

Biološke uloge glukozinolata

Žeželj Vidoša, Tia

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:935757>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tia Žeželj Vidoša

Biološke uloge glukozinolata

Završni rad

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad izrađen je u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Šola.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Kemijska struktura i metabolizam glukozinolata	2
2.1. Kemijska struktura.....	2
2.2. Biosinteza glukozinolata.....	2
2.2.1. Elongacija bočnog lanca aminokiseline	3
2.2.2. Formacija srži	4
2.2.3. Sekundarne modifikacije.....	5
2.3. Hidroliza glukozinolata	6
3. Biološke uloge glukozinolata	8
3.1. Uloge glukozinolata kod biljaka.....	8
3.2. Uloge glukozinolata kod bakterija, gljiva i životinja	10
3.3. Uloge glukozinolata kod ljudi	11
4. Bioraspoloživost glukozinolata	15
5. Zaključak.....	16
6. Literatura.....	18
7. Sažetak	30
8. Summary.....	31
9. Životopis.....	32

1. Uvod

Glukozinolati su specijalizirani biljni metaboliti zastupljeni u brojnim vrstama reda Capparales, koji uključuje i komercijalno vrijedne vrste iz porodice Brassicaceae (kupusnjače) (Agerbirk i Olsen, 2012).

Osnovna uloga glukozinolata je zaštita biljke od herbivora i mikroorganizama (Agerbirk i sur., 2018). Glukozinolati su kemijski stabilni i inertni spojevi sve dok ne dođu u kontakt s enzimom mirozinazom prilikom oštećenja tkiva. Hidrolizom glukozinolata nastaje niz biološki aktivnih produkata od kojih su najzastupljeniji i najbolje istraženi izotiocijanati (Rask i sur., 2000). Produkti hidrolize su toksične tvari oporog okusa koje posjeduju insekticidna i antimikrobna svojstva (Wittstock, 2004).

Osim obrambene uloge, produkti hidrolize glukozinolata bitni su u procesima regulacije rasta i odgovora na abiotički stres kod biljaka (Del Carmen Martínez-Ballesta, 2013). Glukozinolati moduliraju metaboličke procese biljaka u uvjetima visokog saliniteta (Quasim i sur., 2003), suše (Gardner, 2002.; Radovich i sur., 2005), povišene temperature (Velascoi sur., 2007) i intenzivnog osvjetljenja (Engelen-Eigles i sur., 2006).

Glukozinolati i njihovi razgradni produkti daju karakterističan okus određenim biljnim vrstama koje su sastavni dio ljudske prehrane (npr. brokula, hren, gorušica, kelj, koraba, repa) (Fahey, 2001). Sastav i koncentracija glukozinolata ovisi o vrsti biljke i vrsti tkiva. Najviše koncentracije glukozinolata akumuliraju se u sjemenkama, mladim listovima i izdancima (Bhandari, 2015).

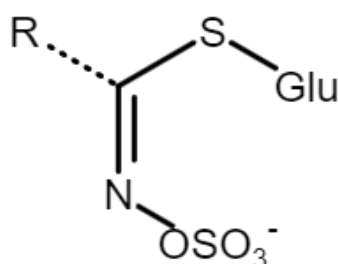
Neki produkti hidrolize glukozinolata posjeduju protuupalna i antikancerogena svojstva (Salma i sur., 2018; Wu i sur., 2004; Axelsson i sur., 2017; Bahadoran i sur., 2012; Maina i sur., 2020), dok drugi mogu dovesti do poremećaja u radu štitnjače (Chen i Andreasson, 2001) i potaknuti kancerogenezu (Stoner i sur., 2002).

Brojna istraživanja danas usmjerena su proučavanju utjecaja glukozinolata na ljudsko zdravlje, optimizaciji bioraspoloživosti glukozinolata i potencijalne primjene metaboličkih produkata u terapijske svrhe.

2. Kemijska struktura i metabolizam glukozinolata

2.1. Kemijska struktura

Glukozinolati su sumporom bogati anionski spojevi. Srž strukture glukozinolata čine β -D-glukopiranozna skupina koja je atomom sumpora vezana na (Z)-N-hidroksimosulfatni ester, i varijabilni bočni lanac, odnosno R skupina (Slika 1) koja je derivat jedne od osam mogućih aminokiselina (Clarke i sur., 2010). Glukozinolati se klasificiraju s obzirom na aminokiselinu koja je preteča R skupini. Spojevi koji su derivati leucina, izoleucina, metionina, alanina ili valina nazivaju se alifatski glukozinolati, oni čiji su prekursori fenilalanin ili tirozin nazivaju se aromatski glukozinolati, dok indolni glukozinolati potječu od triptofana. Opisano je oko 137 različitih glukozinolata (Blažević i sur., 2020) koji se međusobno razlikuju u R skupini. R skupine podložne su znatnim preinakama kao što su elongacije, hidroksilacije, O-metilacije, desaturacije, glikozilacije i acilacije (Clarke i sur., 2010), što je razlog velike bioraznolikosti ovih spojeva.



Slika 1. Opća struktura glukozinolata

2.2. Biosinteza glukozinolata

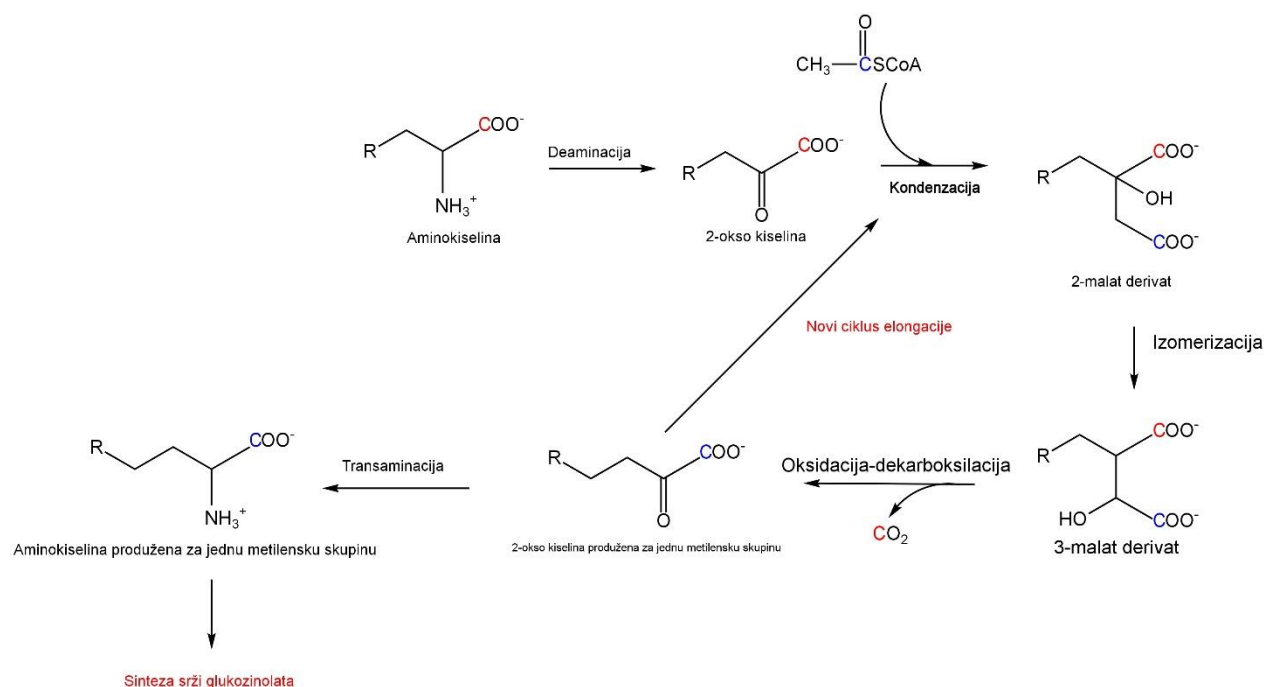
Unatoč sve većem interesu za glukozinolate, zbog velike bioraznolikosti procesi biosinteze u biljkama nisu u potpunosti razjašnjeni (Frerigmann i Gigolashvili, 2014). Kao modelni organizam za proučavanje biosinteze, korištena je biljka *Arabidopsis thaliana* iz porodice Brassicacea (Redovniković i sur., 2012), koja sintetizira oko 40 različitih tipova

glukozinolata, većinom derivata metionina i triptofana. Na temelju provedenih istraživanja, opći proces sinteze glukozinolata podijeljen je u tri faze.

Prva faza biosinteze podrazumijeva elongaciju i metilaciju bočnih lanaca aminokiselina od kojih nastaju R skupine. Druga faza obuhvaća adiciju glukoze i sumpora na aminokiselinu čime nastaje srž strukture glukozinolata. U trećem i zadnjem koraku sinteze, bočna skupina aminokiseline podvrgnuta je raznim sekundarnim modifikacijama koje su zaslužne za veliku raznolikost glukozinolatnih spojeva (Sønderby i sur., 2010). Sve tri faze biosinteze u pravilu se odvijaju u citosolu biljnih stanica uz sudjelovanje kloroplasta u pojedinim koracima prve i druge faze (Wang i sur., 2011).

2.2.1. Elongacija bočnog lanca aminokiseline

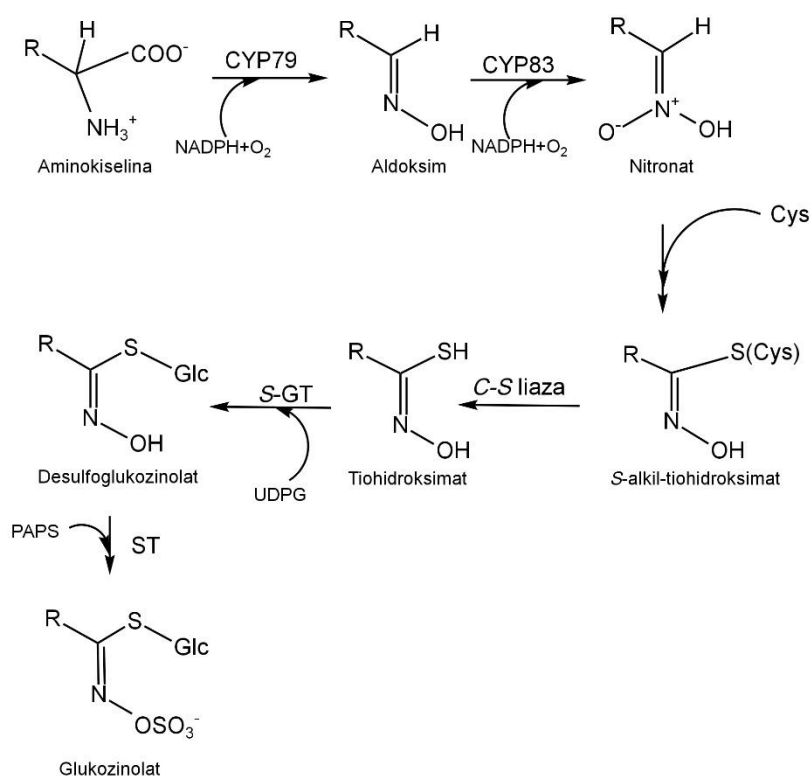
Biosinteza glukozinolata započinje fazom elongacije (Slika 2) u kojoj se na bočne ogranke aminokiselina dodaju metilenske skupine. Kroz ovu fazu u pravilu prolaze samo fenilalanin i metionin. Ukoliko neka druga aminokiselina služi kao prekursor za sintezu R skupine, elongacija bočnog ogranka nije potrebna (Prieto i sur., 2019). Prvi korak elongacije je deaminacija aminokiseline pri čemu nastaje pripadajuća 2-okso kiselina. U idućim koracima, 2-okso kiselina kondenzira s acetil-CoA i izomerizira u 3-malatni derivat koji prolazi kroz reakcije oksidacije i dekarboksilacije. Konačan produkt tih reakcija je 2-okso kiselina s jednom metilenskom skupinom više u odnosu na početni supstrat. Ova 2-okso kiselina može proći i do devet elongacijskih ciklusa prije transaminacije i prelaska u iduću fazu biosinteze (Fahey i sur., 2001). Reakcije elongacije posredovane su genima *MAM* (eng. *Methylthioalkylmalate synthase*) 1-3 i *MAM-L* (eng. *MAM-like*) (Kroymann i sur., 2001; Textor i sur., 2007).



Slika 2. Faza elongacije bočnog ogranka aminokiseline prilikom sinteze glukozinolata. Plavom bojom označen je ugljikov atom porijeklom iz acetyl-CoA. Crvenom bojom označen je ugljikov atom originalne COOH funkcionalne skupine koji se gubi u svakom idućem ciklusu

2.2.2. Formacija srži

Nakon elongacije, aminokiselinski derivati ulaze u niz reakcija koje u konačnici rezultiraju nastankom srži strukture glukozinolata (Slika 3). Međuproducti ovih reakcija zajednički su svim glukozinolatima, bez obzira na ishodišnu aminokiselinu (Halkier et al., 2006). U prvom koraku, citokromi P450, pripadnici skupine enzima CYP79, kataliziraju pretvorbu aminokiseline u pripadajuće aldoksime (Wittstock i Halkier, 2002). Enzimi skupine CYP83 oksidiraju aldoksime do nitronata, nestabilnih intermedijera koji zatim metaboliziraju do *S*-alkiltiohidroksimata (Bak i sur., 2001; Hansen i sur., 2001). *S*-alkiltiohidroksimati prolaze cijepanje do tihidroksimata, posredovano *C-S* liazom (Mikkelsen i sur., 2004). *S*-glukoziltransferaza (*S*-GT) vrši glikozilaciju tihidroksimata nastalih u prethodnom koraku pri čemu nastaju desulfoglukozinolati (Peterson i sur., 2001). U zadnjem koraku formacije srži, enzim 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS):desulfoglukozinolat sulfotransferaza vrši sulfonizaciju desulfoglukozinolata pri čemu nastaju glukozinolati (Glendening i Poulton, 1988) koji dalje odlaze u procese sekundarnih modifikacija.

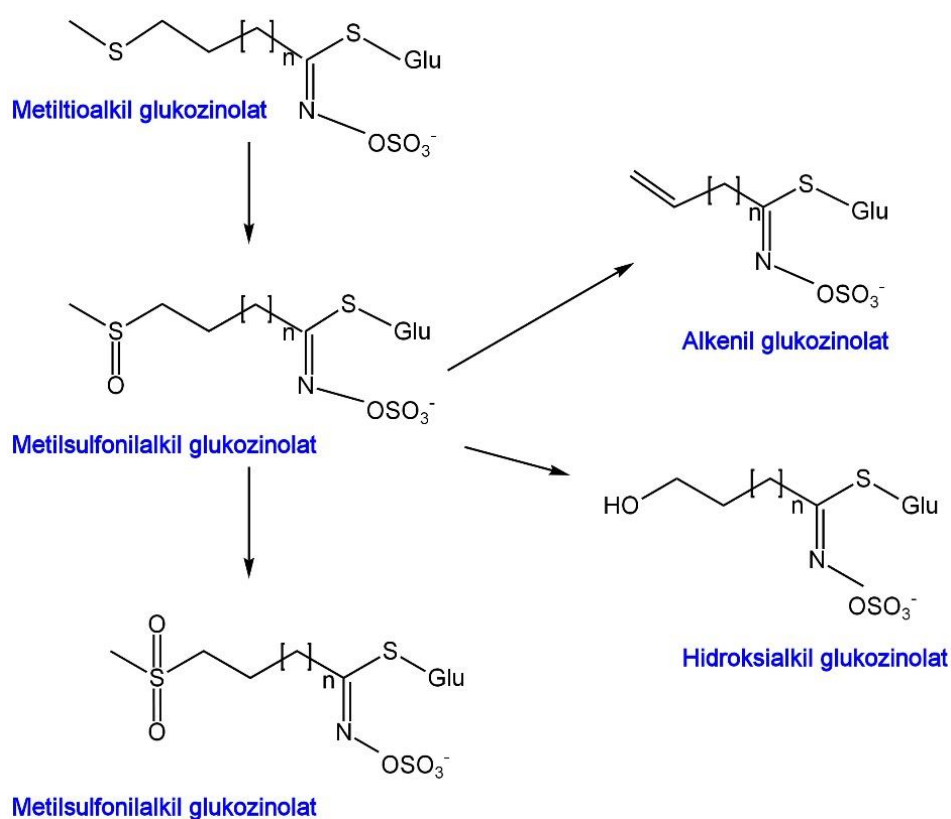


Slika 3. Sinteza srži glukozinolata. S-GT: S-glukoziltransferaza; ST: sulfotransferaza; PAPS: 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat; desulfoglukozinolat sulfotransferaza

2.2.3. Sekundarne modifikacije

Nakon sinteze srži glukozinolata slijede reakcije sekundarnih modifikacija koje obuhvaćaju bočne ogranke aminokiselina i glukozni ostatak (Hopkins i sur., 2009). Ove reakcije utječu na kasnije procese hidrolize glukozinolata i aktivnost produkata hidrolize. Bočni ogranak alifatskih glukozinolata modificira se reakcijama oksigenacije, hidroksilacije, alkenilacije i benzoilacije, dok se bočni ogranak indolnih glukozinolata modificira hidroksilacijom i metoksilacijom (Sønderby i sur., 2010b). Sekundarnim modifikacijama naročito su podložni bočni ogranci glukozinolata koji potječu od metionina i njegovih elongiranih derivata (Halkier i Gershenzon, 2006). Na Slici 4 prikazane su česte reakcije oksidativne sekundarne transformacije R skupine metioninskih derivata pri čemu nastaje velika skupina metilsulfinil- i metilsulfonil- glukozinolata (Fahey i sur., 2001). Metilsulfinil glukozinolati dalje se mogu modificirati do alkenil- i hidroksialkil glukozinolata (Halkier i sur., 2006).

Unatoč tomu što je pozamašan broj enzima koji su uključeni u sekundarne modifikacije identificiran, zbog velike raznolikosti glukozinolata, mnogi biokemijski i molekularni procesi specifični za pojedine modifikacije još nisu razjašnjeni.



Slika 4. Prikaz čestih sekundarnih transformacija R skupine glukozinolata nastalih od metionina i derivata metionina

2.3. Hidroliza glukozinolata

Glukozinolati su stabilni spojevi koji su u pravilu lokalizirani u vakuolama S-stanica biljaka, kao intaktni spojevi (Burow i Halkier, 2012). Za njihovu razgradnju zadužen je enzim mirozinaza, endogena β -tioglukozidaza koja se nalazi u vakuolama specijaliziranih mirozinskih stanica specifičnih za porodicu Brassicaceae. U normalnim uvjetima enzim i supstrat međusobno su odvojeni skladištenjem u vakuolama različitih staničnih tipova. U slučaju narušavanja staničnog integriteta, mirozinaza se aktivira i hidrolizira tioglukozidnu vezu glukozinolata pri čemu nastaju glukoza, sulfat i nestabilan aglikonski ostatak (Redovniković i sur., 2008).

Ovisno o konfiguraciji varijabilne R skupine i reakcijskim uvjetima, aglikon se preslaguje u niz toksičnih spojeva, uključujući izotiocijanate, goitrine, nitrile, epitionitrile i tiocijanate (Barba i sur., 2016; Sønderby i sur., 2010; Wittstock i Halkier, 2002). U uvjetima neutralnog pH, aglikon se preferentno preslaguje u formu izotiocijanata. Ukoliko je glukozinolat hidroksiliran na trećem ugljikovom atomu, hidrolizom nastaje nestabilan izotiocijanat koji spontano ciklizira u oksazolidin-2-tion (goitrin), tvar koja u visokim koncentracijama uzrokuje gušu. Nitrili u pravilu nastaju hidrolizom glukozinolata u kiselim uvjetima ($\text{pH} < 3$) i prisustvu Fe^{2+} iona (Gallett i sur., 2001). U slučaju kada je u bočnom lancu R skupine prisutna terminalna dvostruka veza, otpuštanjem atoma sumpora nastaju epitionitrili. Tiocijanati su zabilježeni u malom broju biljnih vrsta i nastaju od samo tri klase glukozinolata: benzil-glukozinolata, alil-glukozinolata i 4-metilsulfinilbutil-glukozinolata, pri $\text{pH} > 8$ (Hasapis i MacLeod, 1982). Hidroliza indolnih glukozinolata odvija se nešto drugačijim mehanizmom. Hidrolizom indolnih glukozinolata nastaju izotiocijanati koji su nestabilni pri neutralnom pH i modificiraju se u druge metabolite, uključujući konjugate askorbinske kiseline, indol-metanole i razne oligomere (Agerbirk i sur., 1998).

3. Biološke uloge glukozinolata

3.1. Uloge glukozinolata kod biljaka

Jedna od osnovnih uloga glukozinolata je obrana biljaka od herbivora i patogena (Agerbirk i sur., 2018). Prilikom mastikacije dolazi do oštećenja tkiva i hidrolize glukozinolata u pripadajuće toksične produkte oporog okusa (Chen i Andreasson, 2001). Izotiocijanati su identificirani kao najaktivniji i najotrovniji produkti hidrolize glukozinolata koji, također, i najviše pridaju njihovim biološkim ulogama (Awari i sur., 2003; Tierens i sur., 2001). Brojne studije zabilježile su toksičnost izotiocijanata i sposobnost inhibicije rasta kod insekata, nematoda, sisavaca, ptica, bakterija i gljivica (Busk i sur., 2002; Lazzeri i sur., 2004; Noret i sur., 2005; Ulmer i sur., 2001; Müller i sur., 2011).

Osim kod biotičkog stresa uzrokovanog djelovanjem biljojeda i patogena, izmijenjeni metabolizam glukozinolata zabilježen je i u uvjetima abiotičkog stresa (Del Carmen Martínez-Ballesta, 2013). Kada je biljka izložena stresu, reakcije fiksacije ugljika preusmjeravaju se u nastajanje sekundarnih metabolita, uključujući i glukozinolata (Endara i Coley, 2011). U modelnom organizmu *A. thaliana*, uočeno je da supresija alifatskih glukozinolata dovodi do promjena u metabolitima i proteinima koji su uključeni u procese fotosinteze, odgovora na oksidacijski stres i metabolizam hormona (Chen i sur., 2012). Premda su fiziološki putevi odgovora na stres i metabolizma glukozinolata usko povezani, sama uloga glukozinolata u odgovoru na abiotički stres još nije u potpunosti razjašnjena. Izmijenjeni metabolizam glukozinolata zabilježen je u slučajevima visokog saliniteta (Quasim i sur., 2003), suše (Gardner, 2002.; Radovich i sur., 2005), povišene temperature (Velascoi sur., 2007) i intenzivnog osvjetljenja (Engelen-Eigles i sur., 2006). Visok salinitet oštećuje stanične membrane biljaka što dovodi do otpuštanja glukozinolata i mirozinaza iz zasebnih vakuola i hidrolizu glukozinolata, što bi posljedično dovelo do smanjene razine glukozinolata. Suprotno očekivanjima, prijašnja istraživanja zabilježila su povećane razine glukozinolata kod biljaka izloženih visokim koncentracijama soli iz čega se može pretpostaviti da visok salinitet dovodi do promjena u metabolizmu i povećane sinteze glukozinolata (Pang, 2012). Služe li glukozinolati u ovom tipu staničnog odgovora kao signalne molekule ili su jednostavno nusprodukt staničnog metabolizma i signalizacije nije poznato (Del Carmen Martínez-Ballesta, 2013). Smanjeni vodni potencijal uslijed suše uzrokuje smanjenu stopu rasta i povećani

sekundarni metabolizam. Sukladno tomu, dolazi i do porasta akumulacije glukozinolata (Radovich i sur., 2005; Zhang i sur., 2008). U modelnoj biljci *A. thaliana* zabilježena su dva izoenzima mirozinaza, TGG1 i TGG2. TGG1 je, uz ekspresiju u mirozinaznim stanicama, eksprimiran i u stanicama zapornicama puči (Zhao i sur., 2008). Egzogeno tretiranje listova *A. thaliana* derivatom glukozinolata, alil-izotiocijanatom, rezultiralo je zatvaranjem puči (Khokon i sur., 2011), što je dalo naslutiti na potencijalnu poveznicu između glukozinolata i stomatalne regulacije. Nedavno istraživanje Salehina i sur. (2019) razjasnilo je vezu između alifatskih glukozinolata i regulacije puči u sušnim uvjetima. Koncentracija alifatskih glukozinolata pod regulacijom je auksin osjetljivih Aux/IAA represora, IAA5, IAA6 i IAA19. Ti proteini održavaju visoku razinu glukozinolata u uvjetima niskog vodnog potencijala. Kod *iaa5,6,19* trostrukih mutanata zabilježena je snižena razina glukozinolata i smanjena otpornost na sušu uzorkovana narušenom stomatalnom regulacijom. Induciranjem prekomjerne ekspresije alifatskih glukozinolata u *iaa5,6,19* mutantu ponovno se uspostavlja fenotip otporan na sušu (Salehin i sur., 2019). Brojne studije pokazale su sezonsku varijabilnost razine glukozinolata. Razina glukozinolata viša je u proljetnim/ljetnim uvjetima visoke temperature, niske vlage i dužeg fotoperioda, nego u jesenskim/zimskim uvjetima (Schreiner i sur., 2002; Padilla i sur., 2007; Zhang i sur., 2008). Koncentracija glukozinolata u biljkama pozitivno korelira s povišenjem temperature i intenziteta osvjetljenja. (Engelen-Eigles i sur., 2006). Glukozinolati i produkti njihove hidrolize potencijalno induciraju rezistenciju biljaka na temperaturne ekstreme. Poremećaj u metabolizmu glukozinolata kod *A. thaliana* rezultira smanjenom razinom proteina toplinskog stresa Hsp90 (eng. *heat-shock protein*) i smanjenom rezistencijom na visoke temperature (Müller i sur. 2000). Egzogeno tretiranje biljke izotiocijanatima inducira pojačanu ekspresiju Hsp90 i bolju toleranciju na vrućinu (Hara i sur., 2010; Hara i sur. 2013). Sastav i koncentracija pojedinih glukozinolata vrste *Brassica oleracea* znatno se mijenja izlaganjem niskim temperaturama. Pri niskim temperaturama dominantna je ekspresija alifatskih glukozinolata, dok su pri temperaturama smrzavanja najprisutniji indolni glukozinolati. Ovakva diferencijalna ekspresija ukazuje na to da različiti tipovi glukozinolata sudjeluju u različitim metaboličkim procesima (Ljubej i sur., 2021).

3.2. Uloge glukozinolata kod bakterija, gljiva i životinja

Unatoč zabilježenoj toksičnosti glukozinolata, neke specijalizirane vrste kukaca koriste glukozinolate kao signal za hranjenje i ovipoziciju (Gabrys i Tjallingii, 2002; Mewis i sur., 2002; Miles i sur., 2005; Rojas, 1999). Takve vrste razvile su različite mehanizme kojima se odupiru toksičnim produktima hidrolize. Ličinke moljca *Plutella xylostella* kao osnovu ishrane koriste biljke bogate glukozinolatima zahvaljujući enzimu glukozinolat sulfataza. Enzim omogućuje cijepanje sulfatne skupine sa srži glukozinolata čime oni postaju neprepoznatljivi mirozinazama i sprječava se nastajanje toksičnih produkata (Ratzka i sur. 2002). Repičin bijelac (*Pieris rapae*), leptir iz porodice Pieridae, zaobilazi toksične produkte hidrolize tako što djelovanje mirozinaza preusmjerava od nastanka izotiocijanata prema nastanku manje otrovnih nitrila koji se zatim izlučuju iz organizma (Wittstock i sur., 2004). Vrste *Athalia rosae* (red Hymenoptera), *Murgantia histrionica* (red Hemiptera) i *Brevicoryne brassicae* (red Homoptera) akumuliraju glukozinolate unesene ishranom u svrhu vlastite zaštite od predatora (Müller i sur., 2001; Alibadi i sur., 2002). Implantacija glukozilatnog sustava obrane u biljojeda zahtjeva i alternativan izvor mirozinaza koje su neophodne za hidrolizu i nastajanje toksičnih produkata. Vrsta *B. brassicae* posjeduje vlastitu mirozinazu koja se strukturno značajno razlikuje od biljnih enzima (Jones i sur., 2002).

Osim biljnih mirozinaza, zabilježene su i mirozinaze porijeklom iz gljiva i bakterija (El Shora i sur., 2016; Szűcs i sur., 2018; Liu i sur., 2020). Bakterije crijevne mikroflore sisavaca često posjeduju mirozinaze kojima hidroliziraju glukozinolate do glukoze, sulfata i nestabilnog aglikonskog ostatka. Bakterije glukozu dobivenu hidrolizom koriste kao izvor energije (Krul i sur., 2002; Dinkova-Kostova i Kostov, 2012). Bakterija *Companilactobacillus farciminis* hidrolizira alifatski glukozinolat sinigrin do glukoze i alilizotiocijanata samo kada glukoza nije dostupna kao osnovni izvor energije (Watanabe i sur., 2021).

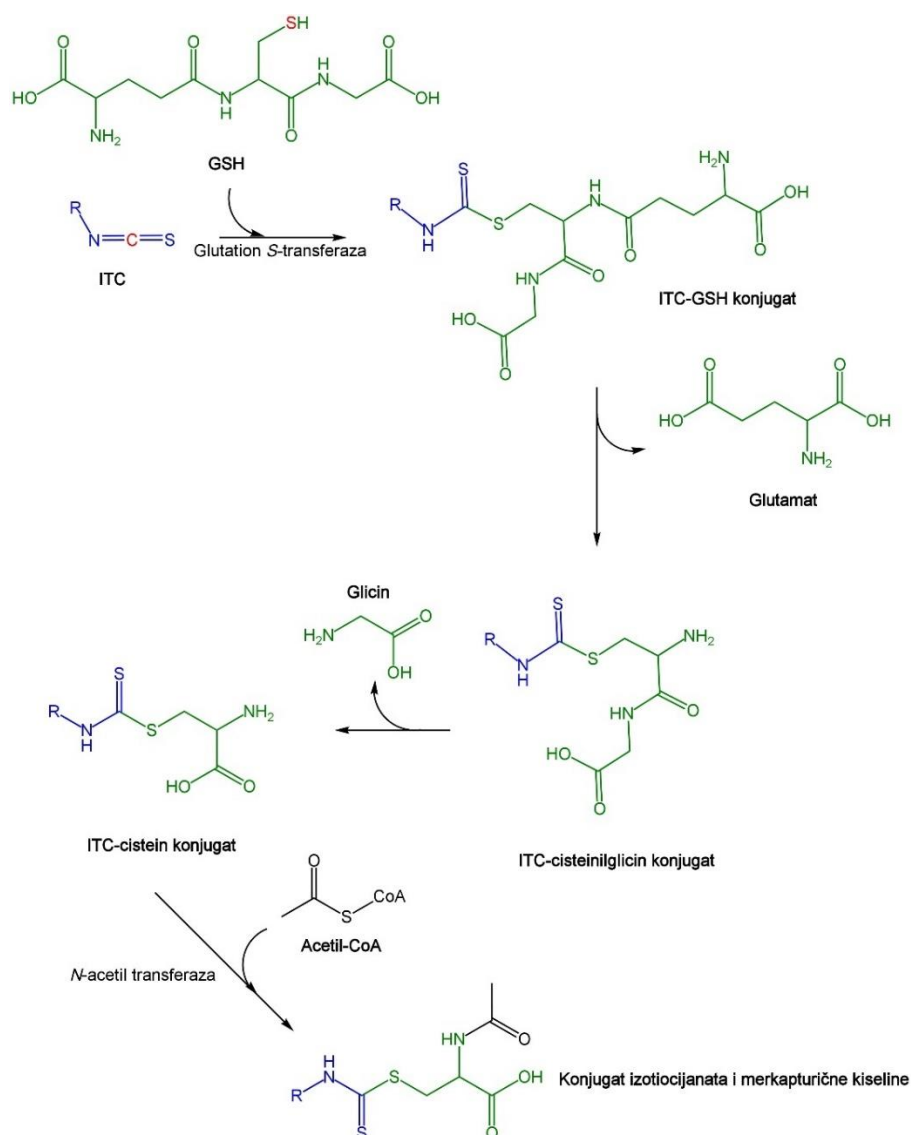
Unatoč zabilježenoj toksičnosti glukozinolata u mnogim organizmima, brojna istraživanja pokazala su pozitivan učinak produkata hidrolize na ljudsko zdravlje (Fujioka i sur., 2017; Gupta i sur., 2014; Mazumder i sur., 2016). Bakterije crijevne mikroflore provode hidrolizu glukozinolata unesenih prehranom u ljudskom probavnom traktu, stoga je interes za proučavanje bakterijskih mirozinaza sve veći (Elfoul i sur., 2001).

3.3. Uloge glukozinolata kod ljudi

Pri fiziološkom pH, izotiocijanati su najčešći i najtoksičniji produkti hidrolize glukozinolata. Reaktivna $-N=C=S$ skupina izotiocijanata kovalentno se veže za amidne i tiolne bočne ogranke proteina i narušava im tercijarnu i kvaternu strukturu što dovodi do brojnih metaboličkih poremećaja (Mi i sur., 2011). Kod ljudi, toksični učinak izotiocijanata znatno se umanjuje detoksikacijom preko glutaciona u jetri. Posredovano enzimom glutation *S*-transferaza, elektrofilni ugljikov atom izotiocijanata konjugira s nukleofilnom tiolnom skupinom glutaciona (Traka i Mithen, 2009). Konjugat prolazi kroz niz modifikacija i naposljetku se izlučuje urinom primarno kao derivat merkapturične kiseline (Ye i sur., 2002) (Slika 5). Kod sisavaca, izotiocijanati potiču sintezu glutaciona što dovodi do veće unutarstanične koncentracije glutaciona i efikasnije detoksikacije (Callaway i sur., 2004).

Kroz više radova dokazana su povoljna svojstva produkata hidrolize glukozinolata na ljudsko zdravlje (Fujioka i sur., 2017; Gupta i sur., 2014; Johnson i sur., 2015; Vig i sur., 2009). Biljke iz porodice Brassicaceae često su zastupljene kao dio ljudske prehrane. Prokuhavanjem biljaka prilikom pripreve jela dolazi do denaturacije biljnih mirozinaza (Rugapamestry i sur., 2006). S obzirom da tkiva sisavaca ne posjeduju mirozinaze, za hidrolizu glukozinolata oslanjaju se na mirozinaze prisutne u mikroorganizmima crijevne mikroflore (Dinkova-Kostova i Kostov, 2012). Izotiocijanati se apsorbiraju u tankom i debelom crijevu i mogu se detektirati u urinu već 2-3 sata nakon konzumacije (Johnson, 2002).

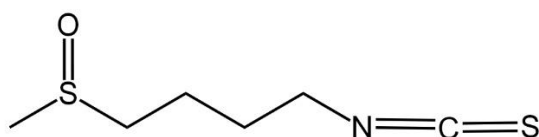
Zahvaljujući sposobnosti modifikacije metabolizma faze I i faze II biotransformacije, glukozinolati i njihovi metabolički derivati posjeduju antikancerogena svojstva. Biotransformacija je proces uklanjanja egzogenih i endogenih tvari iz organizma i odvija se pretežito u jetri (Almazroo i sur., 2017). Faza I biotransformacije podrazumijeva dodavanje reaktivne funkcionalne skupine na supstrat reakcijama oksidacije, redukcije ili hidrolize i pretvorbu lipofilnih tvari u hidrofilne.



Slika 5. Detoksikacija izotiocijanata preko konjugata merkapturične kiseline. Crvenom bojom označeni su elektrofilni atom ugljika izotiocijanata i nukleofilni atom sumpora glutationa. Plavom bojom označen je dio konjugata porijeklom od izotiocijanata dok je zelenom bojom označen dio konjugata porijeklom od glutationa. ITC-izotiocijanat, GSH-glutation

Intermedijeri ovih reakcija skloni su interakcijama s nukleinskim kiselinama i proteinima što često dovodi do njihovog oštećenja i kancerogenog djelovanja (Juge i sur., 2007). Najčešća reakcija faze I je oksidacija supstrata preko citokroma P450 (Gründemann i Huber, 2018). U fazi II biotransformacije reaktivni supstrat konjugira s endogenim metabolitom kao što je glukuronska kiselina, octena kiselina ili glutation pri čemu nastaju inaktivne polarne tvari koje se mogu izlučiti iz organizma (Juge i sur., 2007). Glukozinolati inhibiraju fazu I biotransformacije inhibicijom citokroma P450 čime sprječavaju nastanak reaktivnih, potencijalno kancerogenih tvari (Gründemann i Huber, 2018; Herr i Buchler, 2010) i induciraju fazu II koja potiče renalnu ekskreciju (Halkier i Gershenzon, 2006). Inhibicijom faze I

biotransformacije i aktivacijom faze II potiče se ekskrecija tvari iz organizma bez nastanka reaktivnih i potencijalno kancerogenih supstanci. Sulforafan, SFP (Slika 6) jedan je od najbolje proučenih metabolita glukozinolata. Sulforafan inducira citoprotektivne enzime koji inhibiraju stanični ciklus, angiogenezu i proliferaciju stanica te potiče apoptozu kancerogenih stanica (Dinkova-Kostova i Kostov, 2012; Livingstone i sur., 2019; Soundararajan i Kim, 2018; Traka i sur., 2014). Brojna istraživanja pokazala su da redovita konzumacija kupusnjača smanjuje rizik od raka pluća (Wu i sur., 2015), dojke (Bosetti i sur., 2012) i prostate (Chan i sur., 2017; Woo, 2009)



Slika 6. Struktura sulforafana

Izotiocijanati moduliraju upalne odgovore u organizmu reguliranjem aktivnosti proteinskog kompleksa NF- κ B (eng. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Brunelli i sur., 2010). NF- κ B je jedan od ključnih regulatora imunskog odgovora i staničnog odgovora na slobodne radikale, teške metale, UV-zračenje i razne antigene (Gilmore, 2006). Sudjeluje u prvom koraku imunodne reakcije u kojoj se antigen prerađuje makrofagima domaćina pri čemu nastaju oksidirani agensi i potiče se upalni odgovor (Medzhitov i Horng, 2009). U normalnim stanicama NF- κ B je inaktivan te je konstitutivna ekspresija zabilježena u gotovo svim tipovima raka (Aggarwal i Sung, 2011) i kroničnim upalnim procesima (Catrysse i van Loo, 2017). Izotiocijanati inhibiraju aktivnost NF- κ B, smanjuju upalni odgovor i oksidativni stres (Caglayan 2019; Prawan, 2009). Zbog svojih protuupalnih svojstava, izotiocijanati imaju povoljan terapijski učinak na bolesti uzrokovane dugoročnim upalnim procesima kao što su hipertenzija (Salma i sur., 2018; Wu i sur., 2004) i dijabetes (Axelsson i sur., 2017; Bahadoran i sur., 2012; Maina i sur., 2020).

Unatoč dokazanim povoljnim učincima glukozinolata na zdravlje ljudi, poznato je da prekomjerna konzumacija kupusnjača kod stočnih životinja može uzrokovati razne poremećaje u radu štitnjače, zatajenje rada jetre i bubrega, smanjeni rast pa čak i smrt (Tripathi i Mishra, 2007). Određeni metaboliti glukozinolata kao što su goitrin i izotiocijanati blokiraju metabolizam joda u štitnjači i mogu dovesti do nastanka guše (Taljaard, 1993). Unatoč dokumentiranim negativnim učincima produkata hidrolize glukozinolata na stočne životinje,

ne postoji mnogo informacija o potencijalnom štetnom djelovanju na ljudsko zdravlje. Neki produkti hidrolize, kao što je indol-3-karbinol pokazuju antikancerogena i kancerogena svojstva kod štakora (Stoner i sur., 2002). Sadržaj glukozinolata u biljkama porodice Brassicaceae iznosi oko 1% suhe mase. Dnevna doza glukozinolata unesena konzumacijom biljnog materijala iznosi između 12 do 300 mg (Ciska i Kozłowska, 2001), što vjerojatno nije dovoljna doza pri kojoj bi se moglo opaziti negativno djelovanje na ljudsko zdravlje (Verkerk i sur., 2009).

4. Bioraspoloživost glukozinolata

Bioraspoloživost predstavlja količinu aktivne tvari koja se apsorbira i dolazi do krvožilnog sustava kako bi dospjela do mjesta djelovanja (Wood, 2005). Bioraspoloživost glukozinolata, odnosno njihovih hidrolitičkih produkata ovisi o biljnoj vrsti iz koje potječu, početnoj koncentraciji u biljnom materijalu, kemijskim i fizičkim svojstvima pojedinih glukozinolata i njihovih derivata, koncentraciji i aktivnosti mirozinaza u biljnim tkivu, te načinu skladištenja i procesiranja biljnog materijala (Fernández-León i sur., 2017).

Kuhanje (Hwang, 2019), smrzavanje (Campos i sur., 2019), visoki pritisak (Okunade i sur., 2015), pasterizacija (Biegánska-Marecik., 2017) i priprava biljnog materijala u mikrovalnoj pećnici (Blažević i sur., 2020) smanjuju razinu glukozinolata i njihovih hidrolitičkih produkata u biljkama.

Koncentracija merkapturične kiseline u urinu koristi se kao biomarker uspješno apsorbiranih glukozinolata (Shapiro i sur., 2001). Konačna koncentracija merkapturične kiseline u urinu pokazala je da se konzumacijom sirovog povrća uspješno apsorbira između 17% i 88% unesene doze glukozinolata (Conaway i sur., 2001; Getahun i Chung, 1999; Jiao i sur., 1994; Rouzau, 2004; Shapiro i sur., 2001). Najveći gubitak glukozinolata povezan je s procesom kuhanja. Termalna obrada dovodi do gubitka 5-75% glukozinolata iz biljne materije (Jones i sur., 2010). Konačan gubitak ovisi o strukturi glukozinolata i biljnoj vrsti iz koje potječu. Uz gubitak samih glukozinolata, termalnom obradom denaturiraju se i mirozinaze što rezultira i nižom razinom aktivnih izotiocijanata (Jones i sur., 2010). Ukoliko se biljne mirozinaze denaturiraju prokuhavanjem, probavljanje i hidroliza glukozinolata ovisi primarno o bakterijskoj aktivnosti crijevne mikroflore i apsorpcija ne prelazi više od 20% unesene doze (Barba i sur., 2016). Premda konzumacija svježih, ne procesuiranih biljaka rezultira znatno većom apsorpcijom, redovita konzumacija prokuhanih kupusnjača podržava proliferaciju bakterija u probavnom traktu koje imaju sposobnost hidrolize glukozinolata, stoga se s vremenom povećava i bioraspoloživost glukozinolata porijeklom iz kuhanog materijala (Angelino i Jeffery, 2014).

Unatoč tomu, izbjegavanje termalne obrade i konzumacija sirovog povrća rezultira najvećom bioraspoloživosti glukozinolata (Oliviero i sur., 2018).

5. Zaključak

Glukozinolati su molekule karakteristične za biljnu porodicu Brassicaceae. Smatralo se da je osnovna uloga glukozinolata u biljaka obrana od herbivora i patogena, međutim sve više istraživanja pokazuje da osim obrambene, glukozinolati imaju značajnu ulogu u procesima rasta i odgovoru na abiotički stres. Glukozinolati moduliraju odgovor biljaka na vanjske egzogene stresore, no sam mehanizam njihova djelovanja nije u potpunosti razjašnjen. Djelovanje glukozinolata ovisi o njihovoj strukturi i koncentraciji pa tako različite skupine glukozinolata sudjeluju u različitim procesima.

Unatoč obrambenoj ulozi, određene vrste kukaca specijalizirale su se za prehranu kupusnjačama i razvile su mehanizme kojima aktivno zaobilaze insekticidno djelovanje razgradnih produkata glukozinolata. Neke vrste aktivno akumuliraju glukozinolate i koriste ih u vlastitoj obrani od predatora. Također, mirozinaze, enzimi koji hidroliziraju glukozinolate do njihovih aktivnih produkata, pronađene su ne samo u biljnim tkivima, već i u bakterijama i gljivicama koje koriste glukozinolate kao alternativni izvor energije. Premda se sustav glukozinolat-mirozinaza vjerojatno razvio u svrhu obrane od herbivora i patogena, brojne vrste razvile su i vlastite mehanizme obrane od toksičnog djelovanja produkata hidrolize.

Mirozinaze prisutne u bakterijama ljudskog probavnog trakta znatno su dobile na važnosti otkrićem povoljnih utjecaja produkata hidrolize glukozinolata na ljudsko zdravlje. Crijevni mikrobiom ima znatnu ulogu u hidrolizi hranom unesenih glukozinolata. Bakterijske mirozinaze uglavnom se proučavaju u vidu djelovanja na ljudski organizam i hidrolize glukozinolata u probavnom traktu, no postoji vrlo malo informacija o nastanku i ulozi mirozinaza u samim bakterijama. Mehanizam djelovanja bakterijskih mirozinaza također je slabo poznat. Neka istraživanja pokazala su da bakterije metaboliziraju glukozinolate kao alternativni izvor energije u slučaju pomanjkanja glukoze, ali definitivna uloga ili način zaobilazanja toksičnih produkata hidrolize nije poznata.

Zbog svojeg protuupalnog djelovanja, glukozinolati sve više dobivaju na važnosti kao potencijalni terapeutici u liječenju raznih bolesti, uključujući rak, dijabetes i hipertenziju. Unatoč brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje, pokazalo se da pojedine vrste glukozinolata mogu imati i toksična svojstva. Ishrana stočnih životinja bazirana na kupusnjačama nerijetko dovodi do problema sa štitnjačom, poremećaja u radu jetre i bubrega, guše i u ekstremnim situacijama i do smrti životinje. Dnevni unos glukozinolata kod ljudi u

pravilu nije dovoljno visok kako bi se opazilo toksično djelovanje produkata hidrolize glukozinolata. Štetni učinci na zdravlje mogući su u slučaju konzumiranja visokih doza glukozinolata kroz duži vremenski period. Različiti produkti hidrolize glukozinolata mogu imati znatno različita svojstva i različiti učinak na zdravlje i uzrokovati niz metaboličkih poremećaja, uključujući i kancerogenezu. Prije implementacije glukozinolata i njihovih hidrolitičkih produkata kao ciljanih terapeutika, potrebno je još mnogo istraživanja kako bi se dobio detaljan uvid u mehanizam njihovog djelovanja u organizmu.

Bioraspoloživost glukozinolata ovisi o njihovoj strukturi, porijeklu i načinu pripreme biljnog materijala. Bilo koji oblici termalne obrade povrća, osim što znatno smanjuju količinu glukozinolata u biljnom tkivu, također inaktiviraju biljne mirozinaze i sprečavaju nastajanje aktivnih produkata razgradnje. Intaktni glukozinolati hidroliziraju se bakterijskim mirozinazama u debelom crijevu gdje se oslobađaju aktivni produkti hidrolize. Bakterijska aktivnost u probavnom traktu zaslužna je samo za dio apsorbiranih glukozinolata. Najveća bioraspoloživost glukozinolata dobiva se konzumacijom sirovog povrća u kojemu su prisutne aktivne mirozinaze i najviše količine glukozinolata. Bioraspoloživost se može povećati sjeckanjem i usitnjavanjem povrća prije konzumacije. Usitnjavanjem povrća smanjuje se količina glukozinolata u biljnom tkivu, ali zbog aktivnih mirozinaza raste količina izotiocijanata koji se lako apsorbiraju u probavnom traktu.

Zbog svojih protuupalnih i antikancerogenih svojstava postoji sve veći interes za glukozinolate i produkte njihove hidrolize. Postoji još mnogo nepoznanica o načinu njihova djelovanja koje se moraju razriješiti prije korištenja u terapijske svrhe, no mnoga istraživanja pokazuju obećavajuće rezultate.

6. Literatura

Agerbirk, N., Matthes, A., Erthmann, P. Ø., Ugolini, L., Cinti, S., Lazaridi, E., Nuzillard, J. M., Müller, C., Bak, S., Rollin, P., & Lazzeri, L. (2018). Glucosinolate turnover in Brassicales species to an oxazolidin-2-one, formed via the 2-thione and without formation of thioamide. *Phytochemistry*, *153*, 79–93.

Agerbirk, N., & Olsen, C. E. (2012). Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*, *77*, 16–45.

Agerbirk N., Olsen C. E., & Soerensen H. (1998). Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of agricultural and food chemistry*, *46*, 1563–1571.

Aggarwal, B. B., & Sung, B. (2011). NF-κB in cancer: A matter of life and death. *Cancer discovery*, *1*(6), 469–471.

Agrawal, A. A., & Kurashige, N. S. (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of chemical ecology*, *29*(6), 1403–1415.

Aliabadi, A., Renwick, J. A., & Whitman, D. W. (2002). Sequestration of glucosinolates by harlequin bug *Murgantia histrionica*. *Journal of chemical ecology*, *28*(9), 1749–1762.

Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in liver disease*, *21*(1), 1–20.

Angelino, D., & Jeffery, E. (2014). Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of functional foods*, *7*(1), 67–76..

Axelsson, A. S., Tubbs, E., Mecham, B., Chacko, S., Nenonen, H. A., Tang, Y., Fahey, J. W., Derry, J., Wollheim, C. B., Wierup, N., Haymond, M. W., Friend, S. H., Mulder, H., & Rosengren, A. H. (2017). Sulforaphane reduces hepatic glucose production and improves glucose control in patients with type 2 diabetes. *Science translational medicine*, *9*(394).

Bahadoran, Z., Tohidi, M., Nazeri, P., Mehran, M., Azizi, F., & Mirmiran, P. (2012). Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: A randomized double-blind clinical trial. *International journal of food sciences and nutrition*, *63*(7), 767–771.

- Bak, S., Tax, F. E., Feldmann, K. A., Galbraith, D. W., & Feyereisen, R. (2001). CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The plant cell*, *13*(1), 101–111.
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelifa, A., Zhu, Z., & Koubaa, M. (2016). Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: Impact of processing. *Frontiers in nutrition*, *3*, 24.
- Bhandari, S. R., Jo, J. S., & Lee, J. G. (2015). Comparison of glucosinolate profiles in different tissues of nine *Brassica* crops. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(9), 15827–15841.
- Biegańska-Marecik, R., Radziejewska-Kubzdela, E., & Marecik, R. (2017). Characterization of phenolics, glucosinolates and antioxidant activity of beverages based on apple juice with addition of frozen and freeze-dried curly kale leaves (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* L.). *Food chemistry*, *230*, 271–280.
- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C. E., Burow, M., Rollin, P., & Agerbirk, N. (2020). Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*, *169*, 112100.
- Bosetti, C., Filomeno, M., Riso, P., Polesel, J., Levi, F., Talamini, R., Montella, M., Negri, E., Franceschi, S., & La Vecchia, C. (2012). Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case-control studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *23*(8), .
- Brunelli, D., Tavecchio, M., Falcioni, C., Frapolli, R., Erba, E., Iori, R., Rollin, P., Barillari, J., Manzotti, C., Morazzoni, P., & D'Incalci, M. (2010). The isothiocyanate produced from glucomoringin inhibits NF-κB and reduces myeloma growth in nude mice *in vivo*. *Biochemical pharmacology*, *79*(8), 1141–1148.
- Burow, M., & Halkier, B. A. (2017). How does a plant orchestrate defense in time and space? Using glucosinolates in *Arabidopsis* as case study. *Current opinion in plant biology*, *38*, 142–147.
- Buskov, S., Serra, B., Rosa, E., Sørensen, H., & Sørensen, J. C. (2002). Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll). *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(4), 690–695.

- Caglayan, B., Kilic, E., Dalay, A., Altunay, S., Tuzcu, M., Erten, F., Orhan, C., Gunal, M. Y., Yulug, B., Juturu, V., & Sahin, K. (2019). Allyl isothiocyanate attenuates oxidative stress and inflammation by modulating Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways in traumatic brain injury in mice. *Molecular biology reports*, 46(1), 241–250.
- Callaway, E. C., Zhang, Y., Chew, W., & Chow, H. H. (2004). Cellular accumulation of dietary anticarcinogenic isothiocyanates is followed by transporter-mediated export as dithiocarbamates. *Cancer letters*, 204(1), 23–31.
- Campos, D., Aguilar-Galvez, A., García-Ríos, D., Chirinos, R., Limaymanta, E., & Pedreschi, R. (2019). Postharvest storage and cooking techniques affect the stability of glucosinolates and myrosinase activity of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum*). *International journal of food science and technology*, 54(7), 2387-2395.
- Catrysse, L., & van Loo, G. (2017). Inflammation and the metabolic syndrome: The tissue-specific functions of NF- κ B. *Trends in cell biology*, 27(6), 417–429.
- Chan, R., Lok, K., & Woo, J. (2009). Prostate cancer and vegetable consumption. *Molecular nutrition & food research*, 53(2), 201–216.
- Chen, S., & Andreasson, E. (2001). Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant physiology and biochemistry*, 39, 743-758.
- Chen, Y. Z., Pang, Q. Y., He, Y., Zhu, N., Branstrom, I., Yan, X. F., & Chen, S. (2012). Proteomics and metabolomics of Arabidopsis responses to perturbation of glucosinolate biosynthesis. *Molecular plant*, 5(5), 1138–1150.
- Ciska, E., Kozłowska, H. (2001). The effect of cooking on the glucosinolates content in white cabbage. *European food research and technology*, 212, 582–587.
- Clarke, D. B. (2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical methods*, 2, 310-325.
- Conaway, C. C., Getahun, S. M., Liebes, L. L., Pusateri, D. J., Topham, D. K., Botero-Omary, M., & Chung, F. L. (2000). Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutrition and cancer*, 38(2), 168–178.
- Del Carmen Martínez-Ballesta, M., Moreno, D. A., & Carvajal, M. (2013). The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in *Brassica*. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 11607–11625.

- Dinkova-Kostova, A. T., & Kostov, R. V. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in molecular medicine*, 18(6), 337–347.
- Elfoul, L., Rabot, S., Khelifa, N., Quinsac, A., Duguay, A., & Rimbault, A. (2001). Formation of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS microbiology letters*, 197(1), 99–103.
- El-Shora, H., El-Shobaky, A., & El-Atrozy, M. (2016). Activity of purified bacterial myrosinase and its essential residues. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 5(2), 567-578.
- Endara, M., & Coley, P. D. (2011). The resource availability hypothesis revisited: A meta-analysis. *Functional ecology*, 25, 389-398.
- Engelen-Eigles, G., Holden, G., Cohen, J. D., & Gardner, G. (2006). The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(2), 328–334.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5–51.
- Fernández-León, A. M., Fernández-León, M. F., González-Gómez, D., Ayuso, M. C., & Bernalte, M. J. (2017). Quantification and bioaccessibility of intact glucosinolates in broccoli ‘Parthenon’ and Savoy cabbage ‘Dama.’ *Journal of food composition and analysis*, 61, 40–46.
- Frerigmann, H., & Gigolashvili, T. (2014). MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, 7(5), 814–828.
- Fujioka, N., Fritz, V., Upadhyaya, P., Kassie, F., & Hecht, S. S. (2016). Research on cruciferous vegetables, indole-3-carbinol, and cancer prevention: A tribute to Lee W. Wattenberg. *Molecular nutrition & food research*, 60(6), 1228–1238.
- Gabrys, B., & Tjallingii, W. F. (2002). The role of sinigrin in host plant recognition by aphids during initial plant penetration. *Entomologia experimentalis et applicata*, 104, 89–93.
- Galletti S, Bernardi R, Leoni O, Rollin P, Palmieri S. (2001). Preparation and biological activity of four epiprogoitrin myrosinase-derived products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49, 471–476.

- Gardner, G. (2002). The center for plants and human health: An interdisciplinary approach. NABC report on foods for health: Integrating agriculture, medicine and food for future health. In National Agricultural Biotechnology Council; Eaglesham, A., Carlson, C., Hardy, R.W.F., Eds.; USG Publishers: Ithaca, NY, USA, 299–308.
- Getahun, S. M., & Chung, F. L. (1999). Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : A publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 8(5), 447–451.
- Gilmore, T., D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680–6684.
- Glendening, T. M., & Poulton, J. E. (1988). Glucosinolate biosynthesis: Sulfation of desulfobenzylglucosinolate by cell-free extracts of cress (*Lepidium sativum* L.) seedlings. *Plant physiology*, 86(2), 319–321.
- Gründemann, C., & Huber, R. (2018). Chemoprevention with isothiocyanates—From bench to bedside. *Cancer letters*, 414, 26–33.
- Gupta, P., Kim, B., Kim, S. H., & Srivastava, S. K. (2014). Molecular targets of isothiocyanates in cancer: recent advances. *Molecular nutrition & food research*, 58(8), 1685–1707.
- Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual review of plant biology*, 57, 303–333.
- Hansen, C. H., Du, L., Naur, P., Olsen, C. E., Axelsen, K. B., Hick, A. J., Pickett, J. A., & Halkier, B. A. (2001). CYP83b1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis*. *The journal of biological chemistry*, 276(27), 24790–24796.
- Hara, M., Harazaki, A., & Tabata, K. (2012). Administration of isothiocyanates enhances heat tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant growth regulation*, 69, 71–77.
- Hara, M., Yatsuzuka, Y., Tabata, K., & Kuboi, T. (2010). Exogenously applied isothiocyanates enhance glutathione S-transferase expression in *Arabidopsis* but act as herbicides at higher concentrations. *Journal of plant physiology*, 167(8), 643–649.
- Hasapis, X., & MacLeod, A., J. (1982). Benzylglucosinolate degradation in heat-treated *Lepidium sativum* seeds and detection of a thiocyanate-forming factor. *Phytochemistry*, 21, 1009–1013.

- Herr, I., & Buchler, M. W. (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer treatment reviews*, *36*(5), 377–383.
- Hopkins, R. J., van Dam, N. M., & van Loon, J. J. (2009). Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annual review of entomology*, *54*, 57–83.
- Jiao, D., Ho, C. T., Foiles, P., & Chung, F. L. (1994). Identification and quantification of the N-acetylcysteine conjugate of allyl isothiocyanate in human urine after ingestion of mustard. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : A publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *3*(6), 487–492.
- Johnson, I. T. (2002). Glucosinolates in the human diet. Bioavailability and implications for health. *Phytochemistry reviews*, *1*(2), 183.
- Johnson, T. L., Dinkova-Kostova, A. T., & Fahey, J. W. (2015). Glucosinolates from the *Brassica* vegetables and their health effects. In *Encyclopedia of food and health*, 248–255.
- Jones, A. M., Winge, P., Bones, A. M., Cole, R., & Rossiter, J. T. (2002). Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *32*(3), 275–284.
- Jones, R. B., Frisina, C., Winkler, S., Imsic, M. & Tomkins, B. (2010). Cooking method significantly effects glucosinolate content and sulforaphane production in broccoli florets. *Food chemistry*. *123*. 237-242.
- Juge, N., Mithen, R. F., & Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: A comprehensive review. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *64*(9), 1105–1127.
- Khokon, M. A., Jahan, M. S., Rahman, T., Hossain, M. A., Muroyama, D., Minami, I., Munemasa, S., Mori, I. C., Nakamura, Y., & Murata, Y. (2011). Allyl isothiocyanate (AITC) induces stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment*, *34*(11), 1900–1906.
- Kroymann, J., Textor, S., Tokuhisa, J. G., Falk, K. L., Bartram, S., Gershenzon, J., & Mitchell-Olds, T. (2001). A gene controlling variation in *Arabidopsis* glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. *Plant physiology*, *127*(3), 1077–1088.

- Krul, C., Humblot, C., Philippe, C., Vermeulen, M., van Nuenen, M., Havenaar, R., & Rabot, S. (2002). Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model. *Carcinogenesis*, 23(6), 1009–1016.
- Lazzeri, L., Curto, G., Leoni, O., & Dallavalle, E. (2004). Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(22), 6703–6707.
- Liou, C. S., Sirk, S. J., Diaz, C., Klein, A. P., Fischer, C. R., Higginbottom, S. K., Erez, A., Donia, M. S., Sonnenburg, J. L., & Sattely, E. S. (2020). A metabolic pathway for activation of dietary glucosinolates by a human gut symbiont. *Cell*, 180(4), 717–728.
- Ljubej, V., Radojčić Redovniković, I., Salopek-Sondi, B., Smolko, A., Roje, S., & Šamec, D. (2021). Chilling and freezing temperature stress differently influence glucosinolates content in *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(7), 1305.
- Mazumder, A., Dwivedi, A., & du Plessis, J. (2016). Sinigrin and its therapeutic benefits. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(4), 416.
- Maina, S., Misinzo, G., Bakari, G., & Kim, H. Y. (2020). Human, animal and plant health benefits of glucosinolates and strategies for enhanced bioactivity: A systematic review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(16), 3682.
- Mewis, I., Appel, H. M., Hom, A., Raina, R., & Schultz, J. C. (2005). Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant physiology*, 138(2), 1149–1162.
- Mewis, I., Ulrichs, C., & Schnitzler, W. (2002). The role of glucosinolates and their hydrolysis products in oviposition and host-plant finding by cabbage webworm, *Hellula undalis*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 105, 129–139.
- Mikkelsen, M. D., Naur, P., & Halkier, B. A. (2004). *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *The plant journal : for cell and molecular biology*, 37(5), 770–777.
- Mi, L., Di Pasqua, A. J., & Chung, F. L. (2011). Proteins as binding targets of isothiocyanates in cancer prevention. *Carcinogenesis*, 32(10), 1405–1413.

- Miles, C. I., del Campo, M. L., & Renwick, J. A. (2005). Behavioral and chemosensory responses to a host recognition cue by larvae of *Pieris rapae*. *Journal of comparative physiology. A, neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, 191(2), 147–155.
- Livingstone, T. L., Beasy, G., Mills, R. D., Plumb, J., Needs, P. W., Mithen, R., & Traka, M. H. (2019). Plant bioactives and the prevention of prostate cancer: Evidence from human studies. *Nutrients*, 11(9), 2245.
- Ludwig-Müller, J., Krishna, P., & Forreiter, C. (2000). A glucosinolate mutant of *Arabidopsis* is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress. *Plant physiology*, 123(3), 949–958.
- Müller, R., de Vos, M., Sun, J. Y., Sønderby, I. E., Halkier, B. A., Wittstock, U., & Jander, G. (2010). Differential effects of indole and aliphatic glucosinolates on lepidopteran herbivores. *Journal of chemical ecology*, 36(8), 905–913.
- Noret, N., Meerts, P., Tolrà, R., Poschenrieder, C., Barceló, J., & Escarre, J. (2005). Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of zinc and glucosinolates. *The new phytologist*, 165(3), 763–771.
- Okunade, O. A., Ghawi, S. K., Methven, L., & Niranjana, K. (2015). Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* L. W.D.J. Koch. var. *nigra*), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. *juncea*) and yellow mustard (*Sinapis alba* L. subsp. *maire*) seeds. *Food chemistry*, 187, 485–490.
- Oliviero, T., Verkerk, R., & Dekker, M. (2018). Isothiocyanates from *Brassica* vegetables—effects of processing, cooking, mastication, and digestion. *Molecular nutrition & food research*, 62(18), e1701069.
- Padilla, G., Carrea, M. E., Velasco, P., de Haro, A., & Ordás, A. (2007). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry*, 68(4), 536–545.
- Pang, Q., Guo, J., Chen, S., Chen, Y., Zhang, L., Fei, M., Jin, S., Li, M., Wang, Y., & Yan, X. (2012). Effect of salt treatment on the glucosinolate-myrosinase system in *Thellungiella salsuginea*. *Plant and soil*, 355, 363–374.
- Prawan, A., Saw, C. L., Khor, T. O., Keum, Y. S., Yu, S., Hu, L., & Kong, A. N. (2009). Anti-NF-kappaB and anti-inflammatory activities of synthetic isothiocyanates: effect of chemical structures and cellular signaling. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 202–211.

- Prieto, M. A., López, C. J., & Simal-Gandara, J. (2019). Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Advances in food and nutrition research*, 90, 305–350.
- Qasim, M., Ashraf, M., Rehman, S., & Rha, E.S. (2003). Salt-induced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance. *Biologia plantarum*, 46, 629-632.
- Radovich, T. J. K., Kleinhenz, M. D., & Streeter, J. G. (2005). Irrigation timing relative to head development influences yield components, sugar levels, and glucosinolate concentrations in cabbage. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 130, 943–949.
- Rask, L., Andréasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., & Meijer, J. (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant molecular biology*, 42(1), 93–113.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D. J., Mitchell-Olds, T., & Kroymann, J. (2002). Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11223–11228.
- Redovniković, I. R., Textor, S., Lisnić, B., & Gershenzon, J. (2012). Expression pattern of the glucosinolate side chain biosynthetic genes MAM1 and MAM3 of *Arabidopsis thaliana* in different organs and developmental stages. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 53, 77–83.
- Rojas, J. (1999). Electrophysiological and behavioral responses of the cabbage moth to plant volatiles. *Journal of chemical ecology*, 25, 1867–1883.
- Rouzaud, G., Young, S. A., & Duncan, A. J. (2004). Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteers. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : A publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 13(1), 125–131.
- Rungapamestry, V., Duncan, A. J., Fuller, Z., & Ratcliffe, B. (2006). Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* Var. *capitata*) cooked for different durations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7628–7634.

- Salehin, M., Li, B., Tang, M., Katz, E., Song, L., Ecker, J. R., Kliebenstein, D. J., & Estelle, M. (2019). Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in *Arabidopsis* by regulating glucosinolate levels. *Nature communications*, *10*(1), 4021.
- Salma, U., Khan, T., & Shah, A. J. (2018). Antihypertensive effect of the methanolic extract from *Eruca sativa* Mill., (Brassicaceae) in rats: Muscarinic receptor-linked vasorelaxant and cardiogenic effects. *Journal of ethnopharmacology*, *224*, 409–420.
- Schreiner, M., Huyskens-Keil, S., Peters, P., Schonhof, I., Krumbein, A., & Widell, S. (2002). Seasonal climate effects on root colour and compounds of red radish. *Journal of the science of food and agriculture*, *82*(11), 1325–1333.
- Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K., & Talalay, P. (2001). Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : A publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *10*(5), 501–508.
- Stoner, G., Casto, B., Ralston, S., Roebuck, B., Pereira, C., & Bailey, G. (2002). Development of a multi-organ rat model for evaluating chemopreventive agents: efficacy of indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*, *23*(2), 265–272.
- Szücs, Z., Plaszkó, T., Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Emri, T., Bertóti, R., Sinka, L. T., Vasas, G., & Gonda, S. (2018). Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glucosinolate - myrosinase - isothiocyanate system. *BMC plant biology*, *18*(1), 85.
- Soundararajan, P., & Kim, J. S. (2018). Anti-carcinogenic glucosinolates in cruciferous Vegetables and their antagonistic effects on prevention of cancers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *23*(11), 2983.
- Sønderby, I. E., Geu-Flores, F., & Halkier, B. A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates--gene discovery and beyond. *Trends in plant science*, *15*(5), 283–290.
- Taljaard T. L. (1993). Cabbage poisoning in ruminants. *Journal of the South African Veterinary Association*, *64*(2), 96–100.

- Textor, S., de Kraker, J. W., Hause, B., Gershenzon, J., & Tokuhsa, J. G. (2007). MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *144*(1), 60–71.
- Tierens, K. F., Thomma, B. P., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., Mauch-Mani, B., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (2001). Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant physiology*, *125*(4), 1688–1699.
- Traka, M. H., Melchini, A., & Mithen, R. F. (2014). Sulforaphane and prostate cancer interception. *Drug discovery today*, *19*(9), 1488–1492.
- Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, *8*(1), 269–282.
- Tripathi, M. K., & Mishra, A. S. (2007). Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal feed, science and technology*, *132*(1–2), 1–27.
- Ulmer, B., Gillott, C., & Erlandson, M. (2001). Feeding preferences, growth, and development of *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) on Brassicaceae. *The Canadian entomologist*, *133*(4), 509–519.
- Velasco, P., Cartea, M. E., Gonzalez, C., Vilar, M., & Ordas, A. (2007). Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(3), 955–962.
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., De Schrijver, R., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., & Dekker, M. (2009). Glucosinolates in *Brassica* vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular nutrition & food research*, *53* Suppl 2, S219.
- Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S. (2009). Bioprotective effects of glucosinolates—A review. *LWT—Food Science and Technology*, *42*(10), 1561–1572.
- Wang, H., Wu, J., Sun, S., Liu, B., Cheng, F., Sun, R., & Wang, X. (2011). Glucosinolate biosynthetic genes in *Brassica rapa*. *Gene*, *487*(2), 135–142.
- Watanabe, H., Usami, R., Kishino, S., Osada, K., Aoki, Y., Morisaka, H., Takahashi, M., Izumi, Y., Bamba, T., Aoki, W., Suganuma, H., & Ogawa, J. (2021). Enzyme systems involved in

- glucosinolate metabolism in *Companilactobacillus farciminis* KB1089. *Scientific reports*, 11(1), 23715.
- Wittstock, U., Agerbirk, N., Stauber, E. J., Olsen, C. E., Hippler, M., Mitchell-Olds, T., Gershenzon, J., & Vogel, H. (2004). Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 4859–4864.
- Wittstock, U., & Halkier, B. A. (2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in plant science*, 7(6), 263–270.
- Wood, R. J. (2005). Bioavailability: definition, general aspects and fortificants. In B. Caballero, A. Prentice, L. Allen (Ed.). *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2nd ed. Oxford: Elsevier Ltd
- Wu, L., Noyan Ashraf, M. H., Facci, M., Wang, R., Paterson, P. G., Ferrie, A., & Juurlink, B. H. (2004). Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7094–7099.
- Wu, Q. J., Yang, G., Zheng, W., Li, H. L., Gao, J., Wang, J., Gao, Y. T., Shu, X. O., & Xiang, Y. B. (2015). Pre-diagnostic cruciferous vegetables intake and lung cancer survival among Chinese women. *Scientific reports*, 5, 10306.
- Ye, L., Dinkova-Kostova, A. T., Wade, K. L., Zhang, Y., Shapiro, T. A., & Talalay, P. (2002). Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 316(1-2), 43–53.
- Zhang, H., Schonhof, I., Krumbein, A., Gutezeit, B., Li, L., Stuzel, H., & Schreiner, M. (2008). Water supply and growing season influence glucosinolate concentration and composition in turnip root (*Brassica rapa* ssp *rapifera* L.). *Journal of plant nutrition and soil science*, 171, 255–265.
- Zhao, Z., Zhang, W., Stanley, B. A., & Assmann, S. M. (2008). Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *The plant cell*, 20(12), 3210–3226.

7. Sažetak

Glukozinolati su sumporom bogati specijalizirani biljni metaboliti zastupljeni u brojnim vrstama reda Capparales, gdje spadaju i prehrambeno značajne vrste porodice Brassicaceae (kupusnjače). Osnovna uloga glukozinolata u biljnom tkivu je obrana od herbivora i patogena. Glukozinolati su inertni sve dok ne dođu u kontakt s enzimom mirozinaza prilikom oštećenja tkiva. Mirozinaza hidrolizira glukozinolate u niz bioaktivnih, toksičnih produkata oporog okusa. Osim kod biotičkog stresa uzrokovanog djelovanjem biljojeda i patogena, glukozinolati sudjeluju i u regulaciji odgovora biljke na abiotičke stresore. Brojna istraživanja dokazala su pozitivan učinak redovitog konzumiranja kupusnjača na ljudsko zdravlje i neki produkti hidrolize glukozinolata posjeduju antikancerogena i protuupalna svojstva. Osim pozitivnog djelovanja na ljudsko zdravlje, pojedini glukozinolati i njihovi produkti razgradnje mogu imati i antinutritivna svojstva. Opisane su i bakterijske mirozinaze koje hidroliziraju glukozinolate u probavnom traktu sisavaca. Kuhanje i drugi procesi obrade biljaka, značajno utječu na biorasploživost glukozinolata. S obzirom na njihova ljekovita svojstva, istražuju se novi načini pohrane i obrade biljnog materijala kako bi se spriječio gubitak glukozinolata i maksimizirala biorasploživost. Brojna istraživanja posvećena su proučavanju različitih glukozinolata i njihovih produkata hidrolize u svrhu razvoja novih terapeutika.

Ključni pojmovi: glukozinolati, biološke uloge, mirozinaza, biorasploživost

8. Summary

Glucosinolates are sulfur-rich specialized plant metabolites found in the order Brassicales. Glucosinolates play an important role in plant defense against herbivores and pathogens. Upon tissue damage, glucosinolates come into contact with enzyme myrosinase and are hydrolyzed to a variety of bioactive, toxic products of bitter taste. Glucosinolates also play an important role in regulating plant response to abiotic stress. Plenty of research shows that regular consumption of cruciferous vegetables has a positive impact on overall human health. Some products of glucosinolate degradation show anti-inflammatory and anticarcinogenic properties. There are also reports of antinutritive properties in some glucosinolate derivatives that can lead to a number of metabolic disorders. Other than plant myrosinase, bacterial myrosinases have also been described. Gut microbiota has an important role in glucosinolate hydrolysis in mammalian digestive system. Cooking and other forms of plant tissue processing have a huge impact on glucosinolate availability. Considering the medicinal properties of glucosinolates, there is a lot of effort given in optimizing the existing and finding new methods of storing and processing of vegetables to maximize the bioavailability. Much research is focused in developing new therapeutics based on glucosinolates or their derivatives to fight diseases.

Key words: glucosinolates, biological role, myrosinase, bioavailability

9. Životopis

Rođena sam u Zagrebu 2000. godine gdje sam pohađala Gimnaziju Lucijana Vranjanina. Za vrijeme srednje škole dva puta sam sudjelovala na državnom natjecanju iz biologije. Dvije uzastopne godine dodijeljena mi je stipendija Grada Zagreba za izvrsnost. 2018. godine upisujem studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica sam rektorove nagrade za akademsku godinu 2019./2020. za rad “Utjecaj umjerenih razina antropogenih stresora na longitudinalni sastav i strukturu zajednica vodengrinja (Hydrachnidia) u lotičkom ekosustavu” u kategoriji za individualni znanstveni rad. Za isti rad dodijeljena mi je studentska stipendija za sudjelovanje na znanstvenom skupu 4th CESAMIR. Isti rad predstavila sam na ISEM9 (9th International Symposium of Ecologists of Montenegro) online simpoziju te Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (SiSB). Na trećoj godini studija bila sam demonstrator na kolegiju Biologija stanice. U slobodno vrijeme bavim se jahanjem i obukom potražnih pasa.