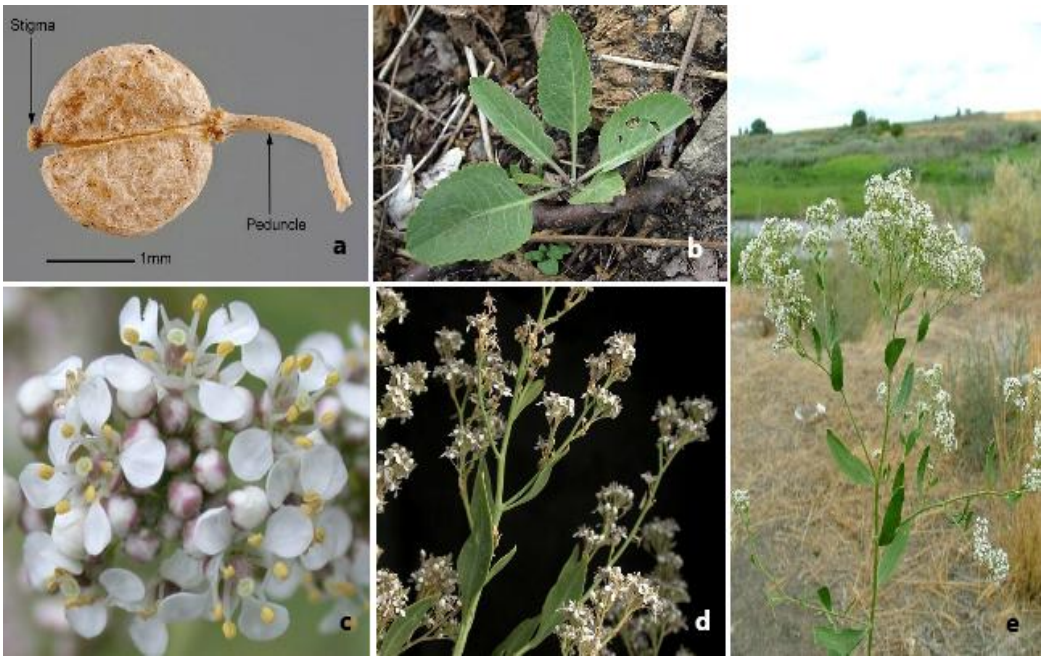
Širolistna grbica jedan je od učinkovitijih biljnih diuretika (20). Vodeni ekstrakt ove biljke primijenjen oralno i intraperitonealno, znatno je povećao izlučivanje urina u štakora u odnosu na kontrolnu skupinu. Također je zabilježen blagi porast u izlučivanju iona (30).

Djeluje također na benignu hiperplaziju prostate. Integralna suspenzija *Lepidium latifolium* primijenjena oralno, tijekom šest mjeseci, značajno je smanjila veličinu i volumen prostate u kastriranim štakorima, kojima je hiperplazija potaknuta steroidnim tretmanom (31).

In vitro i *in vivo* ispitivanjima ekstrakta *Lepidium latifolium,* odnosno biljnog soka na mišjem modelu, otkriveno je da širolistna grbica ima citotoksično djelovanje, a kao glavni, aktivni spoj odgovoran za antitumorsku aktivnost identificiran je epitionitril 1-cijano-2,3-epitiopropan (CETP). Antitumorska aktivnost širolistne grbice zasniva se na indukciji apoptoze tumorskih stanica (32).

U dolini Skardu, Pakistan, širolistna grbica je tradicionalno korištena kao biljni lijek za liječenje jetrenih i bubrežnih bolesti, u obliku čaja, te želučanih tegoba, kao prah od korijena (24). Danas se ekstrakt ove biljke koristi u fitoterapiji u tretiranju bubrežnih kamenaca i hiperuricemije, te doprinosi pravilnom radu prostate (33).

Ova biljna vrsta vrlo široke primjene ima i akaricidno djelovanje. Kao biorazgradivi biljni derivat, može se koristiti za kontrolu jednog nametnika, *Varroa destructor,* u kolonijama pčela, bez značajnijeg učinka na pčele (34).



Slika 7. *Lepidium latifolium L.*

a) plod, b) prizemni listovi, c) cvijet, d) stabljika s cvijećem, e) cijela biljka

Preuzeto s: https://www.cabi.org/isc/datasheet/115209 (a, b, d),
http://www.uniprot.org/taxonomy/153343 (c, e)

1.5. IZOTIOCIJANATI

Biljke roda *Lepidium* bogati su izvor hlapljivih sumporovih spojeva koji su većinom ragradni produkti glukozinolata. Glukozinolati su biološki neaktivni i nehlapljivi spojevi koji termičkom, kemijskom ili enzimskom hidrolizom daju produkte koji su vrlo aktivni i stoga, predmet brojnih istraživanja. Oštećenjem biljnog tkiva glukozinolati dolaze u kontakt s endogenim enzimom mirozinazom, pri čemu nastupa njihova hidroliza i nastaje niz hlapljivih i biološki aktivnih spojeva, među kojima su i izotiocijanati (35).

Opća kemijska formula izotiocijanata je R-N=C=S. To su hlapljivi spojevi, jakog okusa i arome koji nastaju pri neutralnom pH kada nestabilni aglukonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji. Količina izotiocijanata koja će nastati razgradnjom glukozinolata ponajprije ovisi o načinu pripreme, ali i postupanju s biljkom. Izotiocijanati su vrlo reaktivni, a zbog toksičnosti se smatraju pogodnim kandidatima za pesticidnu aktivnost.

Alil izotiocijanat je uglavnom odgovoran za okus i miris hrena ili gorušice pa se izotiocijanati još nazivaju i "gorušičinim uljem" (35).

Lepidium graminifolium sadrži alkilne, aromatske i metil-tio-alkilne glukozinolate koji hidrolizom daju nitrile, u većim količinama, i metil-tio-alkil izotiocijanate, u vrlo malim količinama (36). Glavni hlapljivi spojevi u sjemenkama i korijenu *Lepidium latifolium* su alil, benzil i sek-butil izotiocijanati, a u lišću i stabljici su alil izotiocijanat i 1-cijano-2-3-epitiopropan (37).

Pokazano je da izotiocijanati pružaju zaštitu od karcinogeneze, kardiovaskularnih i poremećaja središnjeg živčanog sustava, infekcije s *Helicobacter pylori,* te pomažu u obnovi kožne barijere. Produkt hidrolize sinigrina, alil izotiocijanat, je osobito pokazao antimikrobnu i antitumorsku aktivnost (29).

1.5.1. ALIL IZOTIOCIJANAT

Alil izotiocijanat (AITC) je hlapljivi organski spoj. Sastavni je dio senfa, hrena i wasabija te drugog povrća iz porodice kupusnjača. AITC je bezbojna do blijedo žuta tekućina koja je slabo topiva u vodi, ali dobro topiva u većini organskih otapala. AITC posjeduje brojna biokemijska i fiziološka djelovanja, uključujući citotoksično i karcinogeno kod visokih doza, a također je i modulator enzima koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika, uključujući karcinogene. Koristi se u prehrambenoj industriji kao aditiv i konzervans, te u agronomiji kao insekticid.

Biodostupnost AITC je vrlo visoka, skoro 90% ga se apsorbira nakon oralne primjene. Najvećim dijelom se metabolizira u merkapturičnu kiselinu i izlučuje putem urina.

AITC zaustavlja stanice humanog karcinoma mokraćnog mjehura u mitozi i potiče njihovu apoptozu. Zaustavljanje stanica u mitozi je povezano s povećanom ubikvitinacijom i razgradnjom α- i β-tubulina. AITC se izravno veže na višestruke cisteinske ostatke tubulina. Apoptoza potaknuta AITCom je posredovana s mitohondrijima i ona u potpunosti ovisi o zaustavljanju mitoze, a odvija se fosforilacijom Bcl-2 proteina. Prekomjerna ekspresija mutiranog Bcl-2 proteina spriječila je AITC da inducira apoptozu.

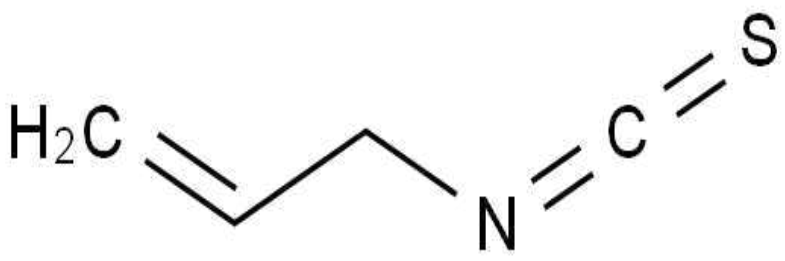
U *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima proučavano je protuupalno djelovanje AITCa. AITC je značajno smanjio razine proupalnih markera, npr. α- mRNA faktora tumorske nekroze, kao i

ekspresiju njihovih gena te razinu proteina p65 u jezgri. Sadašnji podaci upućuju na to da AITC ima jaku protuupalnu aktivnost u kultiviranim makrofagima, *in vitro,* ali slabo protuupalno djelovanje kod miševa, *in vivo*.

Alil izotiocijanat inhibira proliferaciju humanih stanica metastatskog kolorektalnog adenokarcinoma zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2/M fazi. Nakon produljenog izlaganja, inducira apoptozu posredovanu kaspazom. Još jednim *in vitro* ispitivanjem mehanizma djelovanja AITCa na stanicama Ehrlich ascites karcinoma, otkriveno je da AITC inhibira rast karcinoma antiangiogenim i proapoptotskim mehanizmima. Smanjio je proliferaciju tumorskih stanica, inhibirao je ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta, a također je i smanjio angiogenezu karcinoma. Zaustavio je rast tumorskih stanica indukcijom apoptoze i učinkovito je zaustavio stanični ciklus u G1 fazi.

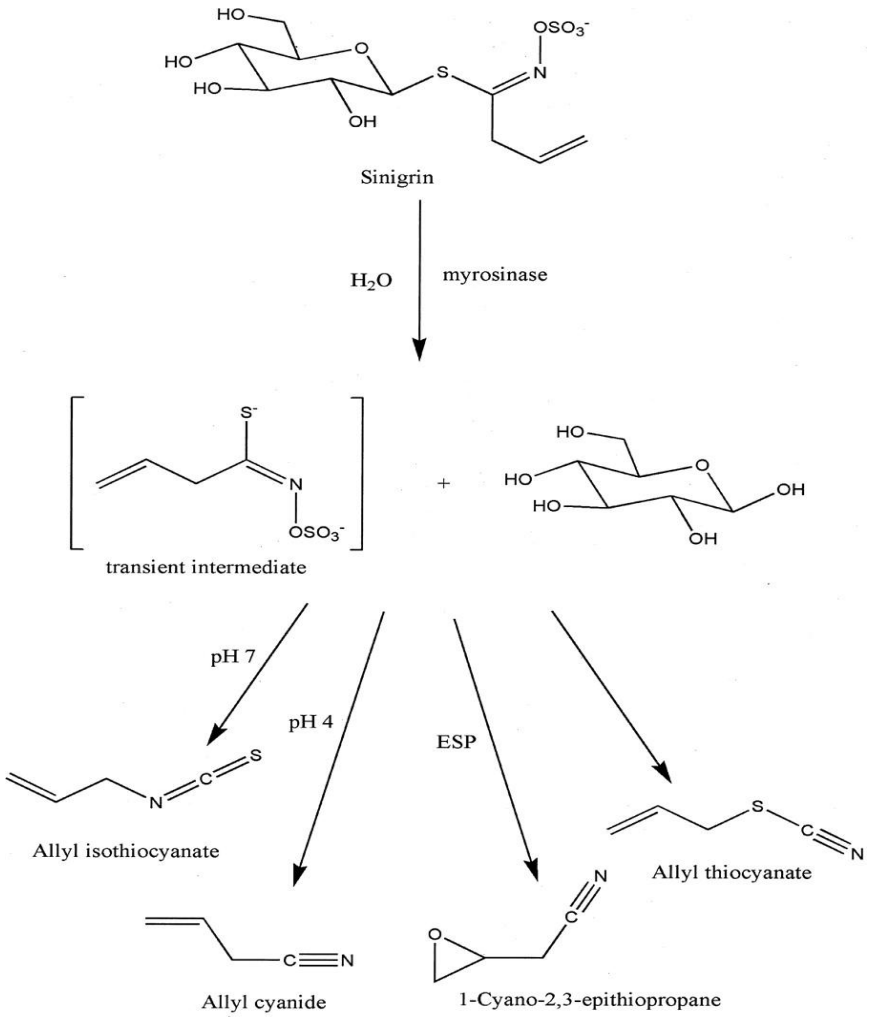
Brojnim drugim istraživanjima na različite stanične linije humanih karcinoma, melanom, maligni gliom, karcinom prostate, pokazano je antitumorsko djelovanje AICTa koje se zasniva na proapoptotskom i antiangiogenom djelovanju. Danas se ulaže dosta truda u ispitivanje citotoksičnog djelovanja ovog spoja zbog njegovog izrazitog potencijala.

AITC može izazvati iritaciju očiju i kože, uzrokujući crvenilo i bol, te iritaciju dišnog sustava (38).



Slika 8. Struktura alil izotiocijanata

Preuzeto s: https://alchetron.com/Allyl-isothiocyanate



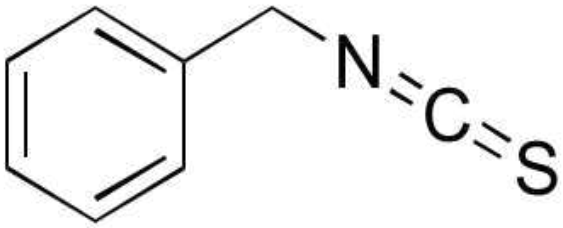
Slika 9. Hidroliza sinigrina

Preuzeto s: http://cebp.aacrjournals.org/content/13/1/125

1.5.2. BENZIL IZOTIOCIJANAT

Benzil izotiocijanat (BITC) je izotiocijanat iz porodice kupusnjača koji pokazuje imunomodulatorsko, antiparazitsko, antibiotsko, antioksidativno, anti-aterosklerotsko, antiangiogeno, anti-metastatsko, antitumorsko i kemopreventivno djelovanje. BITC inhibira ekspresiju IL-13 u bazofilima. Inducira enzime faze II biotransformacije, povećanjem hem-oksigenaze 1 (HO-1), glutationa i glutamat cistein ligaze. Također smanjuje razinu reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), aktivaciju NF-kB, adheziju monocita i ekspresiju intercelularne adhezijske molekule (ICAM-1), vaskularne adhezijske molekule (VCAM-1) i E-selektina. Ovaj spoj inhibira rast *Trypanosoma* i pokazuje antibakterijski učinak protiv *Campylobactera*, ometanjem metaboličkih procesa. *In vitro* i *in vivo*, BITC smanjuje rast i umnažanje tumora

povezano s prehranom bogatom mastima, a također inhibira i migraciju makrofaga te nakupljanje lipidnih kapljica. Ovaj spoj inhibira invaziju i migraciju stanica karcinoma skvamoznih stanica. Nadalje, inducira apoptozu i autofagiju u stanicama raka prostate. U različitim životinjskim modelima, BITC inhibira razvoj tumora mliječne žlijezde, smanjuje aktivaciju transkripcijskog faktora STAT3 i izlučivanje vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), matriksne metaloproteinaze 2 (MMP-2) i hipoksijom induciranog faktora 1-α (HIF-1α) (39).

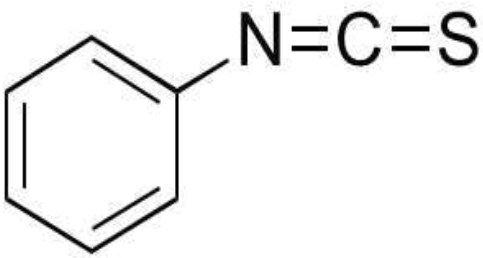


Slika 10. Struktura benzil izotiocijanata

Preuzeto s: https://www.lktlabs.com/product/benzyl-isothiocyanate/

1.5.3. FENIL IZOTIOCIJANAT

Fenil izotiocijanat (PITC) je zelena tekućina. Netopljiv je u vodi, a topljiv je u alkoholu i eteru. PITC ima antibiotsko, antiangiogeno, protuupalno, antioksidativno, antitumorsko i kemopreventivno djelovanje. Također pokazuje antibakterijski učinak protiv *Escherichie* i *Staphylococcusa*, mijenjanjem funkcije membrane i indukcijom stanične smrti. U drugim staničnim modelima, ovaj spoj potiskuje ekspresiju VEGF i upalnih citokina, a povećava ekspresiju IL-2 i tkivnog inhibitora metaloproteinaza (TIMP). Dodatno, PITC smanjuje količinu superoksid aniona kojeg je aktivirao forbol miristat acetat (PMA), inhibira lipidnu peroksidaciju, uklanja hidroksilne radikale i smanjuje stvaranje i broj čvrstih tumora u životinjskim modelima. Poput ostalih izotiocijanata, PITC djeluje kao induktor enzima faze II biotransformacije (40).



Slika 11. Struktura fenil izotiocijanata

Preuzeto s: https://www.lktlabs.com/product/phenyl-isothiocyanate/

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati citotoksično djelovanje ekstrakta, destilata te izoliranih spojeva iz biljnih vrsta *Lepidium latifolium* i *Lepidium graminifolium* na humane karcinomske stanice mokraćnog mjehura (UM-UC-3) i glioblastoma (LN229).

Hipoteze istraživanja:

1. *In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura i glioblastoma izotiocijanatima izoliranim iz biljnih vrsta *Lepidium latifolium* i *Lepidium graminifolium* smanjuje preživljenje tih stanica.

2. Citotoksični učinak ispitivanih izotiocijanata ovisi o vremenu inkubacije i koncentraciji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE LINIJE

In vitro ispitivanje citotoksičnog djelovanja izotiocijanata provodilo se na humanim karcinomskim stanicama UM-UC-3 i LN229. Obilježja ovih 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^{o}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 izotiocijanata iz roda *Lepidium* i ekstraktima grbice 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.



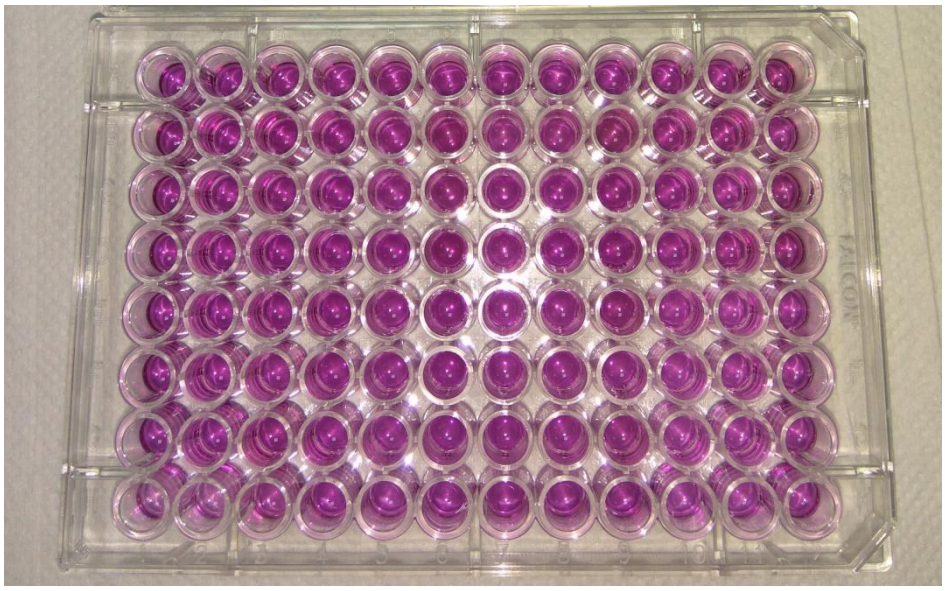
Slika 12. Vlažni inkubator za uzgoj stanica

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.

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



Slika 13. Ljubičasto obojenje nakon dodavanja DMSO



Slika 14. Spektrofotometar

Preuzeto s: http://www.biosan.lv/en/products/immunodiagnostics/elisa/hipo-mpp-96-microplate-photometer

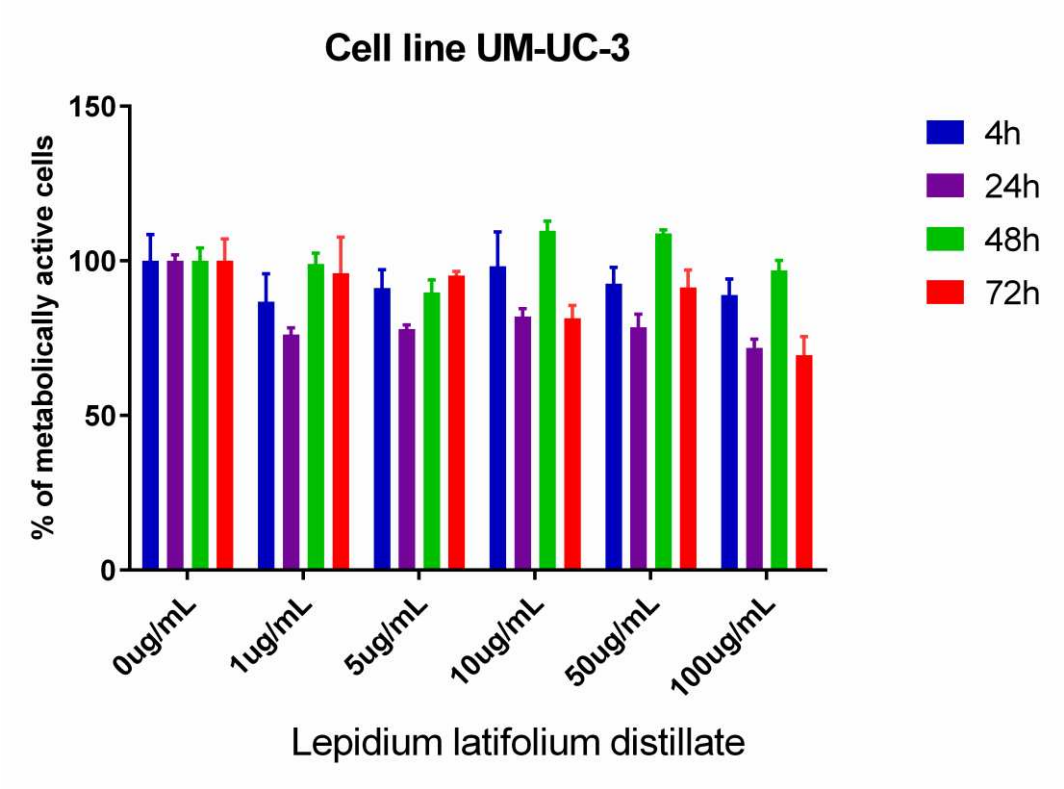
4. REZULTATI

Empirijska obrada:

Kao ograničenje istraživanja uzima se premala serija podataka.

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

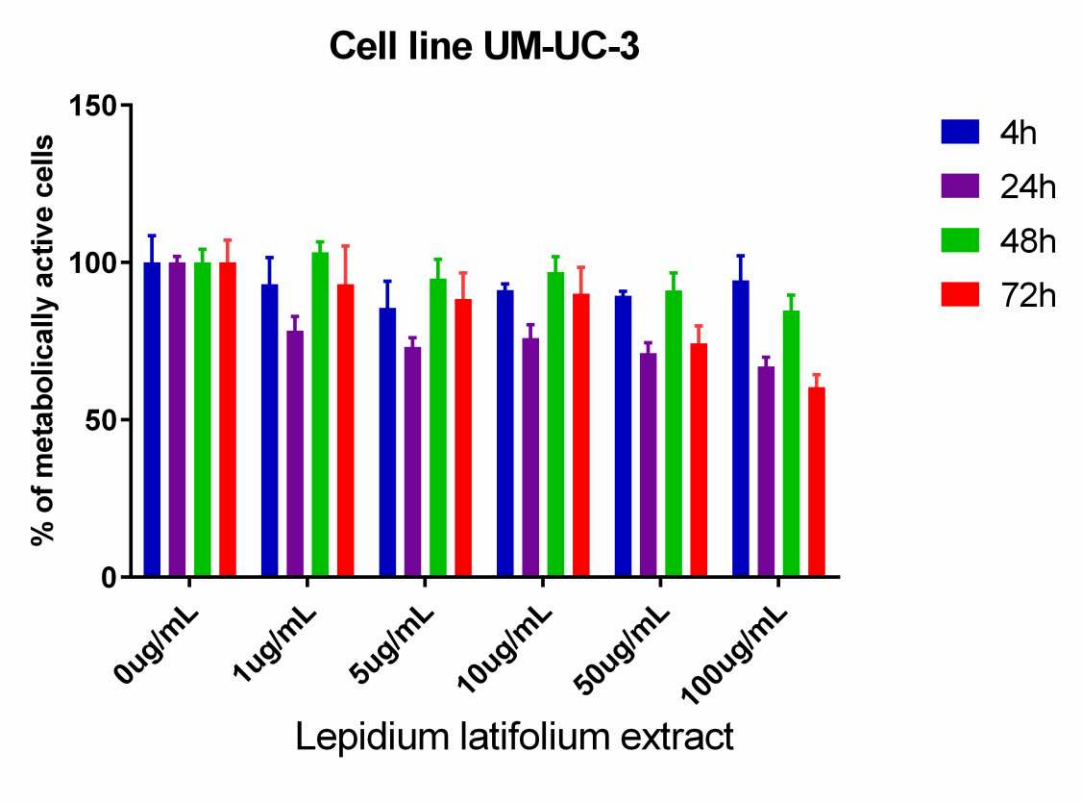
4.1.1. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* DESTILAT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	716.6	192.9		255.3

Slika 15. Destilat iz *Lepidium latifolium* ostvaruje slabcitotoksični učinak pri svim koncentracijama nakon 24h inkubacije. Daljnjom inkubacijom broj metabolički aktivnih stanica se neočekivano povećava.

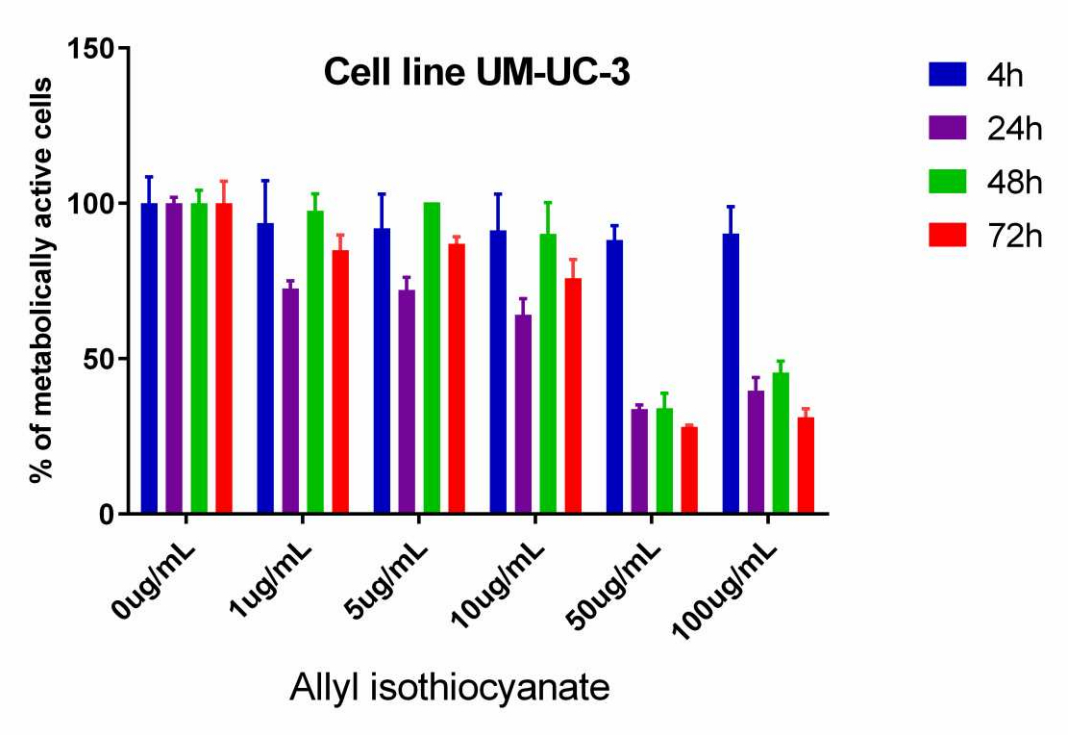
4.1.2. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* EKSTRAKT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	859.8	133.8	524.1	141.2

Slika 16. Ekstrakt iz *Lepidium latifolium* ostvaruje blagi učinak nakon 24h inkubacije pri svim koncentracijama, nakon čega dolazi do oporavka stanica. Maksimalni učinak postiže pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

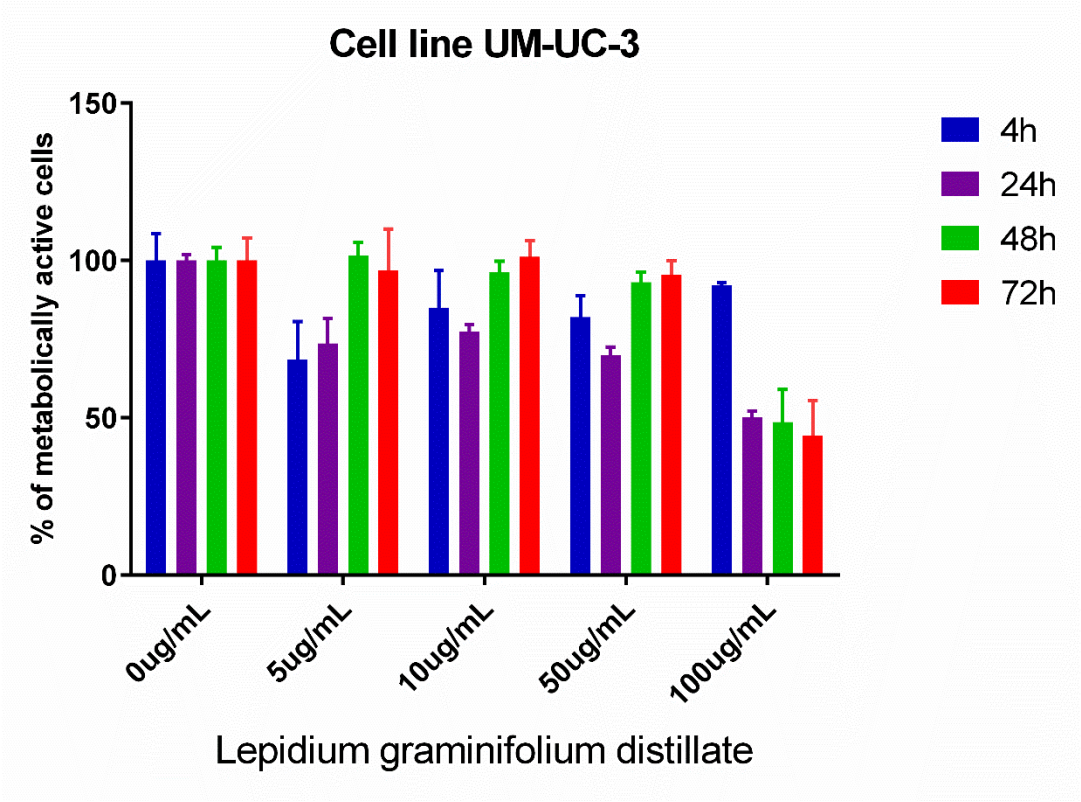
4.1.3. ALIL IZOTIOCIJANAT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	626.8	23.27	50.63	28.18

Slika 17. Alil izotiocijanat pokazuje značajan učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h inkubacije, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica. Najveći učinak ostvaruje pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 72 inkubacije.

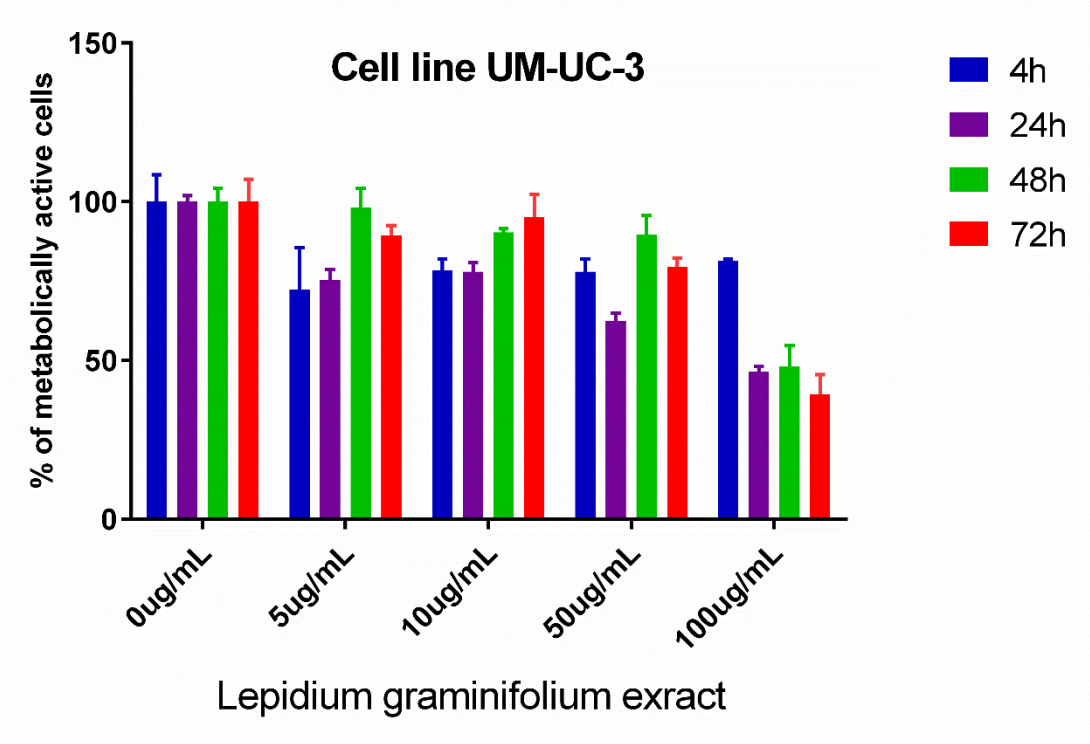
4.1.4. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* DESTILAT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	486.3	88.53	163.5	157.4

Slika 18. Destilat iz *Lepidium graminifolium* ostvaruje značajan citotoksični učinak pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom broj metabolički aktivnih stanica se smanjuje.

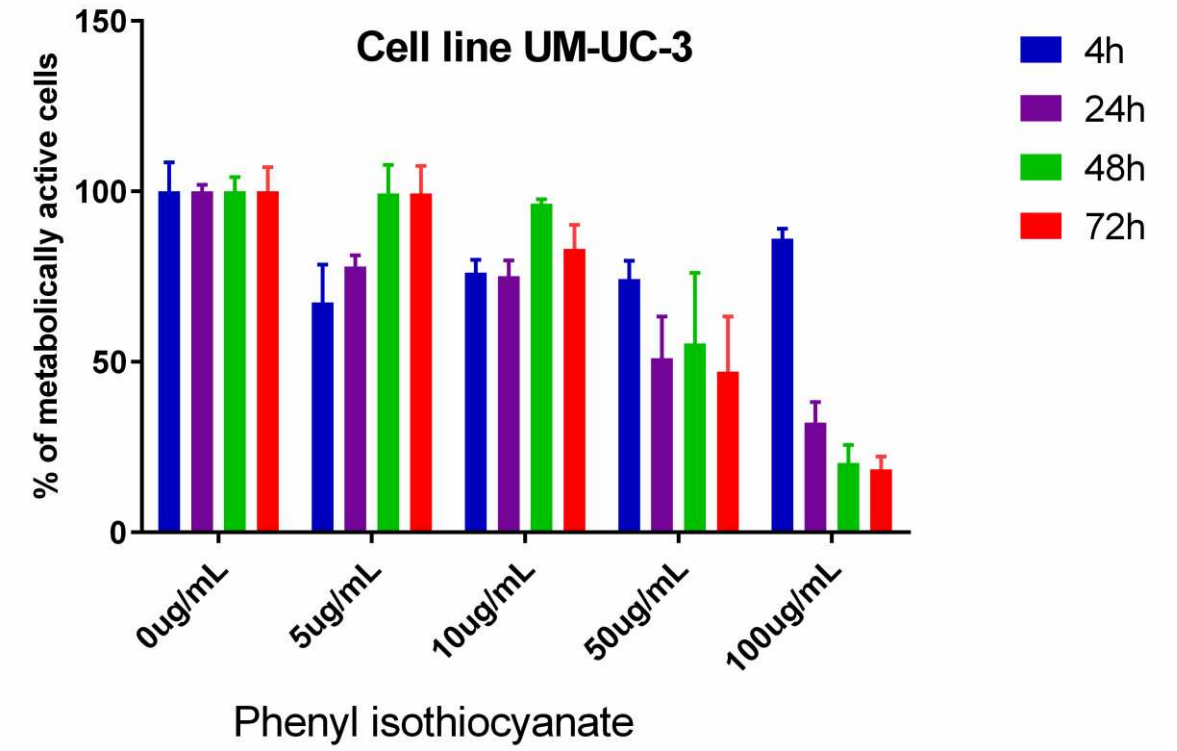
4.1.5. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* EKSTRAKT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	256	71.11	147.3	102.2

Slika 19. Ekstrakt iz *Lepidium graminifolium* postiže značajan učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica. Maksimalni učinak postiže pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h.

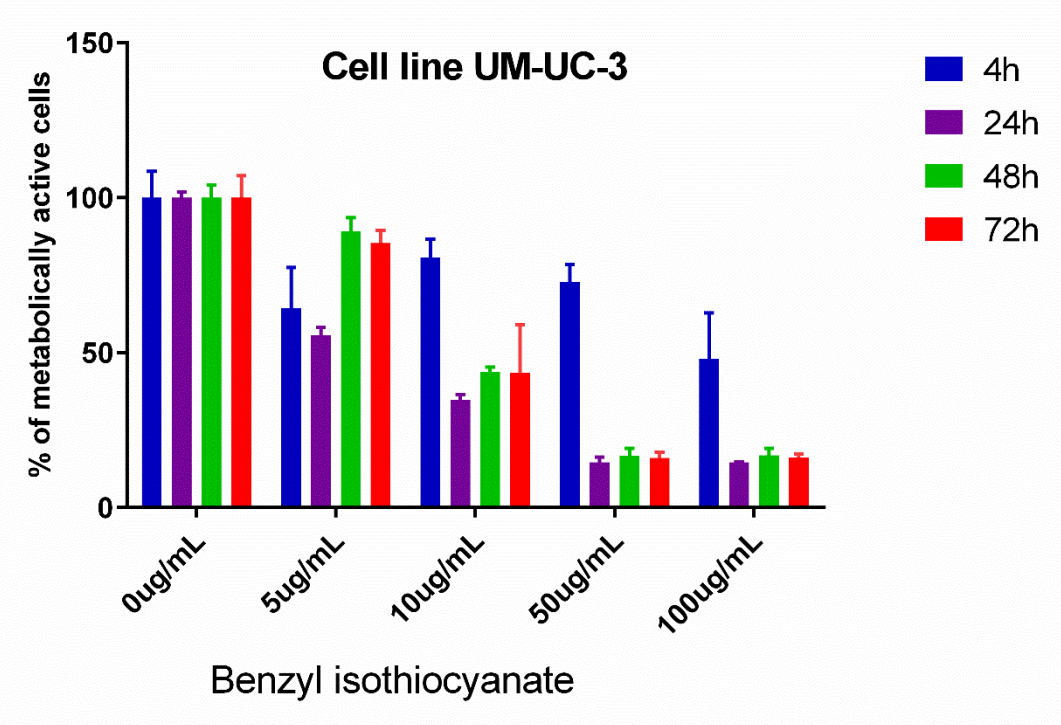
4.1.6. FENIL IZOTIOCIJANAT



UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	271.4	41.79	51.21	40.33

Slika 20. Fenil izotiocijanat ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h. Pri koncentraciji od 50 µg/mL, daljnjom inkubacijom dolazi do blagog oporavka stanica, a pri koncentraciji od 100 µg/mL, daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metaboliči aktivnih stanica.

4.1.7. BENZIL IZOTIOCIJANAT

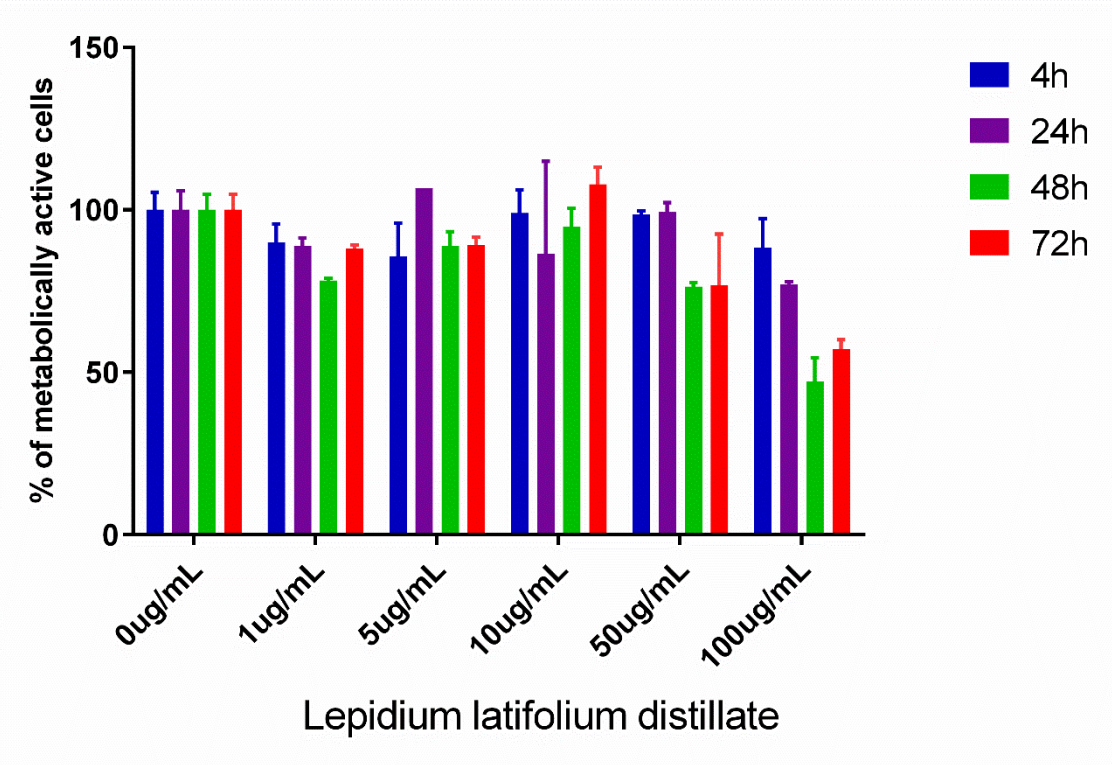


UM-UC-3	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	88.15	6.225	13.16	12.3

Slika 21. Benzil izotiocijanat pokazuje značajan učinak nakon 24h inkubacije pri svim koncentracijama, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica. Najveći učinak ima pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 24h.

4.2. GLIOBLASTOM-STANIČNA LINIJA LN229

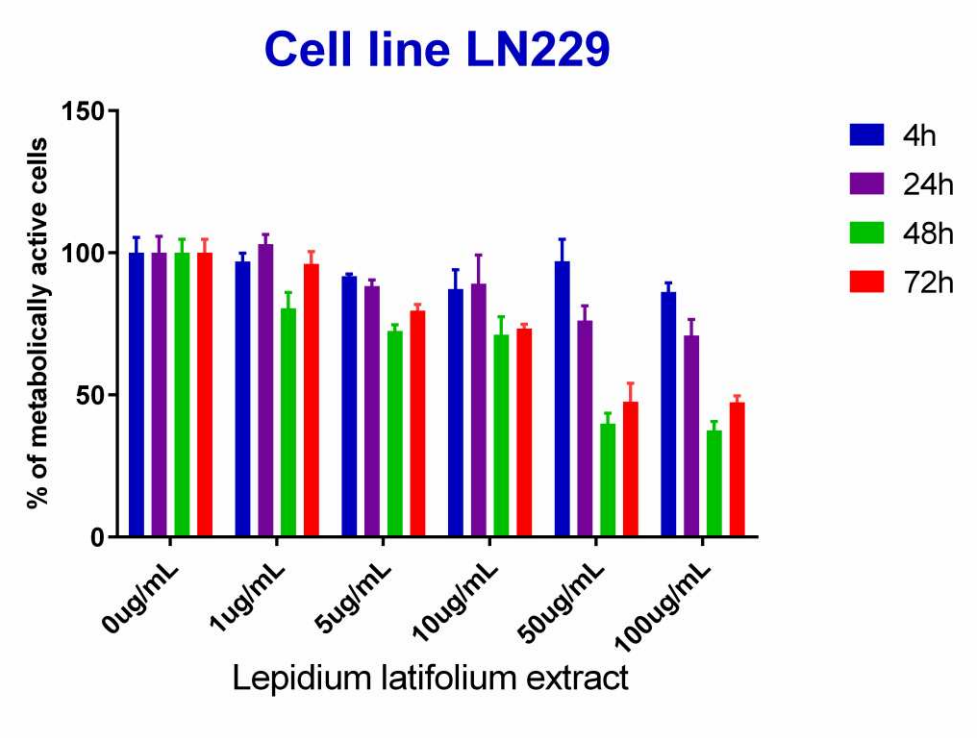
4.2.1. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* DESTILAT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	866.2	446.5	110.8	152.8

Slika 22. Destilat iz *Lepidium latifolium* ostvaruje blagi učinak pri koncentracijama od 1 µg/ml i 50 µg/mL nakon 48h, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica. Najveći učinak ostvaruje pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 48h, nakon čega također dolazi do blagog oporavka stanica.

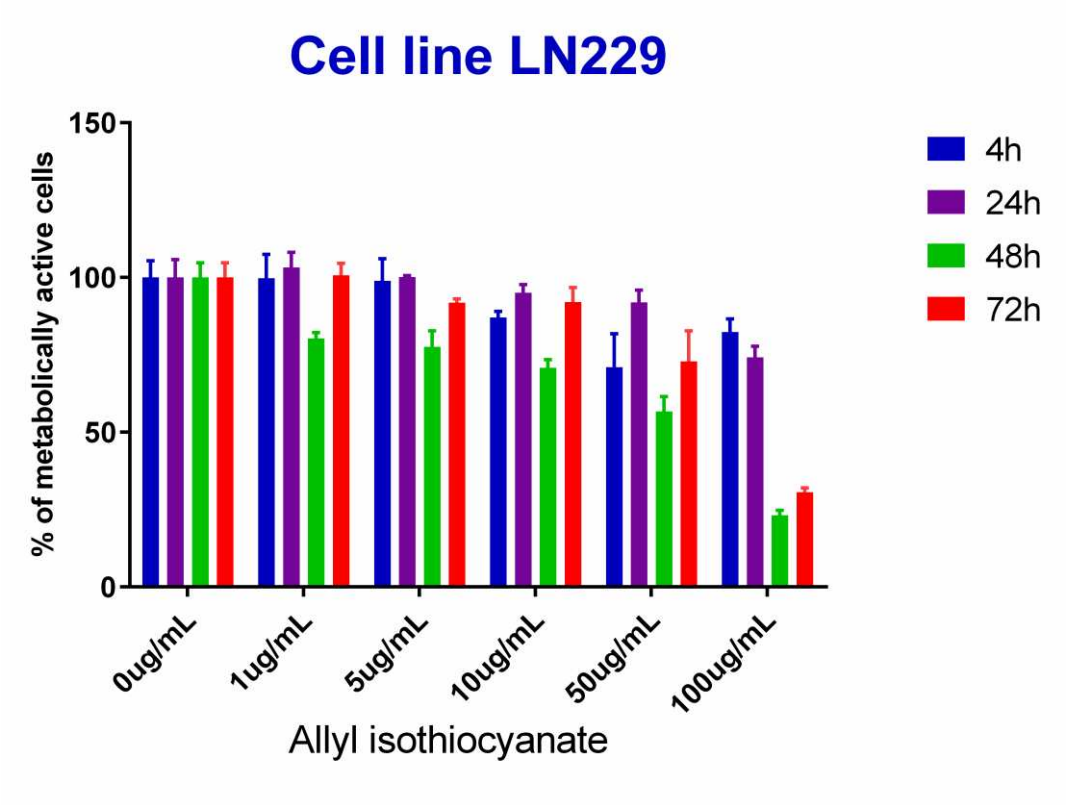
4.2.2. *LEPIDIUM LATIFOLIUM* EKSTRAKT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	648.5	195.7	30.88	50.71

Slika 23. Ekstrakt iz *Lepidium latifolium* ostvaruje blagi učinak pri koncentracijama od 5 µg/mL i 10 µg/mL nakon 48h, nakon čega se obnavlja broj stanica. Pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL ostvaruje značajan učinak nakon 48h, nakon čega se smanjuje broj metabolički aktivnih stanica.

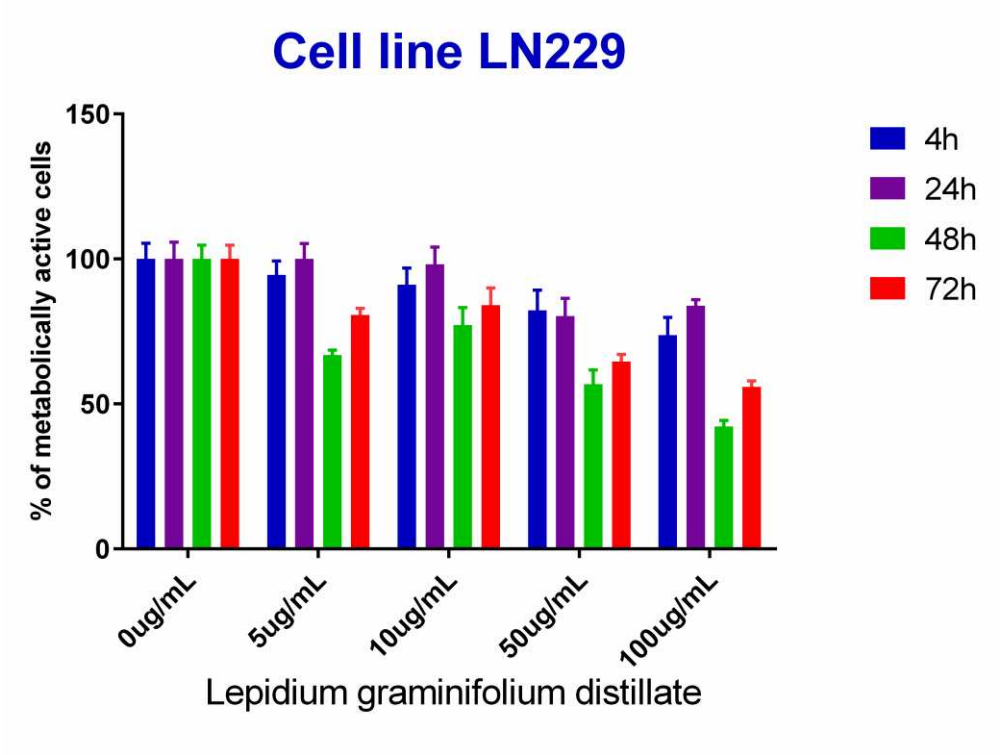
4.2.3. ALIL IZOTIOCIJANAT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	259.5	337	36.5	77.19

Slika 24. Alil izotiocijanat postiže značajan učinak pri koncentraciji od 10 µg/mL, nakon 48h, i 50 µg/mL, nakon 4h, nakon čega se povećava broj metabolički aktivnih stanica. Najveći učinak pokazuje pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 48h, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica.

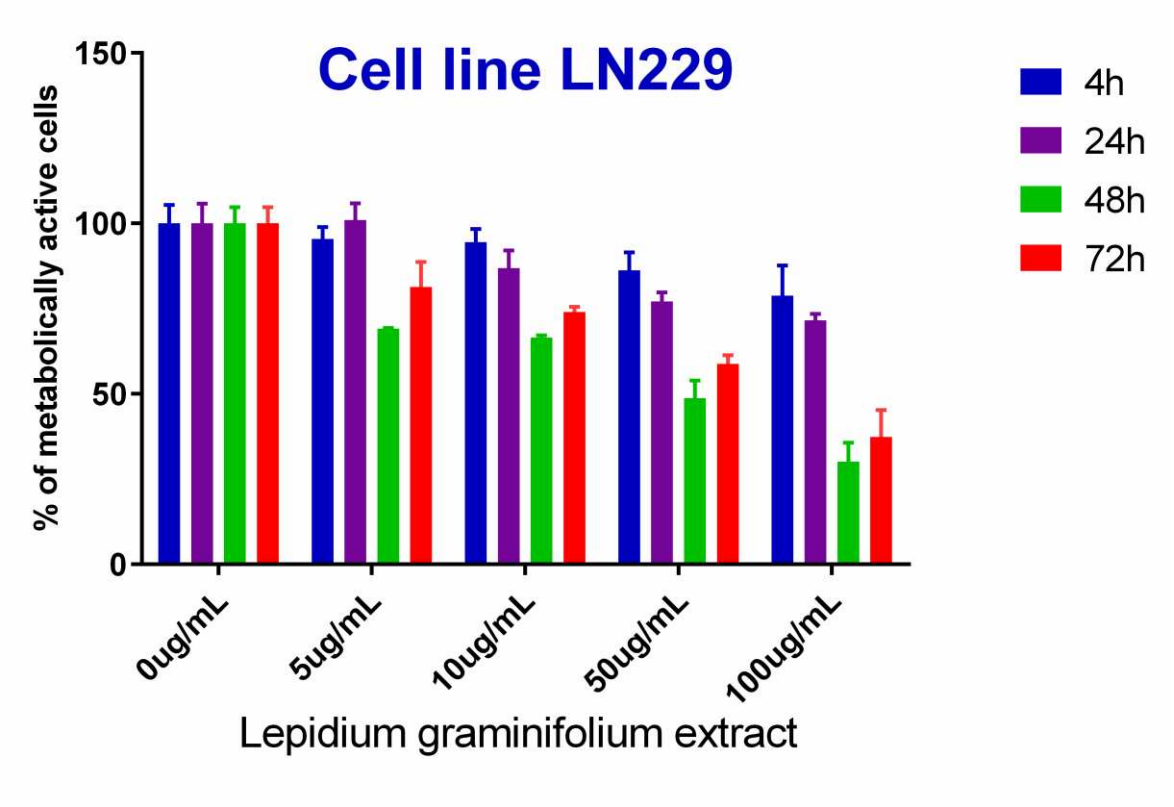
4.2.4. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* DESTILAT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	252.6	378	53.92	98.07

Slika 25. *Lepidium graminifolium* destilat pokazuje značajan učinak pri svim koncentracijama nakon 48h. Daljnjom inkubacijom dolazi do blagog oporavka metabolički aktivnih stanica.

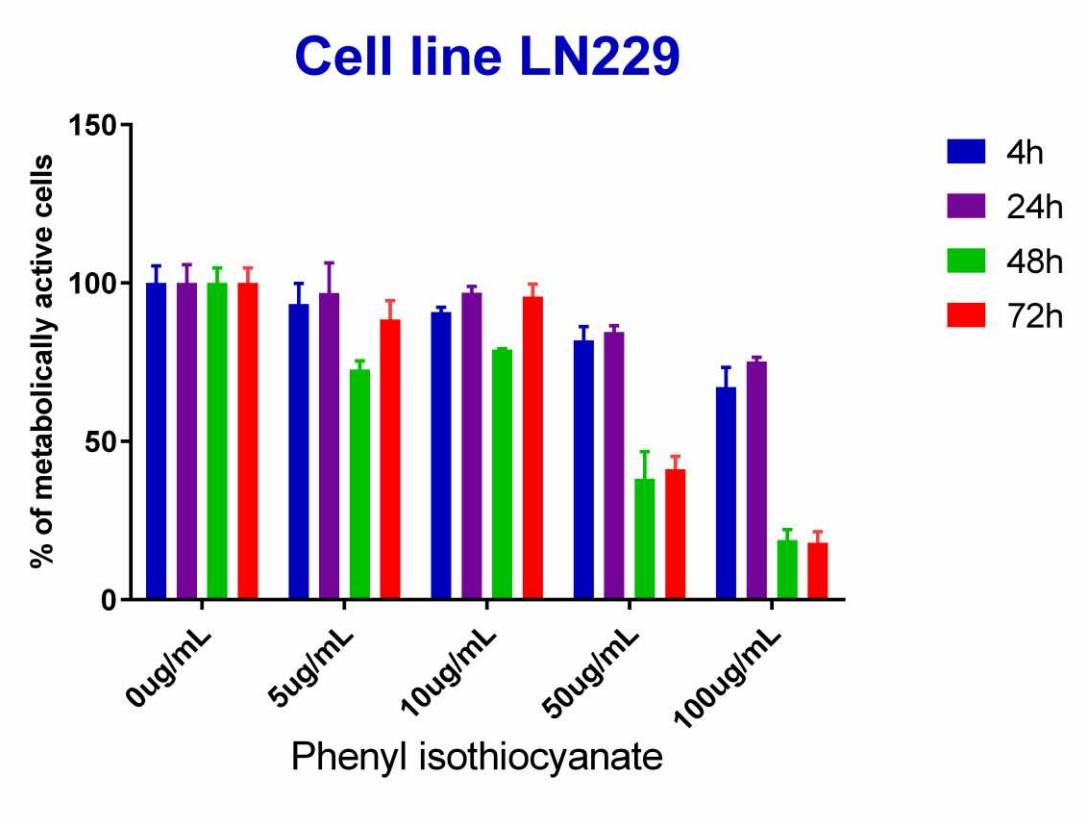
4.2.5. *LEPIDIUM GRAMINIFOLIUM* EKSTRAKT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	343.8	209.2	30.71	54.37

Slika 26. *Lepidium graminifolium* ekstrakt ostvaruje značajan učinak pri svim koncentracijama nakon 48h inkubacije, nakon čega dolazi do blagog oporavka metaboliči aktivnih stanica.

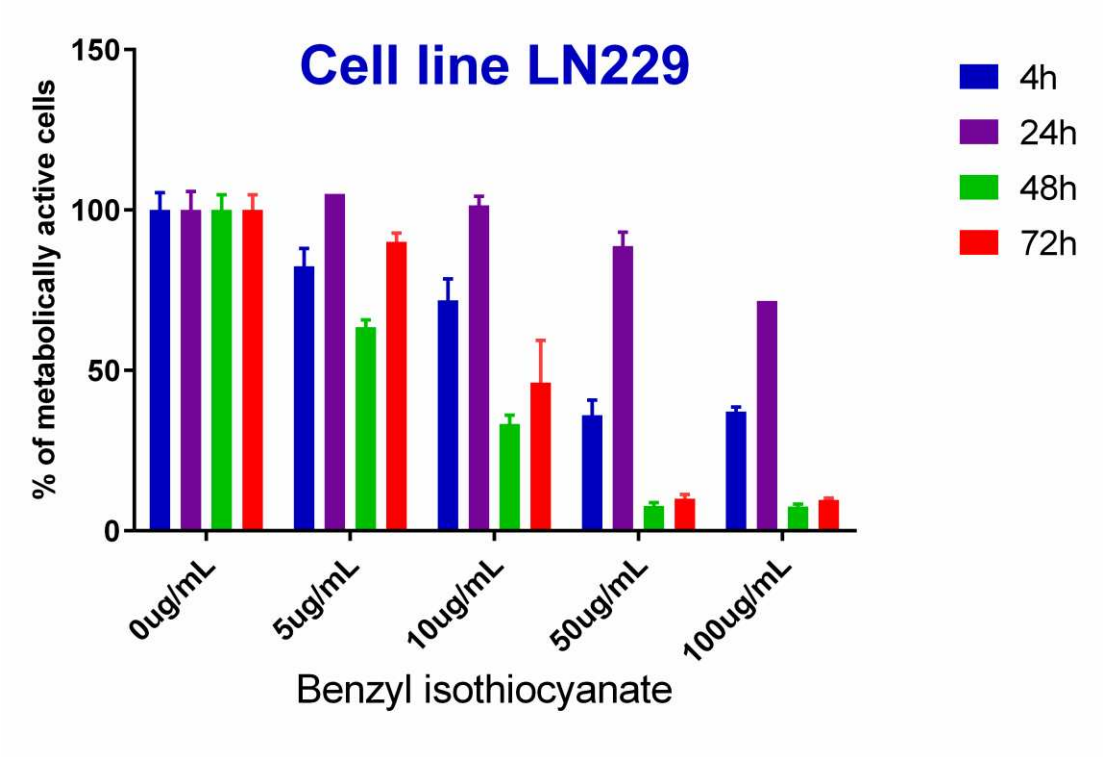
4.2.6. FENIL IZOTIOCIJANAT



LN229	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	202.8	292.9	26.88	36.86

Slika 27. Fenil izotiocijanat pokazuje značajan učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 48h. Pri koncentraciji od 50 µg/mL daljnjom inkubacijom dolazi do oporavka stanica, a pri koncentraciji od 100 µg/mL daljnjom inkubacijom broj metabolički aktivnih stanica se smanjuje.

4.2.7. BENZIL IZOTIOCIJANAT

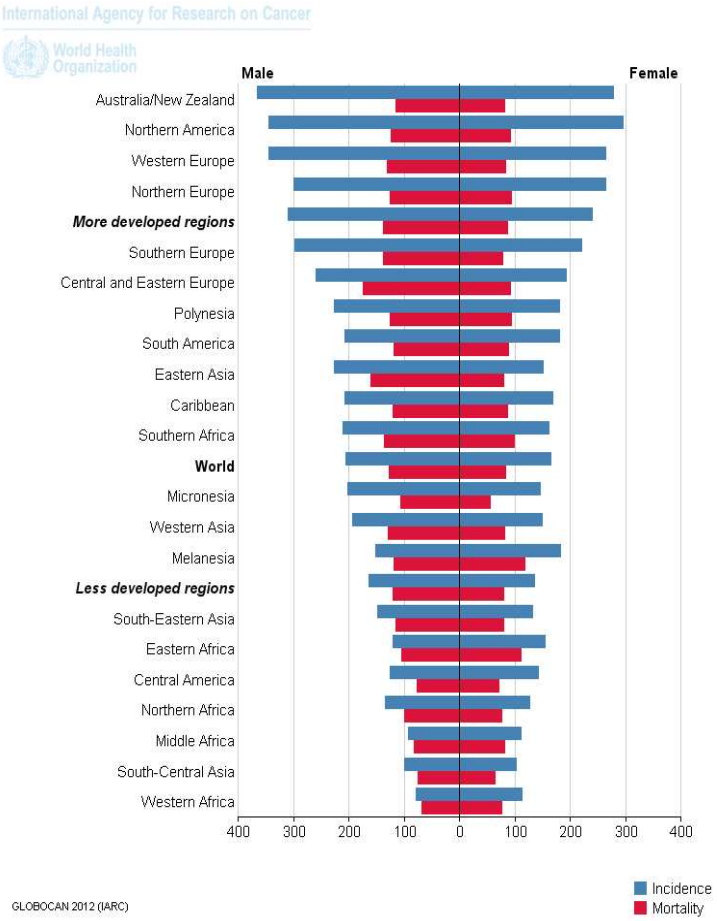


LN229	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	33.16	339.3	6.478	12.29

Slika 28. Benzil izotiocijanat ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 5 µg/mL nakon 48h i 10 µg/mL nakon 4h, nakon čega dolazi do blagog oporavka stanica. Pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL učinak se ostvaruje nakon 4h, nakon čega dolazi do oporavka stanica. Najveći učinak postiže pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 48h.

5. RASPRAVA

Karcinom je generički izraz za veliku skupinu bolesti karakteriziranih rastom abnormalnih stanica izvan njihovih uobičajenih granica, koje se zatim mogu proširiti na susjedne dijelove tijela i/ili druge organe. (41). U 2012. godini diljem svijeta zabilježeno je 14,1 milijuna novih slučajeva karcinoma, 8,2 milijuna smrtnih slučajeva i 32,6 milijuna slučajeva s petogodišnjim preživljenjem. Ukupna dobno standardizirana stopa incidencije karcinoma je skoro za 25% viša u muškaraca nego u žena, s godišnjim stopama incidencije od 205 i 165 na 100.000 stanovnika (42). Prema sadašnjim podatcima, između 30% i 50% smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomom moglo bi se spriječiti mijenjanjem ili izbjegavanjem ključnih rizičnih čimbenika, uključujući izbjegavanje duhanskih proizvoda, smanjeno konzumiranje alkohola, održavanje zdrave tjelesne težine, redovitu tjelovježbu i izbjegavanje rizičnih čimbenika povezanih s infekcijama. Da bi se smanjili invaliditet, patnja i mortalitet od karcinoma, potrebni su učinkoviti i pristupačni programi rane dijagnoze, praćenja, liječenja i palijativne njege (41).



Slika 29. Približne stope incidencije i mortaliteta od karcinoma u svijetu na 100.000 stanovnika

Preuzeto s: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

Karcinom mokraćnog mjehura je 9. najčešći maligni tumor u svijetu. U mnogim europskim zemljama stope incidencije su porasle, dok je smrtnost opala, osobito u razvijenim zemljama. Karcinom mokraćnog mjehura znatno opterećuje zdravstveni sustav zbog visoke prevalencije, te učestalih recidiva i progresije bolesti koji se javljaju unatoč terapiji (7). Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura je viša u muškaraca (7. najčešći karcinom) nego u žena (19. najčešći karcinom), te je skoro tri puta viša u razvijenim zemljama nego u nerazvijenim. Samo 7% slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura u zapadnim zemljama, povezano je s genetskim čimbenicima, što upućuje na to da faktori rizika povezani s životnim stilom, okolišem i profesionalnoj izloženosti, igraju važnu ulogu u razvoju ove bolesti. Dobro poznati čimbenici rizika su pušenje, profesionalna izloženost raznim spojevima i infekcija sa *Schistosoma Haematobium.* Dodatni predloženi čimbenici rizika, između ostalog, su i konzumiranje alkohola i kave, nizak unos voća, povrća, selena i vitamina E, zagađena voda za piće te određeni medicinski postupci (43).

Glioblastom je jedan od najzloćudnijih karcinoma središnjeg živčanog sustava, koji unatoč napretku u liječenju uglavnom ostaje neizlječiv. Iako je glioblastom rijetka bolest s globalnom incidencijom manjom od 10/100.000 stanovnika, loša prognoza sa stopom preživljenja od 14-15 mjeseci od dijagnoze, čini ga važnim javnozdravstvenim problemom. Stopa incidencije viša je u muškaraca nego u žena, te je viša u razvijenim zemljama nego u nerazvijenim (44). Čimbenici rizika uključuju prethodnu radioterapiju, smanjenu osjetljivost na alergiju, imunosne čimbenike i gene, kao i neke pojedinačne nukleotidne polimorfizme otkrivene genomskom analizom (45).

Lepidium latifolium je biljna vrsta iz porodice krstašica koja ima veliki potencijal u liječenju i prevenciji humanih karcinoma. *In vitro* i *in vivo* ispitivanjima pokazano je da *Lepidium latifolium* ima citotoksično djelovanje koje se zasniva na indukciji apoptoze tumorskih stanica. Glavni, aktivni spoj je epitionitril 1-cijano-2,3-epitiopropan (CETP), ali osim ovog spoja grbica sadrži i izotiocijanate koji također pokazuju antitumorsko djelovanje (32).

Povrće iz porodice kupusnjača bogat je izvor izotiocijanata koji posjeduju obećavajuća kemopreventivna svojstva protiv karcinoma mokraćnog mjehura i njegovih recidiva. Kemopreventivni mehanizmi izotiocijanata uključuju promjene na upalnim proteinima povezanim s karcinomom, zaustavljanje staničnog ciklusa, staničnu smrt, inhibiciju

angiogeneze, invazije i metastaziranja zajedno s promjenama na enzimima koji sudjeluju u metabolizmu karcinogena (46).

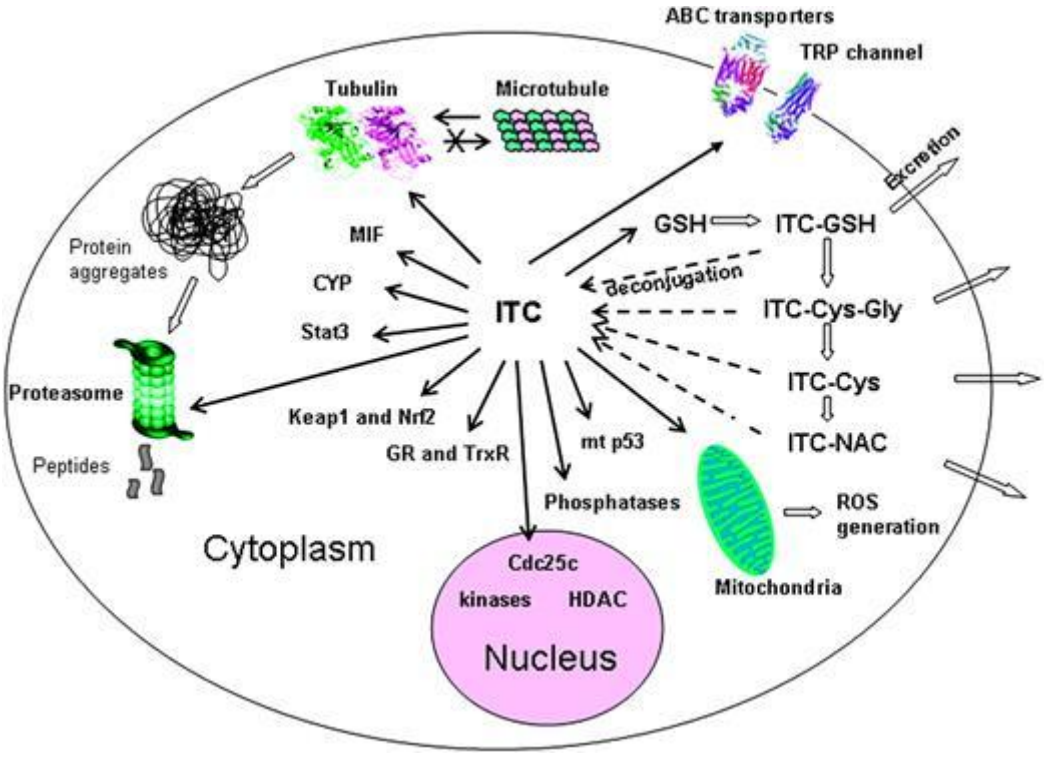
Alil izotiocijanat (AITC) je spoj koji nalazimo u brojnim, svakodnevno konzumiranim kupusnjačama, a pokazuje značajno antitumorsko djelovanje. Prema dostupnim podacima, ovaj spoj ima izrazito obećavajuće djelovanje na prevenciju i/ ili liječenje karcinoma mokraćnog mjehura. Iako prema sadašnjim rezultatima antitumorsko djelovanje AITCa nije niti stanično, niti tkivno specifično, nedavno je otkriveno da se AITC selektivno izlučuje u tkivu mokraćnog mjehura urinarnom ekskrecijom gdje potencijalno inhibira razvoj karcinoma i njegovo širenje u mišićno tkivo na ortotopičnom mišjem modelu karcinoma mokraćnog mjehura. Nadalje, prah od sjemenki gorušice koji je bogat AITCom također snažno inhibira razvoj i širenje karcinoma mokraćnog mjehura *in vivo*. AITC zaustavlja stanice humanog karcinoma mokaćnog mjehura u mitozi i potiče njihovu apoptozu fosforilacijom Bcl-2 proteina (47). AITC ima značajno citotoksično djelovanje na tumorskim stanicama, dok je za zdrave, epitelne stanice mokraćnog mjehura manje toksičan (48). Za razliku od taksola i vinblastina, koji se široko koriste u liječenju karcinoma, a djeluju na način da zaustavljaju mitozu stabilizacijom ili destabilizacijom mikrotubula, AITC ne utječe na stabilnost mikrotubula, već razgrađuje α- i β-tubulin. Prema tome, AITC predstavlja novu skupinu blokatora mitoze (47).

Alil izotiocijanat pokazuje citotoksično djelovanje na različite karcinome u *in vitro* uvjetima. Prema jednom ispitivanju značajno je smanjio proliferaciju i preživljenje stanica humanog karcinoma mozga, glioma. Zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi, smanjuje aktivnost CDK1/ciklina B i razine proteina, te potiče apoptozu tumorskih stanica (49).

Benzil izotiocijanat (BITC) inhibira nastanak karcinoma smanjenjem aktivacije karcinogena i/ ili povećanjem detoksikacije aktiviranih, karcinogenih međuprodukata, te sprječava razvoj karcinoma mijenjanjem različitih procesa nužnih za progresiju karcinoma. BITC inhibira proliferaciju tumorskih stanica zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2/M fazi, te selektivno potiče njihovu apoptozu. Također ima i antiangiogeno djelovanje i potiče autofagiju tumorskih stanica. BITC inhibira epitelno-mezenhimalni prijelaz (eng. epithelial mesenchymal transition, EMT), proces koji je uključen u progresiju karcinoma u invazivni oblik. Nedavna istraživanja pokazala su da tretman BITCom mijenja ekspresiju miRNA-221 i miRNA-375, koje su abnormalno izražene u karcinomu gušterače, na način da stanice karcinoma gušterače iz hiperproliferativnog oblika prelaze u hipoproliferativni oblik. BITC također povećava i osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapiju (50). BITC ima

citotoksično djelovanje na mnoge humane, tumorske stanice, između ostalog i na stanice glioblastoma. Potaknuo je apoptozu tumorskih stanica glioblastoma, stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i oslobađanje Ca^{2+}, smanjio je membranski potencijal mitohondrija i potaknuo aktivaciju kaspaza -8, -9 i -3. On inducira proapoptotske proteine (Bax, Bid, Bak), a inhibira antiapoptotske proteine (Bcl-2, Bcl-x) u stanicama glioblastoma (51).

BITC pokazao je citotoksično djelovanje na različitim staničnim linijama karcinoma pločastih stanica glave i vrata. On aktivira nekoliko MAPK signalnih puteva, p38 MAPK i MEK/MAPK signalne puteve, čime potiče apoptozu tumorskih stanica. Njegov strukturni analog, fenil izotiocijanat (PITC), nije pokazao značajno antitumorsko djelovanje na istim tumorskim stanicama, što upućuje na to da i male promjene u strukturi izotiocijanata mogu značajno utjecati na njihovu antitumorsku aktivnost (52).



Slika 30. Potencijalni glavni proteini na koje djeluju izotiocijanati.

Preuzeto s: https://academic.oup.com/carcin/article/32/10/1405/2463223

Nekoliko ispitivanja toksičnosti izotiocijanata pokazalo je nuspojave određenih izotiocijanata na životinjskim modelima. Naime, pri iznimno visokim dozama izotiocijanati uzrokuju hiperplaziju stanica mokraćnog mjehura. No, treba uzeti u obzir da su ova ispitivanja izvršena na modelima glodavaca, koji inače imaju veću frekvenciju mokrenja, za razliku od ljudi kod kojih se urin dulje zadržava u mokraćnom mjehuru, što omogućava disocijaciju

metabolita izotiocijanata i povećanu izloženost tumorskih stanica izotiocijanatima u urinu (46).

Nekoliko epidemioloških istraživanja pokazalo je da je unos povrća iz porodice kupusnjača recipročno povezan s rizikom od karcinoma mokraćnog mjehura. Međutim, nijedno istraživanje nije direktno ispitalo povezanost unosa kupusnjača s pojavom recidiva. Podaci iz epidemioloških ispitivanja slažu se s rezultatima iz pretkliničkih ispitivanja i pružaju dodatne dokaze da unos izotiocijanata može usporiti rast karcinoma mokraćnog mjehura, njegovu progresiju i pojavu recidiva (46).

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su ekstrakti i izolirani spojevi iz biljnih vrsta roda *Lepidium,* 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 ekstrakata i spojeva je značajniji pri većim koncentracijama od 50 μg/mL i 100 μg/mL. Najveći citotoksični učinak ima benzil izotiocijanat pri koncentracijama od 50 μg/mL i 100 μg/mL nakon 24h inkubacije.

In vitro istraživanje na stanicama glioblastoma LN229 pokazalo je da svi ekstrakti i spojevi imaju određeni učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica, a najznačajniji učinak ima benzil izotiocijanat pri koncentracijama od 50 μg/mL i 100 μg/mL nakon 48h inkubacije.

Na temelju dobivenih rezultata, vidljivo je da biljna vrsta *Lepidium spp.* ima veliki potencijal za liječenje različitih bolesti, a osobito 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) izotiocijanatima izoliranim iz biljnih vrsta *Lepidium latifolium* i *Lepidium graminifolium* dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.

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

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

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

7. LITERATURA

1) Cooper, Geoffrey M., Hausman, Robert E. Rak. In: Lauc G, editor. Stanica: molekularni pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. pp. 631-632.
2) Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, M., Gugić, D., Krajina Z. Biologija raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. pp. 1.
3) http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer Datum pristupa: 28.03.2018.
4) Cooper, Geoffrey M., Hausman, Robert E. Rak. In: Lauc G, editor. Stanica: molekularni pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. pp. 647-654.
5) Cooper, Geoffrey M., Hausman, Robert E. Rak. In: Lauc G, editor. Stanica: molekularni pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. pp. 657-662.
6) https://emedicine.medscape.com/article/438262-overview#showall Datum pristupa: 02.04.2018.
7) Wong, M. C. S., Fung, F. D. H., Leung, C., Cheung, W. W. L., Goggins, W. B., Ng, C. F. (2018.) The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Scientific reports,* 1129(8). https://www.nature.com/articles/s41598-018-19199-z Datum pristupa: 02.04.2018.
8) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018. [Online] https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf Datum pristupa: 02.04.2018.
9) https://emedicine.medscape.com/article/438262-workup#c10 Datum pristupa: 04.04.2018.
10) https://emedicine.medscape.com/article/438262-workup#showall Datum pristupa: 04.04.2018.
11) https://emedicine.medscape.com/article/438262-guidelines#g5 Datum pristupa: 05.04.2018.
12) https://emedicine.medscape.com/article/438262-treatment#showall Datum pristupa: 05.04.2018.
13) https://emedicine.medscape.com/article/438262-medication Datum pristupa: 05.04.2018.
14) https://emedicine.medscape.com/article/283252-overview#showall Datum pristupa: 20.04.2018.

15) https://emedicine.medscape.com/article/283252-clinical#b5 Datum pristupa: 20.04.2018.
16) Louis, D. N., et al. (2016.) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica,* 131(6), pp. 803-820. https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-016-1545-1 Datum pristupa: 20.04.2018.
17) https://emedicine.medscape.com/article/283252-medication#1 Datum pristupa: 20.04.2018.
18) http://eol.org/data_objects/27879253 Datum pristupa: 02.03.2018.
19) Mummenhoff, K., Brüggemann, H., Bowman, J. L. (2001) Chloroplast DNA phylogeny and biogeography of *Lepidium* (Brassicaceae). *American Journal of Botany,* 88(11), pp. 2051-2063. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2307/3558431 Datum pristupa: 03.03.2018.
20) https://www.cabi.org/isc/datasheet/115209 Datum pristupa: 05.03.2018.
21) Kovačić, S., et al. *Lepidium graminifolium*. In: Draganović J. M., editor. Flora jadranske obale i otoka: 250 najčešćih vrsta. Zagreb: Školska knjiga, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2008. pp. 188-189.
22) https://www.britannica.com/plant/peppergrass Datum pristupa: 06.03.2018.
23) Rehman, N., Khan, A., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H. (2012) Pharmacological Basis for the Medicinal Use of *Lepidium sativum* in Airways Disorders. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2012. https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/596524/ Datum pristupa: 08.03.2018.
24) Bano, A., et al. (2014) Quantitative ethnomedicinal study of plants used in the skardu valley at high altitude of Karakoram-Himalayan range, Pakistan. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine,* 10(43) doi: 10.1186/1746-4269-10-43 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4039317/?report=classic Datum pristupa: 10.03.2018.
25) Gonzales, G. F., Gonzales, C., Gonzales, C. C. (2009) Lepidium meyenii (Maca): a plant from the highlands of Peru- from tradition to science. *Forschende Komplementarmedizin,* 16(6), pp. 373-380. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20090350 Datum pristupa: 10.03.2018.
26) https://www.pfaf.org/User/Plant.aspx?LatinName=Lepidium+graminifolium Datum pristupa: 10.03.2018.

27) Pascual-Villalobos, M. J., Robledo, A. (1999) Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology,* 27(1), pp. 1-10. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197898000519 Datum pristupa: 11.03.2018.

28) http://eol.org/data_objects/28699560#cite_note-4 Datum pristupa: 12.03.2018.

29) Kaur, T., Hussain, K., Koul, S., Vishwakarma, R., Vyas, D. (2013) Evaluation of nutritional and antioxidant status of *Lepidium latifolium* Linn.: A novel *phytofood* from Ladakh. *PLoS One,* 8(8), doi: 10.1371/journal.pone.0069112 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732271/ Datum pristupa: 12.03.2018.

30) Navarro, E., Alonso, J., Rodriguez, R., Trujillo, J., Boada, J. (1994) Diuretic action of an aqueous extract of *Lepidium latifolium* L. *Journal of Ethnopharmacology,* 41(1-2), pp. 65-69. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874194900590 Datum pristupa: 14.03.2018.

31) Martinez Caballero, S., Carricajo Fernandez, C., Perez-Fernandez, R. (2004) Effect of an integral suspension of *Lepidium latifolium* on prostate hyperplasia in rats. *Fitoterapia,* 75(2), pp. 187-191. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X04000103 Datum pristupa: 15.03.2018.

32) Conde-Rioll, M., et al. (2017) Antitumor activity of *Lepidium latifolium* and identification of the epithionitrile 1-cyano-2,3-epithiopropane as its major active component. *Molecular Carcinogenesis,* 57(3), pp. 347-360. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mc.22759 Datum pristupa: 15.03.2018.

33) http://soria-natural.hr/kapi/kresa-ili-grbica/ Datum pristupa: 16.03.2018.

34) Razavi, S. M., Asadpour, M., Jafari, A., Malekpour, S. H. (2015) The field efficacy of *Lepidium latifolium* and *Zataria multiflora* methanolic extracts against *Varroa destructor*. *Parasitology Research,* 114(11), pp. 4233-4238. https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-015-4661-2 Datum pristupa: 15.03.2018.

35) Brzović, P. Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama *Lepidium* spp. (Brassicaceae) i *Moringa oleifera* (Moringaceae). Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki

fakultet; 2017. https://repozitorij.ktf-split.hr/islandora/object/ktfst:131/preview Datum pristupa: 17.03.2018.

36) http://www.botanical-dermatology-database.info/BotDermFolder/CRUC.html Datum pristupa: 18.03.2018.

37) Afsharypuor, S., Sepehrnejad, S. (2006) Analysis of the volatile constituents of the seeds, roots, leaves and whole flowering plant of *Lepidium latifolium* L. *Journal of Essential Oil Research,* 18(1), pp. 106. http://connection.ebscohost.com/c/articles/20355352/analysis-volatile-constituents-seeds-roots-leaves-whole-flowering-plant-lepidium-latifolium-l Datum pristupa: 20.03.2018.

38) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5971#section=Top Datum pristupa: 20.03.2018.

39) https://www.lktlabs.com/product/benzyl-isothiocyanate/ Datum pristupa: 21.03.2018.

40) https://www.lktlabs.com/product/phenyl-isothiocyanate/ Datum pristupa: 21.03.2018.

41) http://www.who.int/cancer/en/ Datum pristupa: 24.04.2018.

42) http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx Datum pristupa: 24.04.2018.

43) Al-Zalabani, A. H., Stewart, K. F. J., Wesselius, A., Schols, A. M. W. J., Zeegers, M. P. (2016) Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *European Journal of Epidemiology,* 31(9), pp. 811-851. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5010611/ Datum pristupa: 25.04.2018.

44) Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., Simjee, S. U. (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. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5563115/ Datum pristupa: 25.04.2018.

45) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470003/ Datum pristupa: 25.04.2018.

46) Veeranki, O. L., Bhattacharya, A., Tang, L., Marshall, J. R., Zhang, Y. (2015) Cruciferous vegatables, isothiocyanates and prevention of bladder cancer. *Current Pharmacology Reports,* 1(4), pp. 272-282. https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40495-015-0024-z Datum pristupa: 16.06.2018.

47) Geng, F., et al. (2011) Allyl isothiocyanate arrests cancer cells in mitosis, and mitotic arrest in turn leads to apoptosis via Bcl-2 protein phosphorylation. *Journal of*

Biological Chemistry, 286(37), pp. 32259-32267. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3173144/ Datum pristupa: 15.06.2018

48) Bhattacharya, A., et al. (2010) Inhibition of bladder cancer development by allyl isothiocyanate. *Carcinogenesis,* 31(2), pp. 281-286. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2812574/ Datum pristupa: 19.06.2018.

49) NG, C., et al. (2010) Allyl isothiocyanate triggers G2/M phase arrest and apoptosis in human brain malignant glioma GBM 8401 cells through a mitochondria-dependent pathway. *Oncology Reports,* 24(2), 449-455. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20596632?dopt=Abstract Datum pristupa: 15.06.2018.

50) Singh, S. V., Singh, K. (2012) Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis,* 33(10), pp. 1833-1842. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3529556/#CIT0042 Datum pristupa: 18.06.2018.

51) HS, S., et al. (2016) Benzyl isothiocyanate (BITC) induces apoptosis of GBM 8401 human brain glioblastoma multiforms cells via activation of caspase-8/Bid and the reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway. *Environmental Toxicology,* 31(12), pp. 1751-1760. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28675694 Datum pristupa: 22.06.2018.

52) Lui, V. W. Y., et al. (2003) Requirement of a carbon spacer in benzyl isothiocyanate-mediated cytotoxicity and MAPK activation in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis,* 24(10), pp. 1705-1712. https://academic.oup.com/carcin/article/24/10/1705/2390318 Datum pristupa: 20.06.2018

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj je istraživanja ispitati potencijalno citotoksično djelovanje izotiocijanata, spojeva izoliranih iz biljne vrste *Lepidium spp.*, na humane karcinomske stanice mokraćnog mjehura (UM-UC-3) i glioblastoma (LN229). Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica, nakon izlaganja izotiocijanatima, smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

Materijali i metode:

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

Rezultati:

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

Kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura svi izotiocijanati 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 ima benzil izotiocijanat pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24 h inkubacije.

Kod stanica glioblastoma većina izotiocijanata najjjači 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 ima benzil izotiocijanat pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 48 h inkubacije.

Zaključci:

In vitro izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (UM-UC-3) i glioblastoma (LN229) izotiocijanatima dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak ovisan je o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje izotiocijanata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak izotiocijanata, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma mokraćnog mjehura i glioblastoma kod životinja.

9. SUMMARY

The aim of the research:

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of isothiocyanates, a chemical substance isolated from the *Lepidium 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 isothiocyanates their number will be reduced in comparison to the control group.

Materials and methods:

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

Results:

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

In urinary bladder carcinoma cells all isothiocyanates show better effects in higher concentrations of 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 benzyl isothiocyanate at the concentrations of 50 μg/mL and 100 μg/mL after 24-hour incubation time.

In glioblastoma cells most isothiocyanates 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 benzyl isothiocyanate at the concentrations of 50 μg/mL and 100 μg/mL after 48-hour incubation time.

Conclusions:

In vitro exposure of urinary bladder carcinoma cells (UM-UC-3) and glioblastoma (LN229) to isothiocyanates leads to reduced cell survival rate. Cytotoxic effects depend on incubation time and concentration. Isothiocyanates effect is not always proportional to the increase in concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurs. The cytotoxic effect of isothiocyanates is confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next

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

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Maja Katičić

Datum rođenja: 18.02.1994.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Ulica Nikole Tesle 25, 21000 Split

e-mail: maja.katicic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

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

RADNO ISKUSTVO:

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

CPSA Split (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski jezik