

UTJECAJ LUTEOLINA I KRIZINA NA VIJABILNOST I OKSIDATIVNI STRES STANICA OSTEOSARKOMA, GLIOBLASTOMA I HUMANIH EMBRIONALNIH STANICA BUBREGA

Ostojić, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Health Studies / Sveučilište u Rijeci, Fakultet zdravstvenih studija u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:243815>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Health Studies - FHSRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET ZDRAVSTVENIH STUDIJA
DIPLOMSKI SVEUČLIŠNI STUDIJ
KLINIČKI NUTRICIONIZAM

Karla Ostojić

**UTJECAJ LUTEOLINA I KRIZINA NA VIJABILNOST I OKSIDATIVNI STRES
STANICA OSTEOSARKOMA, GLIOBLASTOMA I HUMANIH EMBRIONALNIH
STANICA BUBREGA**

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF HEALTH STUDIES
GRADUATE UNIVERSITY STUDY OF CLINICAL NUTRITION

Karla Ostojić

**LUTEOLIN AND CHRYSIN EFFECT ON VIABILITY AND OXIDATIVE STRESS
ON OSTEOSARCOMA, GLIOBLASTOMA AND HUMAN EMBRYONIC KIDNEY
CELLS**

Graduation Thesis

Rijeka, 2021

Mentor rada: prof.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić

Diplomski rad obranjen je _____ u/na _____, pred povjerenstvom
u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

TURNITIN IZVJEŠĆE

Turnitin Originality Report

Diplomski rad by Karla Ostojić

From Diplomski Karla Ostojić (Diplomski 2020/2021)

Processed on 08-Jun-2021 9:41 AM CEST

ID: 1602712591

Word Count: 23181

Similarity Index 15%

Similarity by Source

- Internet Sources: 14%
- Publications: 10%
- Student Papers: 8%

Ovaj diplomski rad izrađen je pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Kraljević Pavelić te u suradnji s laboratorijem Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod neposrednim laboratorijskim vodstvom izv.prof.dr.sc. Inge Urlić.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Sandri Kraljević Pavelić s Katedre za temeljne medicinske znanosti Fakulteta zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci, na stručnom vodstvu, trudu i mnogobrojnim savjetima i sugestijama tijekom pisanja ovog rada. Hvala Vam na razumijevanju, strpljenju i susretljivosti.

Zahvaljujem laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izv.prof.dr.sc. Ingi Urlić na volji, želji, posvećenom vremenu i velikom strpljenju koje je uložila u izradu ovog diplomskog rada. Hvala što ste me naučili brojnim korisnim stvarima tijekom rada u laboratoriju.

Velika hvala i dr.sc. Katarini Caput Mihalić i doktorandici Maji Ledinski na podršci i savjetima kad god je trebalo.

Najveću zahvalu želim uputiti svojim roditeljima i bratu na stalnoj motivaciji i podršci. Hvala vam što ste vjerovali u mene i omogućili da ostvarim svoje ciljeve jer bez vas to ne bi bilo moguće.

Hvala i mojim prijateljima koju su bili uz mene i uljepšali mi studentski život.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Stanični mehanizmi poremećeni u tumorigenezi	2
1.1.1. Stanični ciklus	2
1.1.2. Reaktivni kisikovi spojevi	16
1.1.3. Popravak DNA.....	23
1.2. Apoptoza	25
1.3. Autofagija	30
1.4. Starenje stanica	34
1.5. Podjela i klasifikacija tumora.....	37
1.5.1. Osteosarkom	38
1.5.2. Glioblastom	38
1.6. Prirodni spojevi u liječenju malignih oboljenja	39
1.6.1. Flavonoidi	41
2. CILJ RADA.....	48
3. MATERIJALI I METODE.....	49
3.1. Korištene kemikalije i reagensi.....	49
3.2. Metode	50
3.2.1. Uzgoj stanica	50
3.2.2. Mjerenje stanične vijabilnosti uz pomoć MTT testa	51
3.2.3. Kvantitativna metoda procjene oksidativnog stresa	53
3.2.4. Slikovna metoda detekcije oksidativnog stresa	54
3.3. Statistička obrada rezultata	54
4. REZULTATI.....	55
4.1. Procjena vijabilnosti stanica MTT testom	55
4.2. Procjena oksidativnog stresa.....	62
5. RASPRAVA.....	69
6. ZAKLJUČAK.....	75
7. LITERATURA.....	77

POPIS KRATICA

DNA- deoksiribonukleinska kiselina, *engl. Deoxyribonucleic Acid*

Cdk- ciklin-ovisna kinaza, *engl. Cyclin-Dependent Kinase*

CAK- Cdk- aktivirajuća kinaza, *engl. Cyclin-Dependent Activating Kinase*

EGF- epidermalni faktor rasta, *engl. Epidermal growth factor*

PDGF- faktor rasta izveden iz trombocita, *engl. Platelet derived growth factor*

IGF- inzulinu sličan faktor rasta, *engl. Insulin like growth factor*

FGF- faktor rasta fibroblasta, *engl. Fibroblast growth factor*

TNF α - faktor nekroze tumora alfa, *engl. Tumor necrosis factor α*

TGF- β - faktor rasta tumora beta, *engl. Transforming growth factor β*

SMAD— molekula Smad, *engl. small mothers against decapentaplegic*

PI3-kinaza- fosfoinozimid kinaza 3, *engl. Phosphoinositide 3-kinase*

BMP- morfogenetskog proteina kostiju, *engl. Bone morphogenetic protein*

EMT- epitelno mezenhimalna tranzicija, *engl. Epithelial to mesenchymal transdifferentiation*

AKT- protein kinaza B, *engl. Protein kinase B*

TGF- β R2- receptor 2 transformirajućeg faktora rasta, *engl. Transforming growth factor β receptor 2*

VEGF- vaskularni endotelni čimbenik rasta, *engl. Vascular endothelial growth factor*

HIF- hipoksija inducirani faktor, *engl. Hypoxia-inducible factor*

ECM- izvanstanični matriks, *engl. Extracellular matrix*

MAPK- Članovi porodice proteina kinaze aktivirane mitogenom, *engl. Mitogen-activated protein kinase*

JNK- c-jun NH2-terminalna kinaza, *engl. c-Jun NH2-Terminal Kinase*

PCK- protein kinaza C, *engl. Protein kinase C*

NF- κ B- nuklearni faktor kappa B, *eng. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

AP-1- protein aktivator-1, *engl. Activator protein 1*

MMP- matriks metaloproteinaze, *engl. Matrix metalloproteinases*

ROS- reaktivni kisikovi spojevi, *engl. Reactive oxygen species*

RNS- reaktivni dušikovi spojevi, *engl. Reactive nitrogen species*

O₂⁻ - superoksid, *engl. Superoxide*

H₂O₂- hidrogen peroksid, *engl. Hydrogen peroxide*

ATP- adenzin-trifosfat, *eng. Adenosine triphosphate*

SOD1- superoksid dizmutaza 1, *engl. Superoxide dismutase 1, Cu/Zn superoxide dismutase 1*

SOD2- superoksid dizmutaza 2, *engl. Superoxide dismutase 2, Cu/Zn superoxide dismutase 2*

XO- ksantin oksidaza, *engl. Xanthine oxidase*

ER- Endoplazmatski retikulum, *engl. Endoplasmic reticulum*

NOX- NADH oksidaze, *engl. NADPH oxidase*

GPX1,4- glutation peroksidaza 1,4, *engl. Glutathione Peroxidase 1,4*

NADH- nikotinamid adenin dinukleotid, *engl. Nicotinamide adenine dinucleotide*

NRF2- faktor 2 povezan s eritroidom 2 s nuklearnim faktorom, *engl. The nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

GSH- glutation, *engl. Glutathione*

TNX- tireoredoksin, *engl. Thioredoxin*

GR- glutation reduktaza, *engl. Glutathione reductase*

GPX- glutation peroksidaza, *engl. Glutathione peroxidase*

STAT3 transduktor signala i aktivator transkripcije 3, *engl. Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*

NER- sustav popravka izrezivanjem nukleotida, *engl. Nucleotide excision repair*

SSB- jednostruki lom, *engl. Single-Strand Break*

DBS- dvolančani lom, *engl. Double stranded break*

BER- popravka ekscizijom baza, *engl. Base excision repair*

ATM- Ataksia Mutirana Telangiektazia, *engl. Ataxia-telangiectasia, mutated*

ATR- protein povezan s Rad3, *engl. ATM and Rad3 related protein*

DDR- odgovor na oštećenje DNA, *engl. DNA damage response*

PARP- Poli (ADP-riboza) polimeraza, *engl. Poly (ADP-ribose) Polymerase*

AIF- inducirani faktor apoptoze, *engl. Apoptosis-inducing factor*

EndoG- endonukleaza G, *engl. Endonuclease G*

SMAC/Diablo- sekundarni mitohondrijski aktivator/direktni inhibitor apoptotskog IAF vezujućeg proteina, *engl. Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein*

UPR- nesmotani proteini, *engl. Unfolded protein response*

ULK- ubikvitinsko-proteosomalni kompleks, *engl. Ubiquitin-proteasome system*

SASP- sekrecijski povezani sekretorni fenotip, *engl. Senescence-associated secretory phenotype*

DMSO- dimetil sulfoksid, *engl. Dimethyl sulfoxide*

DMEM- Dulbeccov modificirani Eaglov medij za uzgoj stanica, *engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium*

PBS- fosfatni pufer, *engl. phosphate-buffered saline*

FBS – fetalni teleći serum, *engl. Fetal bovine serum*

DCFHDA- dikloro-dihidro-fluorescein diacetat, *engl. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate*

U2OS- tumorska stanična linija osteosarkoma

A1235- tumorska stanična linija glioblastoma

HEK293- zdrave ljudske embrionalne stanice bubrega

SAŽETAK

Luteolin i krizin biološki su aktivni spojevi iz skupine flavonoida, a nalaze su u različitom voću, povrću te začinskom bilju i začinicima. Pripisuje im se blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje zbog širokog spektra biološkog učinka, primjerice protuupalnog, protualergijskog, protumikrobnog i protutumorskog učinka. Protutumorska aktivnost pripisuje se njihovim učincima na procese oksidativnog stresa i redoks ravnotežu u stanicama. Kao antioksidansi mogu smanjiti stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i time utjecati na smanjenje malignih procesa, a kao prooksidansi mogu povećati stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, što je toksično za tumorske stanice. ROS su fiziološke molekule koje sudjeluju u staničnoj signalizaciji, no ukoliko se poremete njihove fiziološke razine dolazi do povećanog oksidativnog stresa. Poremećaj u ravnoteži oksidativno-redukcijskih procesa unutar organizma dovodi do pomaka ravnoteže prema oksidaciji. Učinkovitost obrambenog antioksidativnog sustava u organizmu u tom slučaju opada, a razina slobodnih radikala raste. Ovaj poremećaj uzrokuje oštećenja različitih makromolekula primjerice proteina, lipida, DNA molekula. Uloga slobodnih radikala utvrđena je u patogenezi mnogih bolesti uključujući i maligna oboljenja. U ovom radu provedenom na tumorskim stanicama u uvjetima *in vitro* istražio se utjecaj luteolina i krizina na inhibiciju rasta tumorskih stanica i generiranje ROS molekula. S obzirom na protutumorski učinak flavonoida prethodno opisan u literaturi, uz dokazanu učinkovitost i potencijal u terapiji malignih oboljenja, cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinke luteolina i krizina kao potencijalnih spojeva u inhibiciji rasta stanica osteosarkoma (U2OS) i glioblastoma (A125). Utjecaj spojeva na vijabilnost stanica ispitan je u rastućim koncentracijama spojeva (20, 40, 60, 80, 100 μM) tijekom 24, 48 i 72h. U istim je stanicama izmjerena razina oksidativnog stresa nakon 24h tretmana analizom razina ukupnog ROS u stanicama. Dobiveni rezultati ukazuju na to kako su djelovanje luteolina i krizina na rast stanica i razine ROS u U2OS i A125 ovisili o koncentraciji i vremenu tretmana. Luteolin i krizin imali su selektivni učinak na rast testiranih tumorskih stanica U2OS i A125, u odnosu na netumorske stanice HEK293 što se može povezati s indukcijom molekula ROS čije su razine proporcionalno korelirale sa staničnom vijabilnošću. Dostupnost, selektivno toksično djelovanje na tumorske stanice te ekonomska isplativost čine ove flavonoide dobrim potencijalnim spojevima koji bi mogli imati mjesto u terapiji osteosarkoma i glioblastoma.

KLJUČNE RIJEČI: flavonoidi, luteolin, krizin, reaktivni kisikovi spojevi, oksidativni stres, osteosarkom, glioblastom

SUMMARY

Luteolin and chrysin are biologically active compounds belonging to the group of flavonoids, and can be found in various fruits, vegetables, herbs and spices. They bear a number of beneficial properties to the human health due to a wide range of biological effects such as for example antiinflammatory, antiallergic, antimicrobial and antitumor effects. Antitumor effects are attributed to their ability to act on the redox status of the cell. As antioxidants they can reduce the formation of reactive oxygen species (ROS) and thus counteract malignant processes, while as prooxidants they can increase the levels of reactive oxygen species (ROS) that are consequently toxic for the tumor cell. Reactive oxygen species (ROS) are physiological molecules that participate in cellular signaling, but at higher, nonphysiological levels they induce oxidative stress. Such disturbance in oxidation-reduction processes balance within the organism, cause a shift in balance in the organism directed towards oxidation. In such a situation the antioxidative defence system is impaired and the free radicals' levels are increased. This all underlies damage of various macromolecules such as for example proteins, lipids and DNA molecules. The role of free radicals has previously been established in the pathogenesis of many diseases, including malignancies. In the presented *in vitro* study, the effect of luteolin and chrysin were studied on inhibition of tumor cells growth and ROS generation. Given the promising anticancer effect of flavonoids described previously in the literature as well their proven effect and potential in therapy of malignant disease, the aim of this study was to examine the antiproliferative effects of luteolin and chrysin on osteosarcoma (U2OS) and glioblastoma (A125) cell lines. The effects of these compounds on cell viability was examined in a dose-dependent set-up where increasing concentrations from 20, 40, 60, 80 up to 100 μM were used for cell treatment over 24, 48 and 72h. In addition, oxidative stress levels were measured in parallel as well over 24h. The results indicate that luteolin and chrysin effects on the cell viability depend on concentration and time of treatment. Luteolin and chrysin have shown selective antitumor effects on target tumor cells U2OS and A1235, in comparison with nonmalignant cells HEK293, and the observed antiproliferative effect correlates with formation of ROS. Availability, selective toxicity, and economic cost-effectiveness point to tested flavonoids as potential antitumor compounds in the treatment of osteosarcomas and glioblastomas.

KEY WORDS: flavonoids, luteolin, chrysin, reactive oxygen species, oxidative stress, osteosarcoma, glioblastoma.

1. UVOD

Stanica je osnovna strukturna i funkcionalna jedinica svih organizama. Svaka stanica ima svoj životni ciklus. Somatske stanice se dijele, tkivno diferenciraju, obavljaju svoju fiziološku funkciju te naposljetku umiru. Poremećaji u bilo kojem od ovih procesa dovode do patoloških stanja, pa tako i maligne transformacije stanica koja je u osnovi malignih oboljenja i nastanka tumora. Nekoliko je ključnih razlika između zdrave i tumorske stanice (1). Znanje o obilježjima tumorskih stanica važno je kako bi se mogli razvijati postupci rane detekcije bolesti i liječenja. Obilježja tumorskih stanica, kako se danas smatra uvriježenim u znanostima o životu, su selektivni rast, proliferativna prednost u odnosu na druge stanice, poremećaj u odgovoru na stresne faktore koji potiče rast stanice, vaskularizacija, invazija i metastaziranje, promjena metaboličkih procesa i promijenjen imunološki odgovor (2). Pojmovi tumor i rak nisu jednoznačni. Tumor predstavlja nakupinu malignih ili nemalignih stanica koje abnormalno rastu, a rezultirajuće tkivo nema nikakvu fiziološku funkciju. Pojam rak međutim, podrazumijeva skup različitih bolesti koje uključuju i genetsku pozadinu, a karakterizira ih poremećaj stanične organizacije. Različiti dokazi upućuju na to kako taj poremećaj kreće zloćudnom transformacijom samo jedne zdrave stanice, stoga se za rak kaže da je monoklonalnog podrijetla. Nastanak raka, karcinogeneza, vrlo je složen, drugotrajan proces koji se odvija u više koraka (1). Teorija mutageneze opisuje karcinogenezu kao dinamički proces koji bi mogao početi i završiti unutar životnog vijeka stanice s određenim obilježjima raka tijekom tog procesa. Kontinuirana izloženost stanica različitim negativnim utjecajima dovodi ih do transformirane promjene u epigenetskom statusu, kromosomskom broju i rasporedu. Na putu do malignosti promijenjene su stanice podvrgnute tzv. evolucijskoj klonskoj selekciji pri čemu se razvijaju obilježja raka (2). Uobičajeni proces karcinogeneze može se podijeliti na tri faze: inicijacija, promocija i progresija. U fazi inicijacije djelovanjem različitih enzima, kao što je citokrom P450, potencijalni pro-mutagen pretvara se u mutagen i reagira s molekulom DNA uzrokujući različita nepovratna oštećenja kao što su: mutacije, transverzije, tranzicije ili male delecije. Tijekom faze promocije javljaju se promjene u ekspresiji genoma što pogoduje rastu i proliferaciji stanica. Zadnju fazu karakterizira kariotipska nestabilnost i nekontrolirani rast stanica. U toj fazi tumorigeničnost je nepovratno uspostavljena (3). Transformirane stanice imaju sposobnost proliferacije neovisno o faktorima rasta (tzv. autokrini regulacija rasta), nisu osjetljive na signale koji inhibiraju rast, neograničeno proliferiraju, nalaze se u okružju trajne tumorske angiogeneze, izbjegavaju mehanizme koji ograničavaju staničnu proliferaciju, kao što su to primjerice apoptoza i starenje, te imaju

sposobnost tkivne invazije i diseminacije u tijelu. Jedno od važnijih, međutim, svojstava stanice raka, prema recentnim istraživanjima, uz genomsku nestabilnost, je reprogramiran metabolizam i proces stvaranja energije te izbjegavanje imunskog odgovora, odnosno perzistentna tumorska upala (2). Uslijed ovako značajnih promjena na razini stanice odvijaju se promjene u staničnim signalnim putovima te dolazi do poremećaja proliferacije, pokretljivosti i preživljavanja (1). Smatralo se kako sva ova navedena obilježja, osim invazije i metastaziranja, predstavljaju karakteristike maligne tvorevine. Međutim, noviji podaci navode kako su upravo i ta obilježja karakteristike nekih benignih tvorevina gdje se navodi primjer endometrioze (2) te se istraživanja malignih oboljenja i za njih specifičnih obilježja, nastavljaju.

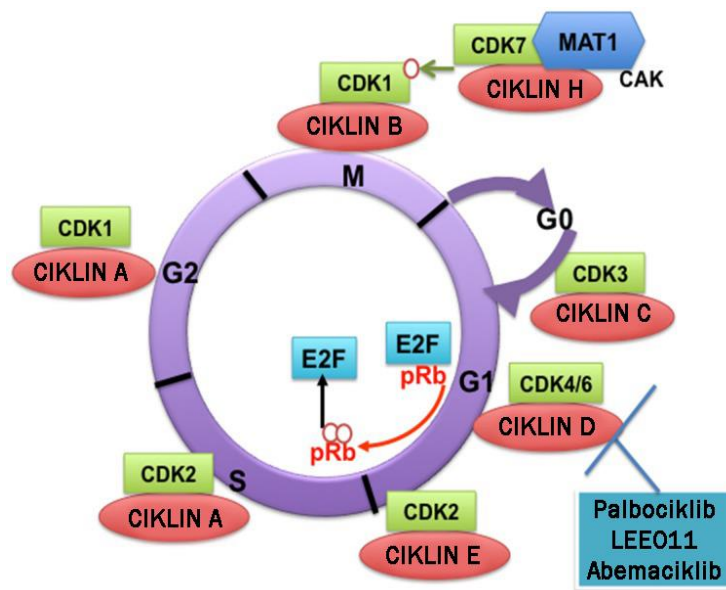
1.1. Stanični mehanizmi poremećeni u tumorigenezi

1.1.1. Stanični ciklus

Stanični ciklus je niz složenih događanja kroz koje prolazi svaka stanica. Stanični ciklus eukariotske stanice dijeli se na dvije faze. Prva faza je interfaza koja podrazumijeva rast i pripremu stanice za drugu fazu, tj. diobu. Interfaza je faza u kojoj stanica provede čak 90% vremena te uključuje podfaze G1, S i G2. Tijekom faze G1 stanica raste te se repliciraju organeli i centrosom. S faza je faza replikacije DNA te sinteze proteina i enzima koji sudjeluju u sintezi DNA. U G2 fazi sintetiziraju se proteini i aktiviraju metabolički procesi potrebni za diobu stanice tj. za mitozu, fazu M (4).

Faze staničnog ciklusa pod utjecajem su i regulacijom različitih staničnih i okolišnih signala. Pravilna kontrola i regulacija staničnog ciklusa imaju izuzetno važnu ulogu za normalan rast i razvoj stanica. Glavni regulatori staničnog ciklusa su molekule ciklini i kinaze ovisne o ciklinima (CDK, engl. cyclin-dependent kinase), koje potiču prelazak stanica između faza staničnog ciklusa, te inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima, koji sudjeluju u zaustavljanju prolaska stanice kroz stanični ciklus (4). Kontrolne točke staničnog ciklusa, u kojima su aktivni određeni ciklini, ključne su točke u kojima se stanica može zaustaviti i reagirati na nepravilnosti ili oštećenja. Glavna kontrolna točka je restriksijska točka (R) koju reguliraju okolišni signali - faktori rasta na prijelazu iz G1 u S fazu. Kada stanica prijeđe tu regulacijsku točku ona će završiti stanični ciklus do kraja, neovisno o sljedećim okolišnim uvjetima. Također, postoje i regulatorne točke koje zaustavljaju stanicu ukoliko se detektiraju nepravilnosti u DNA i tako osiguravaju daljnju replikaciju samo neoštećenih kromosoma. Održavanje točnog redoslijeda događaja tijekom ciklusa funkcionira na način da produkt jedne reakcije služi kao supstrat one sljedeće. CDK3 ciklin C pokreće ulazak stanice kroz G0 početnu fazu ciklusa. Kontrolna točka

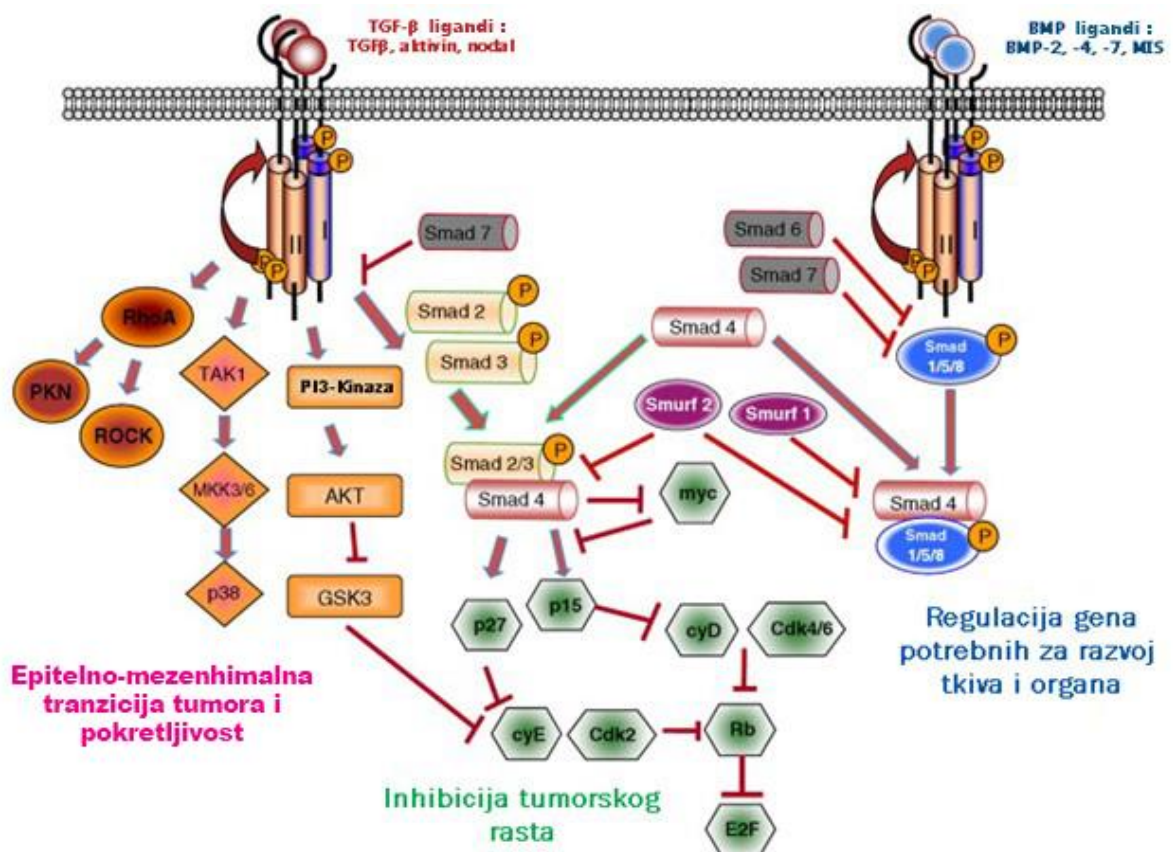
G1/S regulirana je CDK4 ciklinom D, CDK6 ciklinom D i CDK2 ciklinom E. Kompleks CDK4 i CDK6 ciklin D potiču fosforilaciju proteina retinoblastoma (pRB) i sekvencioniraju inhibitore: p21Cip1 i p27kip1 čime se aktivira kompleks CDK2 ciklin E. U kasnoj fazi G1, kompleks CDK2 ciklin E dovršava fosforilaciju i inaktivaciju pRB što dovodi do oslobađanja E2F transkripcijskog faktora i dolazi do prijelaza G1/S fazu. Kroz S fazu regulator prolaska stanice je kompleks CDK2 ciklin A, a kompleks CDK1 ciklin A kroz G2 fazu pripreme stanice za mitozu. Mitozu aktivira kompleks CDK1 ciklin B te je njegova aktivnost čvrsto regulirana fosforilacijom koja je potaknuta CDK-aktivirajućom kinazom CAK i inhibitorima fosforilacije (Slika 1) (5). Pri ovom procesu dođe li do smanjenog broja kinaza, stanica neće napredovati kroz ciklus i smanjit će se njezina proliferacija, no ako dođe do povećanog broja kinaza stanica će se hiperproliferirati, što predstavlja jedan od mehanizama nastanka tumora. Do takvog poremećaja može doći zbog aberantnih genetskih mutacija. Modifikacije mogu nastati zbog točkastih mutacija, DNA amplifikacije, kromosomskog preuređenja i zbog epigenetske modifikacije (metilacija i acetilacija). Te promjene mogu utjecati na gene tako da utišavaju ili pojačavaju njihovu ekspresiju, što će utjecati na proliferaciju stanica. Aberantna proliferacija stanica povezana je s dva bitna mehanizma koja se događaju u tumorskim stanicama, a to su: aktivacija onkogeni i inaktivacija tumor supresora.



Slika 1. Prikaz regulacije staničnog ciklusa ciklinima i kinazama ovisnim o ciklinima (CDK). CAK (engl. cyclin-dependent kinase CDK-activating kinase (CAK)) je enzimski kompleks koji se sastoji od kinaze ovisne o ciklinima 7 (CDK 7), ciklina H i MAT1 (menage a trois 1). Slobodni CAK je odgovoran za aktiviranje CDK1, CDK 2 i CDK 4. Transkripcijski faktor E2F aktivira se odvajanjem od proteina retinoblastoma (pRb). Lijekovi Palbociklib, LEE011, Abemaciclib koriste se kao selektivni inhibitori CDK4 i CDK6. Preuzeto i prilagođeno iz (5).

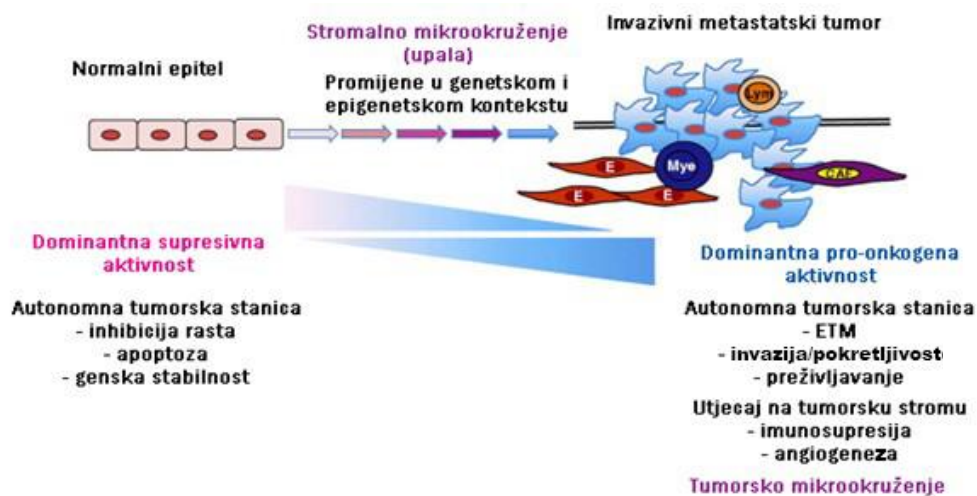
U stanicama raka signalni putovi rasta i proliferacije su narušeni. Njihovi signalni putovi su poremećeni na način da stanice raka osiguravaju prednost za preživljavanjem. U stanicama raka najčešće je poremećena ekspresija i/ili aktivnost faktora rasta, receptora i citosolnih signalnih molekula. Kod raka se aktiviraju ligandi, potiču rast malignih stanica koje izlučuju epitelne i stromalne stanice u nefiziološkim količinama, omogućujući progresiju raka (2). Faktori rasta vežu se za pripadajuće receptore i potiču sintezu DNA, odnosno napredovanje staničnog ciklusa. Najčešće poremećena funkcija i/ili količina u stanicama raka utvrđena je za epidermalni faktor rasta (EGF), faktor rasta izveden iz trombocita (PDGF), inzulinu sličan faktor rasta (IGF) i faktor rasta fibroblasta (FGF). Faktor nekroze tumora $TNF\alpha$ također može stimulirati proliferaciju stanica raka putem signalnog puta $NF-\kappa B$ (3). Faktor rasta tumora TGF- β multifunkcionalni je faktor rasta koji je prisutan samo kod sisavaca. Izlučuje se uglavnom u latentnom, inaktivnom kompleksu koji se odmah pohranjuje u izvanstanični matriks. Kad dođe do poremećaja u izvanstaničnom matriksu i mikrookruženju, uzrokovano različitim mehanizmima, kao što su to primjerice aktivacija proteaza, toplina, ionizirajuće zračenje i mehaničko istezanje, aktivacijom liganda dolazi do oslobađanja aktiviranog faktora TGF- β i vezanja za receptore. Oni potom aktiviraju kaskadni niz obitelji strukturno sličnih bjelančevina (Smad) receptorskog kompleksa te na taj način dolazi do promjene ekspresije gena (6). Uloga

TGF- β je poticati ili inhibirati staničnu proliferaciju, ovisno o specifičnoj situaciji. Aktiviranje TGF u specifičnim situacijama važno je zbog održavanja homeostaze tkiva i regeneracije oštećenog tkiva aktivacijom matičnih/progenitornih stanica (7). Smad kaskadni signalni put započinje fosforilacijom Smad 2 i Smad 3 čiji se kompleks veže za Smad 4 i odlazi u jezgru gdje regulira inhibiciju rasta tumora. Vežanje TGF- β za receptore također pokreće signalne putove poput RhoA (engl. Ras homolog family member A), p38 i PI3-kinazni (fosfoinozimid kinaza 3) signalni put. Štoviše, vežanje morfogenetskog proteina kostiju (BMP) za receptore kroz kaskadni niz, koji uključuje Smad 1,5,8 i vežanje sa Smad 4, utječe na regulaciju gena bitnih u rastu i razvoju tkiva i organa. Smad 6 i Smad 7 predstavljaju negativne regulatore TGF- β signalnog puta (Slika 2) (8).



Slika 2. Prikaz kaskadnog niza pokrenutog vezanjem (faktor rasta tumora b) TGF- β liganda: TGF- β , aktivin, nodal i (morfogenetski protein kostiju) BMP liganda: BMP -1, -4, -7, (mono-izopropil-fosforil-serin) MIS za specifične receptore. (engl. Ras homolog family member A) RhoA- (Polinukleotid kinaza) PKN- (RhoA povezana protein kinaza) ROCK; (TGF- β aktivirana kinaza) TAK1- (mitogenom aktivirane protein kinaze) MKK3/6-p38; (fosfoinozimid kinaza-3) PI3K- (protein kinaza B) AKT – (glikogen-sintaza kinaza-3) GSK. Smurf 1 i Smurf 2 (Smad ubikvitarni regulatorni faktor 1 i 2) negativni regulatori TGF- β i BMP signalnog puta, zajedno sa Smad 6 i 7. Smad (obitelj strukturno sličnih bjelančevina), (ciklin E) cycE, (kinaza ovisna o ciklinu2) Cdk2, (kinaza ovisna o ciklinu 4/6) Cdk4/6, (protein retinoblastoma) Rb, (transkripcijske faktor) E2F, (epitelno mezenhimalna tranzicija) EMT. Preuzeto i prilagođeno iz (8).

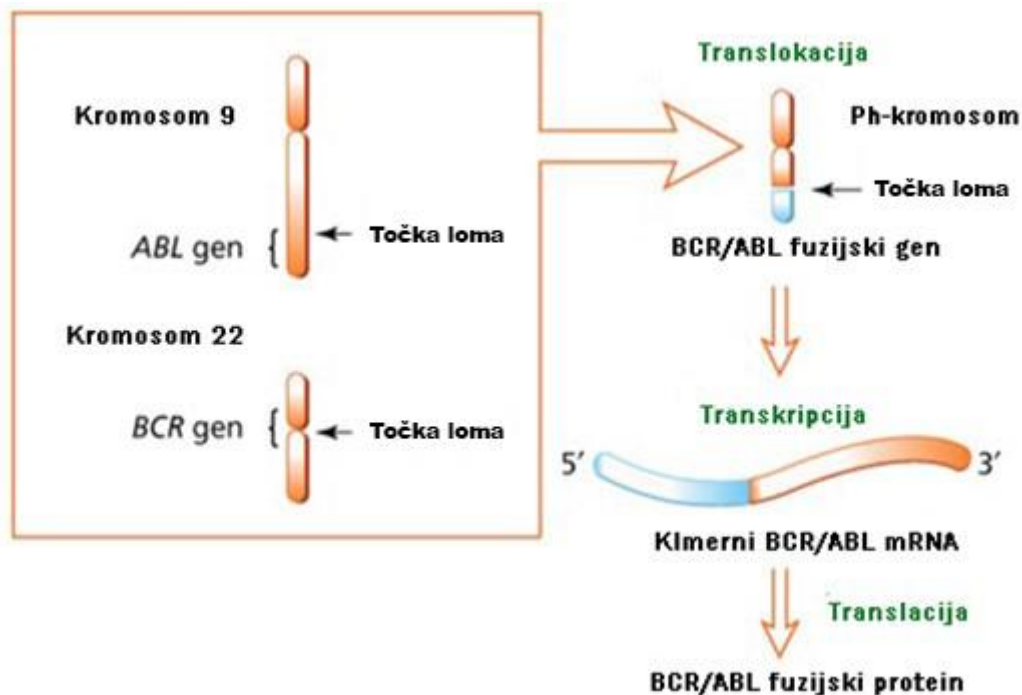
TGF- β , ovisno o stadiju bolesti, može biti promotor ili supresor rasta tumora (7). U ranoj fazi nastajanja raka ovaj ligand koči rast tumorskih stanica zaustavljanjem staničnog ciklusa, aktivacijom apoptoze i supresijom faktora rasta, citokina i kemokina (8). Međutim, u fazi progresije tumora djeluje proliferativno (Slika 3). Poticanjem proliferacije, angiogeneze i imunosupresijskom aktivnošću važan je čimbenik u poticanju rasta i širenja raka (7). Gubitak funkcije signalizacije TGF- β također može biti povezano s određenim vrstama raka. Mutacije u genskoj ekspresiji receptora TGF ili smanjena ekspresija i fosforilacija bilo koje komponente signalnog puta povezana je s različitim tumorima čovjeka. Često su nađene mutacije, kao primjerice njegovog pripadajućeg receptora transformirajući faktor rasta β receptor 2 (TGF- β R2) kod raka debelog crijeva, tumora želuca i glioma. Delecija BMP-specifični R-Smad (BR-Smad) -1,-5,-8 signalnog puta kod somatskih stanica ovarija i testisa dovela je do malignog razvoja (8). Te mutacije remete popravak DNA i važna su predispozicija za rak. Česte mutacije u signalnim komponentama TGF- β puta su mutacije proteina Smad. Promjene u genima povezanim sa receptorima TGF- β ili Smad često su povezane s lošijom prognozom bolesti (7).



Slika 3. Prikaz funkcije TGF- β kao tumorsupresora, kod normalnih stanica i u ranoj fazi razvoja raka, te njegova pro-onkogenska aktivnost u kasnijoj fazi tumorske bolesti. (Epitelno-mezenhimalna tranzicija) EMT, (fibroblast-povezan sa rakom) CAF. Preuzeto i prilagođeno iz (8).

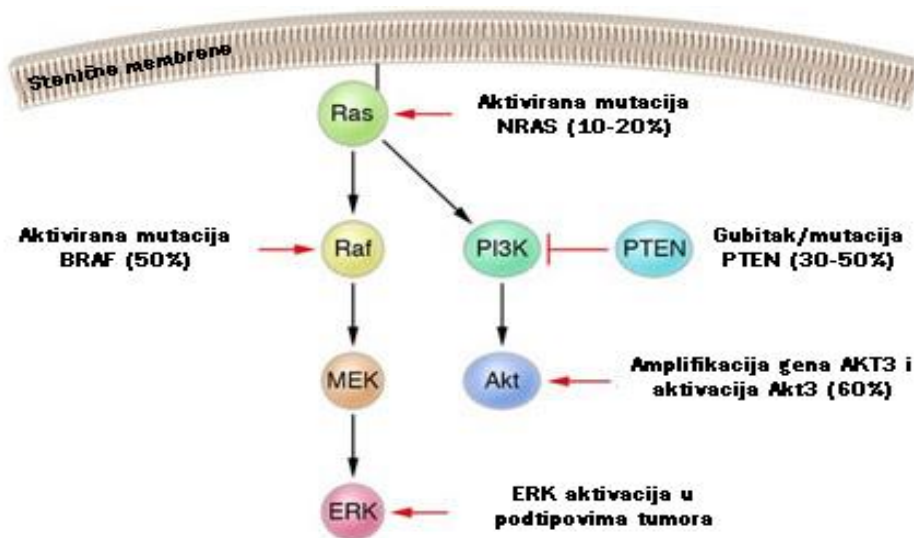
Receptori uključeni u malignu transformaciju na koje se vežu ligandi, osobito faktori rasta, često su, naime, promijenjeni u tumorskim stanicama. To se događa uslijed pojačane genske ekspresije, što dovodi do pretjerane ekspresije receptora, somatskih mutacija koje mogu dovesti do konstitutivne aktivacije receptora, kromosomske translokacije uslijed kojih nastaju tzv. fuzijski proteini koji potiču aberantnu signalizaciju te poremećaja u staničnim mehanizmima i

putovima recikliranja i razgradnje proteina (2). Primjer fuzijskog proteina poznati je Philadelphia kromosom (Ph) koji nastaje kao posljedica translokacije genetičkog materijala između kromosoma 9 i 22. Takav kromosom karakterističan je za krvotvorne stanice bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom (Slika 4) (9).



Slika 4. Prikaz fuzijskog proteina karakterističnog za kroničnu mijeloičnu leukemiju. Translokacijom genskog materijala, specifičnije dva proto-onkogene, *ABL1* na kromosomu 9 i *BCR* na kromosomu 22, nastaje kimerički gen *BCR-ABL1*. Taj novi gen pripisuje se u mRNA i dolazi do stvaranja izoformi *bcr-abl1* onkoproteina p210, p190, i p230 (9). Preuzeto i prilagođeno iz (10).

Najčešće promjene u signalizaciji događaju se nizvodno od receptora, što je još uvijek predmet istraživanja u malignim oboljenjima. U središtu složenih signalnih mreža, uključenih u malignu transformaciju stanica, nalazi se protein Ras koji je kronično aktiviran, primjerice, u 90% karcinoma gušterače, najčešće zbog točkastih mutacija gena *RAS* ili zbog inaktivacije mutacija u jednom od njegovih negativnih regulatora, npr. neurofibrom 1 (*NF1*). Ras signalizacija može biti *RAF-MEK-ERK* ili *PI3K-AKT-mTOR*. Sve komponente ovih signalnih putova mogu neovisno mutirati na sličan način u različitim vrstama raka. Mutacije *RAS* ili komponenti pripadajućih signalnih putova, mogu dovest do pojačanog rasta, proliferacije, blokiranja apoptoze, promjene metabolizma te promicanja mutagenoze i imunološke invazije (Slika 5) (2).



Slika 5. Prikazan je primjer važne signalne kaskade i najčešćih mutacija u razvoju melanoma koja utječe na niz različitih obilježja stanica raka. Mutacija u genu NRAS, prisutna je u 10-20% melanoma. Ona može pokrenuti oba Ras signalna puta. Raf-MEK-ERK signalni put može se aktivirati i mutacijom BRAF, koja je prisutna u 50% tumora melanoma. Zadnja komponenta tog signalnog puta, ERK, u mnogim tumorima je pronađena aktivirana iako nije došlo do mutacije u gornjim komponentama. Štoviše, u PI3K-Akt signalnom putu može doći do mutacija koje djeluju na obje komponente. Aktivirati se mogu uslijed smanjene ekspresije ili gubitka tumorsupresorskog gena PTEN, takva situacija pronađena je u 30-50% melanoma. Također, amplifikacija izoforme AKT3 pokazala se kao aktivator ovog signalnog puta u 60% melanoma. Preuzeto i prilagođeno iz (11).

Iz navedenog proizlazi važnost kontrole regulacije staničnog ciklusa i stanične smrti na normalan rast i razvoj stanica. Stanice raka proliferiraju upravo zato što dolazi do deregulacije staničnog ciklusa i njegovih kontrolnih točaka. Posebnu važnost u tim procesima deregulacije imaju različiti tumor-supresorski geni kao što su p53 i RB, onkogeni RAS, RAF i MYC te kinaze ovisne o ciklinima i ciklini D i E (1). Proteini retinoblastom (pRb) i p53 ključni su u kontroli ciklusa i stoga su u tumorima često mutirani, odnosno signalni putovi koje oni reguliraju u tumorskim stanicama često su poremećeni (2).

Onkogeni

Onkogenima nazivamo gene koji potječu od proto-onkogeni. Proto-onkogene pronalazimo u zdravoj stanici. Oni imaju važnu ulogu u regulaciji staničnih procesa kao što su: stanični rast, dioba, diferencijacija i preživljenje jer sudjeluju u prijenosu signala u stanici. Čimbenici rasta najčešće su signalne molekule koje, vezanjem na staničnu membranu stanice, aktiviraju receptore i pokreću kaskadni prijenos signala. Signal se često prenosi procesom fosforilacije proteina do transkripcijskog faktora koji potiču ekspresiju određenih gena. Mnogi proto-onkogeni su geni koji kodiraju za tirozin-kinaze, tj. proteine koji mogu fosforilirati tirozinske ogranke drugih proteina. Prijenos signala kroz stanicu uglavnom je vrlo složen proces u kojem može doći do aktivacije onkogeni. Ako dođe do promjene u samom proto-onkogeni ili u njegovu produktu, tj. proteinu koji postaje aktivniji, aktivirat će se onkogen. Načini na koje se onkogen može aktivirati su: mutacije u genomu, amplifikacija gena i translokacije kromosoma. Aktivirani onkogeni pokrenut će pojačanu aktivnost odgovarajućeg onkoproteina, pa će doći do nekontroliranog rasta i diobe stanica što dovodi do razvoja raka. Promjena u samo jednom alelu potrebna je da se očituje učinak onkogeni (1). Među glavnim genima smatraju se RAS i MYC geni.

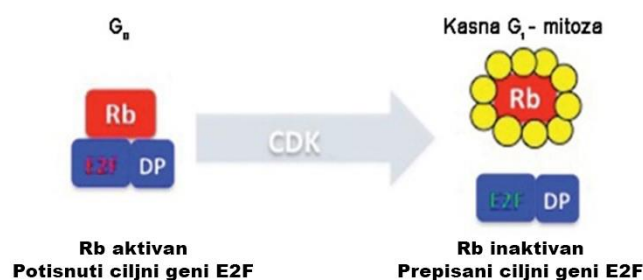
Normalna DNA sadrži RAS gen koji kodira unutarstanični protein Ras. Pri ulasku stanice u ciklus uključuju se faktori rasta koji se vežu za svoje receptore i aktiviraju Ras protein. Kaskadnom proliferacijom drugih proteina aktivira se transkripcijski faktor. On će potaknuti stvaranje određenih proteina potrebnih za rast stanice (CDK). No, kad je prisutna mutacija RAS gena, dolazi do neprekidne fosforilacije i stvaranja proteina koji su već aktivirani, što uzrokuje nakupljanja proteina za rast stanice (CDK). Mutacije u RAS, njegovu regulatornom proteinu ili signalnoj mreži mogu dovesti do pojačanog rasta, proliferacije, blokiranja apoptoze, promjene metabolizma te promicanje mutageneze i imunološke invazije. Upravo to je bitan pokazatelj kako pojedinačna signalna kaskada može utjecati na niz različitih obilježja raka (12).

Također, primjer je i gen MYC koji kodira proteine za rast stanica, preživljavanje i aktivnost. Pojavi li se mutacija u ovom genu, to omogućuje stanici hiperproliferaciju, bolje preživljenje i njezinu veću aktivnost. Sve to će omogućiti stanici lakši prolazak kroz stanični ciklus i regulatorne točke.

Tumor-supresori

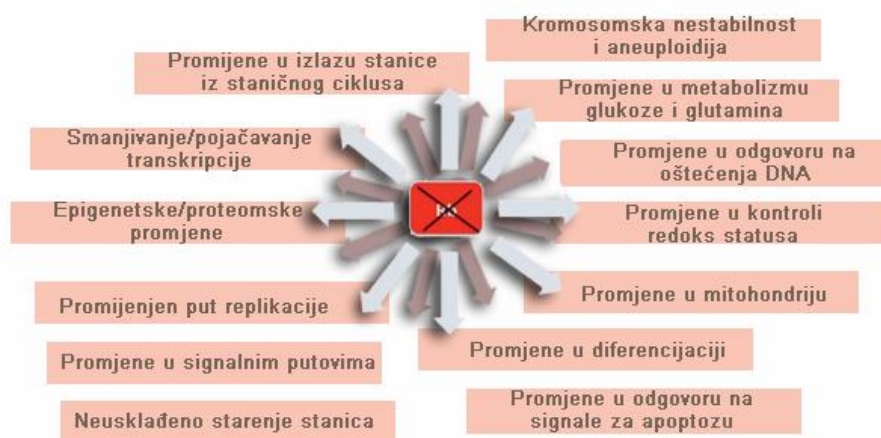
Tumor supresorski geni esencijalni su za kontroliranu proliferaciju stanica, aktivaciju apoptoze kako bi se uklonile neželjene stanice, povezivanje signala oštećene molekule DNA sa zaustavljanjem staničnog ciklusa, aktivaciju popravka DNA i inhibiciju metastaza. Inaktivacija tumor-supresora, koja može biti uzrokovana mutacijom i epigenetski, ili gubitak tumor-supresorskog gena, tj. njegovog proteinskog produkta, mehanizmi su povezani s nastankom raka (12). Za razliku od onkogena, čija je promjena dominantna, mutacije tumor-supresorskih gena uglavnom pokazuju recesivni učinak, tj. da bi se očitovao utjecaj tumor-supresorskog gena moraju mutirati oba alela za taj gen (1).

Među glavnim tumor-supresorima nalaze se geni za proteine Rb, p53. Gen RB u većini tumora je inaktiviran. Ima ulogu u: održavanju genomske stabilnosti, regulaciji apoptoze, staničnom metabolizmu, starenju, angiogenezi te suzbijanju invazije i metastaza (2). pRb je kromatinu slični protein koji sudjeluje u ograničavanju transkripcije gena uključenih u stanični ciklus, uglavnom regulacijom transkripcijskog faktora E2F. Vežanjem za E2F protein dolazi u interakciju s regulatorima kromatina. Potiskivanjem transkripcijskih meta E2F pRb sprječava ekspresiju gena potrebnih za proliferaciju. Njegova ekspresija pod kontrolom je ciklin ovisnih kinaza. Kada stanica uđe u stanični ciklus kinaze fosforiliraju pRb, što dovodi do disrupcije E2F i nakupljanja aktivnog E2F koji vodi do transkripcije (Slika 6.). Aktivni pRb nađen je u stanicama tijekom G1 faze staničnog ciklusa i tijekom kontrolnih točaka staničnog ciklusa. Hiperproliferacija pRb tijekom prijelaza G1/S dovodi do inhibicije E2F transkripcijskog faktora što dovodi do nastavka staničnog ciklusa (13). Mnoga istraživanja pokazala su kako je pRb u mnogim tumorima reguliran zbog mutacije u RB1 koja povećava fosforilaciju pRb ili ekspresiju onkoproteina koji ciljaju pRb.



Slika 6. Prikaz mehanizma djelovanja Rb proteina. Vezani pRb sprječava aktivnost transkripcijskog faktora E2F. Djelovanjem kinaza, fosforilira se pRb i oslobađa se aktivni E2F. Preuzeto i prilagođeno iz (13).

Osim što potiskuje ekspresiju gena reguliranih preko E2F, pRb ima ulogu i u organizaciji kromosomskih domena i aktivaciji gena kao odgovor na signale apoptoze i diferencijacije. Gubitak RB1 utječe na poremećaj staničnog ciklusa i na kontrolnu točku G1/S. Mutacija povezana s RB1 uključuje pojačanu regulaciju gena potrebnih za proliferaciju stanica. Posljedice gubitka gena RB, na funkcioniranje staničnog ciklusa i funkcije stanica, velike su (Slika 7) (13).



Slika 7. Prikaz gubitka djelovanja Rb proteina na funkcije stanica. Preuzeto i prilagođeno iz (13).

Gen TP53 sudjeluje u procesima replikacije DNA i transkripcije (2). Također, ima sposobnost zaustavljanja staničnog ciklusa, popravak DNA, ulogu u starenju te apoptozi. Smatra se najčešće mutiranim genom povezanim s rakom, mutiran je u preko 50% sekvenciranih tumora. Za razliku od većine gena za supresiju tumora, poput RB, APC ili BRCA1, koji se obično inaktiviraju tijekom napredovanja raka delecijama ili skraćivanjem mutacija, za gen TP53 u ljudskim tumorima često su utvrđene «missense» mutacije, u kojima je jedan nukleotid zamijenjen

drugim. Mutacija u genu koji ga kodira pokazala se prisutnom u gotovo svakoj vrsti tumora, od 10% učestalosti prisutne u hepatopoetskim malignim tumorima do stope od približno 100% kod visokog stupnja karcinoma jajnika (14).

Protein koji eksprimira ovaj gen je p53 i osjetljiv je na različite čimbenike te je ključan u odgovoru na stres (2). On funkcionira kao transkripcijski faktor koji inducira ili inhibira ekspresiju gena specifičnim vezanjem za p53-vezujuće domene (12). Njegova funkcija je detektiranje: genotoksičnog stresa, prekomjerne signalizacije, nedostatka hranjivih tvari i hipoksije. Sudjeluje i u metaboličkom ponovnom povezivanju, regulaciji procesa autofagije i redoks homeostazi. U normalnim stanicama prisutan je u inaktivnom obliku. No, tijekom staničnog ciklusa, ako se pojavi oštećenje DNA prije ulaska stanice u S fazu, potiče se transkripcijska aktivnost p53, aktivira se, nakuplja u stanici i uključuje u mehanizme popravka (2). Naime, p53 tada zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi tako da potiče transkripciju p21. Aktivacija p21 inhibira ciklin-ovisne kinaze i tako onemogućuje daljnje napredovanje ciklusa (12). Međutim, ako se oštećenje ne može popraviti, uključuje se u aktiviranje stanične smrti ili stanje terminalne dediferencijacije (2).

Smatra se da se mutacije TP53 mogu dogoditi u bilo kojoj fazi staničnog ciklusa te njegovo djelovanje može biti različito s obzirom na fazu u kojoj je mutacija nastala. Istraživanje na stanicama kolorektalnog karcinoma primjerice, pokazalo je kako do inaktivacije TP53 dolazi, najčešće, tijekom kasnije faze razvoja tumora. Istraživanje na raku pankreasa, gdje se promatrao normalni duktalni epitel, preko lezija sve do invazivnog duktalnog adenokarcinoma, također je pokazao inaktivaciju TP53 u kasnijoj fazi razvoja bolesti. Štoviše, ovakvi dokazi mogu se pronaći i u hepatocelularnom karcinomu, karcinomu prostate i raku krvi. Suprotno tome, mnoga istraživanja ukazuju na pojavu inaktivacije tijekom ranije faze razvoja npr. u duktalnom karcinomu in situ, premalignoj leziji dojke te karcinomu jetra. No, ovakvi podaci, smatraju se dvosmislenima jer variraju obzirom na metode, različite parametre i druge faktore (14). Različiti su faktori koji utječu na mutacije u TP53, primjerice kontaminacija iz hrane, osobito karcinogeni mikotoksini poput aflatoksina B1 koji je povezan s hepatokarcinomom, te netumorskim jetra s naglaskom da takva mutacija može dovesti do maligne transformacije. Drugi faktor je konzumacija cigareta, tj. duhan, koji se pokazao kao glavni mutagen u razvoju karcinoma pluća. Prisustvo mutacija u TP53 vidljivo se razlikuje kod pušača i nepušača, u povećanoj transverziji G (gvanin) u T (timin) kod pušača. Izloženost sunčevoj svjetlosti i UV

zračenju također je uključena u genetske promjene TP53 u koži, što dovodi do razvoja karcinoma. Otprilike 50% karcinoma kože pokazuje mutacije TP53 koje karakteriziraju specifični prijelazi C (citozin) u T i CC u TT, što je znak UVB-inducirane mutageneze (14). Prema tome, komponente ključne za razvoj raka možemo označiti «permisivnim za rast» kada su aktivirane pomoću aktivnih onkogenih (prigušivači) i «obuzdavajućim za rast» kada su inaktivirani tumor-supresorski geni (oštećene kočnice). No, u kliničkoj stvarnosti funkcija i ishodi značajno se razlikuju i ovise o karakteristikama i vrsti tumora, odnosno različitim fazama tumorigeneze (2).

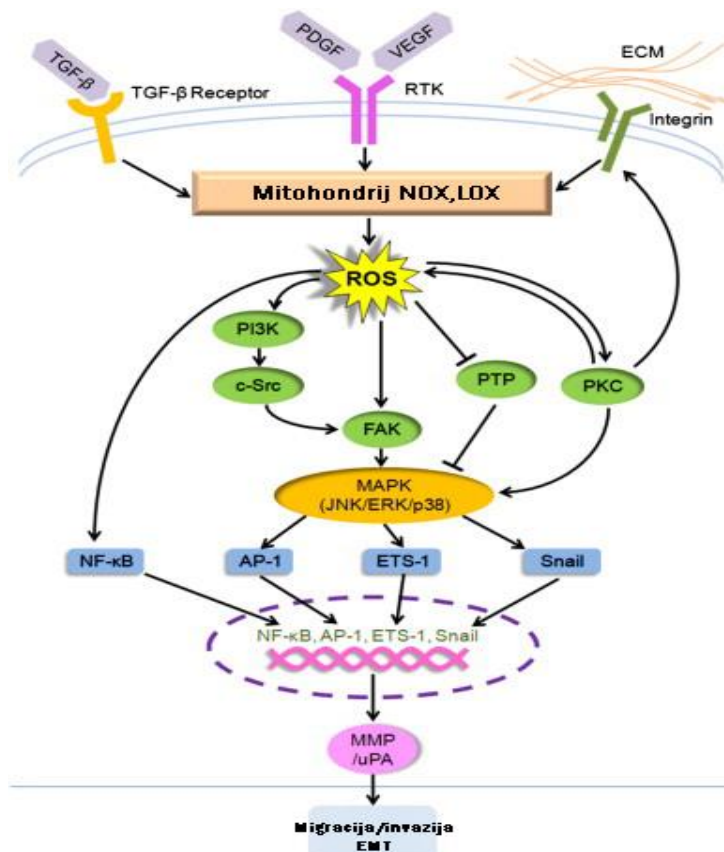
Maligna transformacija stanica

Tijekom životnog ciklusa stanice su izložene različitim stresnim događajima pri čemu se prilagođavaju, kontinuirano, novonastalim uvjetima. Ukoliko, međutim, stresni čimbenici prevladaju, mogućnost adaptacije i mehanizmi uklanjanja oštećenja se narušavaju, npr. oštećenja DNA ili drugih biomolekula, te dolazi do patoloških promjena. Osobito tako, kod maligne transformacije, mehanizmi očuvanja organizma od stresnih čimbenika promijenjeni su te omogućavaju stanicama raka lakše preživljavanje. Najčešće pri tome dolazi do deregulacije popravka DNA, mehanizma apoptoze i autofagije, starenja i metaboličkog statusa (2).

Maligno transformirana stanica tada može razviti sposobnost stvaranja vlastite vaskulature kao i metastaziranja u okolna tkiva i organe. Postoji nekoliko različitih mehanizama tumorske vaskularizacije kao što su: angiogeneza, vaskularna koopcija, intususpektivna angiogeneza te vaskularna mimikrija. Angiogeneza predstavlja proces stvaranja nove vaskulature iz već postojećih žila (2) te ima važnu ulogu i u rastu i metastaziranju tumora. Kada stanice tumora dosegnu kritičnu veličinu, 2-3 mm³, tumorskim stanicama, koje se nalaze na udaljenosti od krvnih žila, nedostaju potrebni nutrijenti i kisik. Takvo okruženje trebalo bi odvesti stanice u smrt uključivanjem apoptoze ili nekroze. No, stanice tumora mogu prevladati inhibiciju rasta aktiviranjem procesa stvaranja novih žila koje su im potrebne za uspješan rast i metastaziranje. Takva novonastala vaskulatura tumorskim stanicama pruža put kojim one mogu doći do udaljenih organa i metastazirati (15) te je kod malignih oboljenja konstantno aktivirana (16). Angiogeneza je regulirana proangiogenim faktorima, od kojih je VEGF-a najznačajniji regulator fiziološke i patološke angiogeneze (16) i inhibitorima angiogeneze kao, primjerice, trombospondin-1 (TSP1), endostatin, angiostatin. Tijekom progresije tumora, kada se naruši ravnoteža između pro- i anti- angiogenih faktora u korist proangiogenih, dolazi do angiogenog

prebacivanja (15). Glavnim pokretačem angiogeneze smatra se hipoksija gdje je ključni posrednik signalizacijskog puta kisika faktor induciran hipoksijom (engl. Hypoxia-inducible factor, HIF) (16). Stoga nije čudno što su razine HIF faktora iznimno visoke u većini malignih oboljenja te visoke razine karakteriziraju lošu kliničku prognozu bolesti (2). Kao odgovor na hipoksiju dolazi do stvaranja ROS, što rezultira stvaranjem kapilarnih cijevi. Dosadašnja saznanja ukazuju kako ROS ima veliku ulogu u angiogenezi i mitogenezi tumorskih stanica (17). Vaskularna koopcija predstavlja proces u kojem tumorske stanice rastu uz postojeće krvne žile (2). Brži je i efikasniji proces bez velikog utroška energije (18) te se pokazalo kako koopcijske stanice imaju rezistenciju na antiangiogenetsku terapiju, što je bitna spoznaja za razvitak terapije neovisne o angiogenezi. Vaskulogena mimikrija predstavlja formiranje mikrovaskularnih kanala agresivnog tumora poput melanoma, hepatocelularnog karcinoma, karcinoma dojke i jajnika, gdje tumorske stanice tvore vaskularne kanale (19).

Razvojem vlastite vaskulature stanice raka rastu i mogu dovest do metastaziranja. Metastatska bolest odgovorna je za 90% smrti vezane za rak. Predstavlja proces kojim transformirana stanica prolazi kako bi došla na udaljeno mjesto. Proces se sastoji od nekoliko koraka: invazija, intravazacija, cirkulacija, ekstravazacija, stvaranje premetastatske niše, mikrometastaze te koloniziranje na udaljeno mjesto (2). Netransformiranim stanicama za mitotsko dijeljenje potrebna je povezanost s izvanstaničnim matriksom (ECM) preko integrina (20). Međutim, kad dođe do gubitka povezanosti može doći do aktivacije jednog tipa apoptoze, anoikis (21). Kod tumorskih stanica situacija je drugačija. One imaju sposobnost proliferacije neovisno o vezanju za ECM i mogućnost migracije bez uključivanja anoikisa. Takva rezistencija na smrt pripisuje se unutarnoj signalizaciji ROS jer se smatra da djeluje kao autokrino/adhezivno signaliziranje, što je kod zdravih stanica posredovano faktorima rasta i integrinom (20). Uloga ROS u pokretanju signalnih putova za migraciju stanica i invazija dobro je utvrđena. Jedan od mehanizama pomoću kojih ROS posreduje u aktivaciji tih putova je stimulacija faktora rasta receptorskog tirozina kinaze (RTK) (Slika 19.) (22).



Slika 19. Prikaz djelovanja ROS-a na signalizacijski put invazije i metastaziranja tumorskih stanica. Članovi porodice proteina kinaze aktivirane mitogenom (MAPK), uključujući izvanstaničnu kinazu reguliranu signalom (ERK), c-jun NH-2 terminalna kinaza (JNK) i p-38 MAPK aktiviraju se tijekom migracije stanica. Do aktivacije MAPK može doći pomoću ROS, proizvedenog putem vezanja integrina i izvanstaničnog matriksa (ECM) te putem faktora rasta i liganda (transformirajući faktor rasta b TGF-b i TGF-b-receptor). No, još jedan od mehanizama pomoću kojih ROS posreduje u aktivaciji angiogeneze je putem stimulacije faktora rasta receptorskog tirozina kinaze (RTK). ROS se generira kao rezultat stimulacije receptora faktora rasta signala za indukciju staničnih promjena nužnih za migraciju. Važni signalni ciljevi ROS tijekom migracije stanica uključuju aktivatore RTK-a kao što je protein kinaza C (PKC), kao i negativni regulatori RTK-a kao što su protein tirozin fosfataze (PTP). Oksidacije PKC-a može olakšati RTK signalizaciju aktiviranjem signalne kaskade MAPK koja dovodi do migracije tumorskih stanica. Također, PI3K-cSrc-FAK kaskadom dolazi do aktivacije MAPK. Nizvodna kaskada uključuje aktivaciju transkripcijskih faktora kao što su nuklearni faktor kappa B (NF-κB), protein aktivator-1 (AP-1) i v-ets eritroblastoz virus E26 onkogen homolog 1 (Ets-1). Ti faktori aktiviraju matriksmetaloproteinaze (MMP) i serinske proteaze urokinaza uPA koje doprinose invaziji tumorskih stanica, epitelno mezenhimalnoj tranziciji (engl. Epithelial-mesenchymal transition, EMT) i angiogenezi. Preuzeto i prilagođeno iz (22).

Nedavna saznanja o kompleksnosti nastanka raka donijela su zaključke kako narušena redoks-ravnoteža predstavlja jedan od bitnijih uzročnika razvoja raka, njegove progresije i metastaziranja u okolno tkivo. Takva neravnoteža u redoks-statusu izazvana je visokom prisutnosti slobodnih radikala, najvećim dijelom ROS (23). Slobodni radikali obuhvaćaju reaktivne kisikove (ROS) i dušikove spojeve (RNS). Neparan broj elektrona slobodnog radikala čini ih nestabilnim, kratkotrajnim i vrlo reaktivnim. Zbog svoje visoke reaktivnosti mogu preuzeti, od drugih molekula, elektron kako bi postali stabilni čineći tu molekulu novim slobodnim radikalom. Tako se pokreće kaskada doniranja elektrona i nastajanja slobodnog radikala koja vodi do oštećenja same stanice. Slobodni radikali mogu se podijeliti na radikale

i neradikale. Radikali su samostalne molekule koje imaju najmanje jedan nesporeni elektron u zadnjoj ljusci oko jezgre, a u njih ubrajamo: hidroksil (HO^\cdot), superoksid (O_2^\cdot), alkoksil radikal (RO^\cdot), peroksil radikal (ROO^\cdot). Neradikali nisu slobodni radikalni, ali lako mogu dovesti do reakcija slobodnih radikala, a u tu skupinu spadaju: molekule hidrogen peroksid (H_2O_2), singlet kisik ($^1\text{O}_2$) i ozon (O_3) (24). H_2O_2 manje je reaktivan od većine ROS molekula, ali sposoban je doći u bilo koji dio stanične organizacije prije djelovanja peroksiredoksina i glutathion peroksidaze koji ga pretvaraju u molekulu vode i kisika. Štoviše, on funkcionira kao sekundarni glasnik određenih redoks signalnih putova koji podrazumijevaju transdukciju izvanstaničnih signala i kontrolu u ekspresiji gena (25).

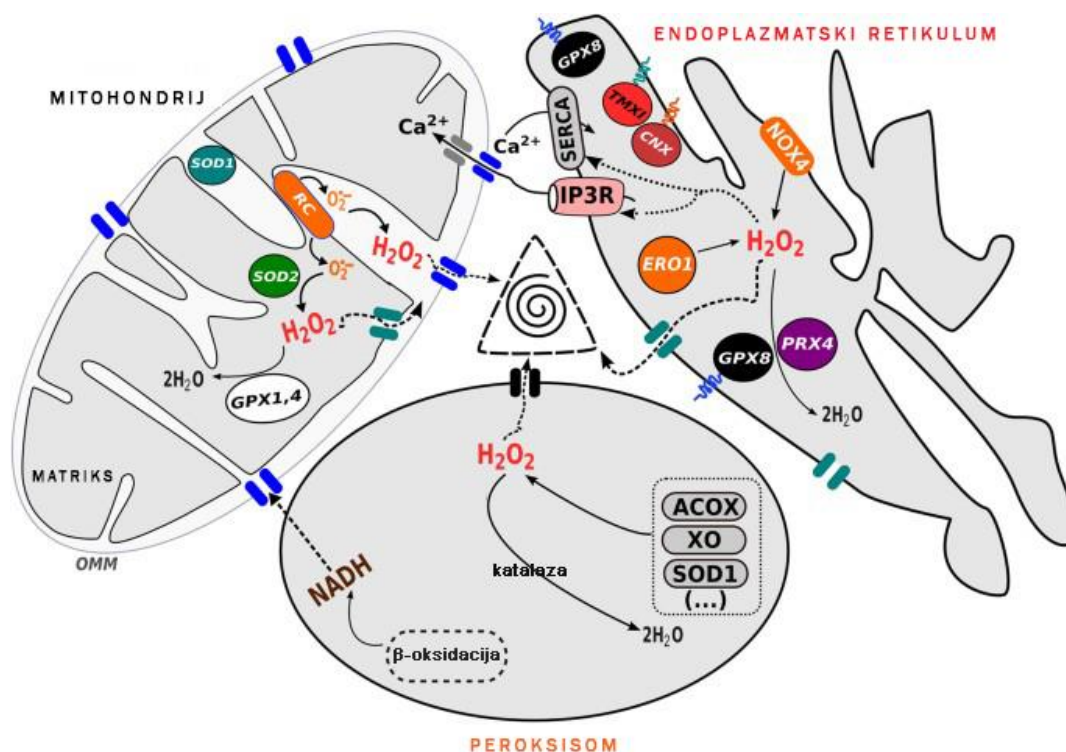
1.1.2. Reaktivni kisikovi spojevi

Vanjski i unutarnji put stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva

Dva su puta stvaranja ROS; unutarnji i vanjski. Unutarnji put podrazumijeva stvaranje iz mitohondrija, peroksisoma i endoplazmatskog retikuluma. Vanjski put podrazumijeva vanjske utjecaje koji imaju prooksidativnu karakteristiku, kao primjerice: radijacija, alkohol, cigarete, droga itd. (23).

Mitohondrij se smatra glavnim izvorom ROS jer se procjenjuje da oko 2% kisika koji koristi pretvara u superoksid (26). To bi se na prvi pogled moglo činiti vrlo niskim postotkom no, ako se uzme u obzir da je prosječna brzina iskorištavanja kisika u svakoj pojedinoj stanici ljudskog tijela $\sim 2,5 \times 10^{-18}$ mol/s (to znači $2,2 \times 10^{10}$ molekula svaki dan), količina ROS koji se generira unutarstanično dnevno doseže ~ 1 milijardu molekula. Množenjem ove vrijednosti s brojem stanica u ljudskom tijelu (približno 50 bilijuna) dobivamo ideju o intenzitetu ROS kojem smo fiziološki izloženi (27). Oksidativna fosforilacija je proces koji se odvija u unutarnjoj membrani mitohondrija i sastoji se od četiri kompleksa prijenosa elektrona i prijenosa protona adenozin-trifosfat (ATP) sinteze. Elektroni nastali oksidacijom nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) i flavin adenin dinukleotida (FADH_2), prolaze kroz kompleks reakcija koji rezultira izbacivanjem protona iz mitohondrija (25). Produkcija H_2O_2 nastaje u matriksu mitohondrija djelovanjem superoksid dizmutaze 1 (SOD1) i superoksid dizmutaze 2 (SOD2).

Peroksisomi imaju dvojaku ulogu u redoks metabolizmu. Razgradnjom H_2O_2 , pomoću katalaze, sudjeluju u uklanjanju ROS, a procesima koji uključuju superoksid dizmutazu 1 (SOD1), ksantin oksidazu (XO) te β -oksidacijom masnih kiselina i aktivnošću flavin oksidaze sudjeluje u proizvodnji ROS (28). Endoplazmatski retikulum (ER) predstavlja okruženje koje pogoduje povećanju ROS oksidacijom proteina (26), primjerice aktivnošću ER oksidoreduktaze (ER1alfa i ER1beta) i NADH oksidaze (NOX) (28). Iako ovi unutarstanični organeli posjeduju obrambene mehanizme protiv ROS, smatra se kako molekule ROS brzo prolaze kroz membrane pomoću akvaporina i drugih specifičnih kanala. Takvo istjecanje ROS dovodi do njegovog nakupljanja oko organela i utječe na njihovu homeostazu. Na primjer, inhibicija peroksisomske katalaze, istodobno s povećanjem ROS, rezultira mitohondrijskom redoks neravnotežom (Slika 8) (28).



Slika 8. Prikaz unutarstaničnog izvora oksidativnih molekula, njihovo istjecanje i nakupljanje. U MITOHONDRIJU: RC-mitohondrijski respiratorni lanac proizvodi superoksid O_2^- , kojeg SOD1, SOD2 (superoksid dizmutaza 1,2) dizmutiraju u H_2O_2 . GPX1,4 (glutation peroksidaza 1,4) reducira H_2O_2 u vodu H_2O . U PEROKSISOMU: β -oksidacijom masnih kiselina stvara se NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) koji specifičnim kanalima odlazi u mitohondrij. Djelovanjem ACOX (acil-koA oksidaza), XO (ksantin oksidaza), SOD1 stvara se H_2O_2 , a djelovanjem katalaze on se pretvara u vodu H_2O . ENDOPLAZMATSKI RETIKULUM: NOX4 (NADH oksidaza 4) i ERO1 (endoplazmatska oksidoredukcija 1) stvaraju H_2O_2 , GPX8 (glutation peroksidaza 8), PRX4 (peroksiredoksin 4), CNX (kalneksin), TMX1 (transmembranski tireoredoksin-povezan protein). SERCA-sarkoendoplazmatski retikulum, IP3R-inositol trifosfat receptor predstavljaju predstavljaaju kanale koji služe za transport kalcija. Preuzeto i prilagođeno iz (28).

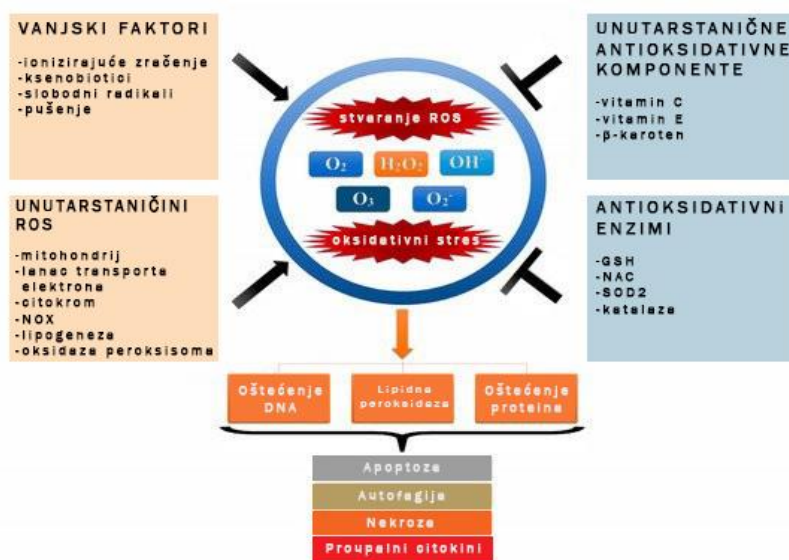
Enzimsko i ne-enzimsko stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva

Kontinuirano stvaranje ROS možemo podijeliti na: enzimске i neenzimске reakcije. Reakcije katalizirane enzimima koji generiraju ROS uključuju enzime NADPH oksidazu (NOX), ksantin oksidazu (XO), nevezani endotelni dušik oksid sintazu (eNOS), arahidonsku kiselinu te metaboličke enzime kao što su citokrom P450, lipoksigenaza i ciklooksigenaza (26) kao i kroz Fentonsku reakciju kataliziranja željeza (25). Neenzimatski izvor ROS predstavlja mitohondrijski lanac disanja (26) kojim se stvara većina slobodnih radikala uključujući i superoksid (O_2^-) koji se stvara iz dva bitna dijela mitohondrija, kompleks I i kompleks II. Takav način ne potrebuje enzime te je brzina metabolizma veća i proizvodnja ROS brža (24).

Ravnoteža antioksidansa i reaktivnih kisikovih spojeva

Kako bi se osiguralo održavanje ROS signalnih procesa i izbjegavanje oksidativnog oštećenja potrebna je ravnoteža između antioksidansa i ROS. U tome sudjeluju različiti aktivatori i sakupljači ROS. U aktivatore se ubrajaju hipoksija, metabolički defekt, stres ER, onkogeni, a u sakupljače faktor 2 povezan s eritroidom 2 s nuklearnim faktorom (NRF2), glutation (GSH), NADPH, tumorsupresori BRCA1, p53, PTEN, ATM i antioksidativne komponente iz hrane (26). Glavnu ulogu u suzbijanju oksidativnog stresa imaju GSH i tioredoksin (TXN) te NADPH koji stanice iskorištavaju kako bi se regenerirale nakon redukcije ROS, tj. NADPH ih održava u reduciranom stanju. Bitnu ulogu u regulaciji antioksidativnih molekula ima transkripcijski faktor NRF2. On kontrolira nekoliko različitih antioksidativnih putova: (1) stvaranje i regeneraciju glutationa (GSH), (2) utilizaciju GSH-a, (3) stvaranje, regeneraciju i utilizaciju tioredoksina (TXN) i (4) stvaranje NADPH. FOXO i p53 preveniraju oksidativni stres tako što induciraju ekspresiju antioksidativnih gena (29).

Prekomjerno nakupljanje ROS molekula, što zbog vanjskih što zbog unutarnjih faktora, popraćeno je ubrzanim metabolizmom, nefiziološkim radom mitohondrija, povećanom oksidacijom lipida i iona metala (Cu^{2+}), smanjenjem razine i/ili aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, GSH, peroksidaza (GPX), glutation reduktaza (GR) i katalaze) (30). Takva situacija može dovesti do oksidativnog stresa i oštećenja DNA, lipida, proteina, što će uzrokovati aktivaciju apoptoze, autofagije, nekroze i stvaranja proupalnih citokina (Slika 9). Takav razvoj situacije karakterističan je za karcinogenezu, kao i za kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (23).



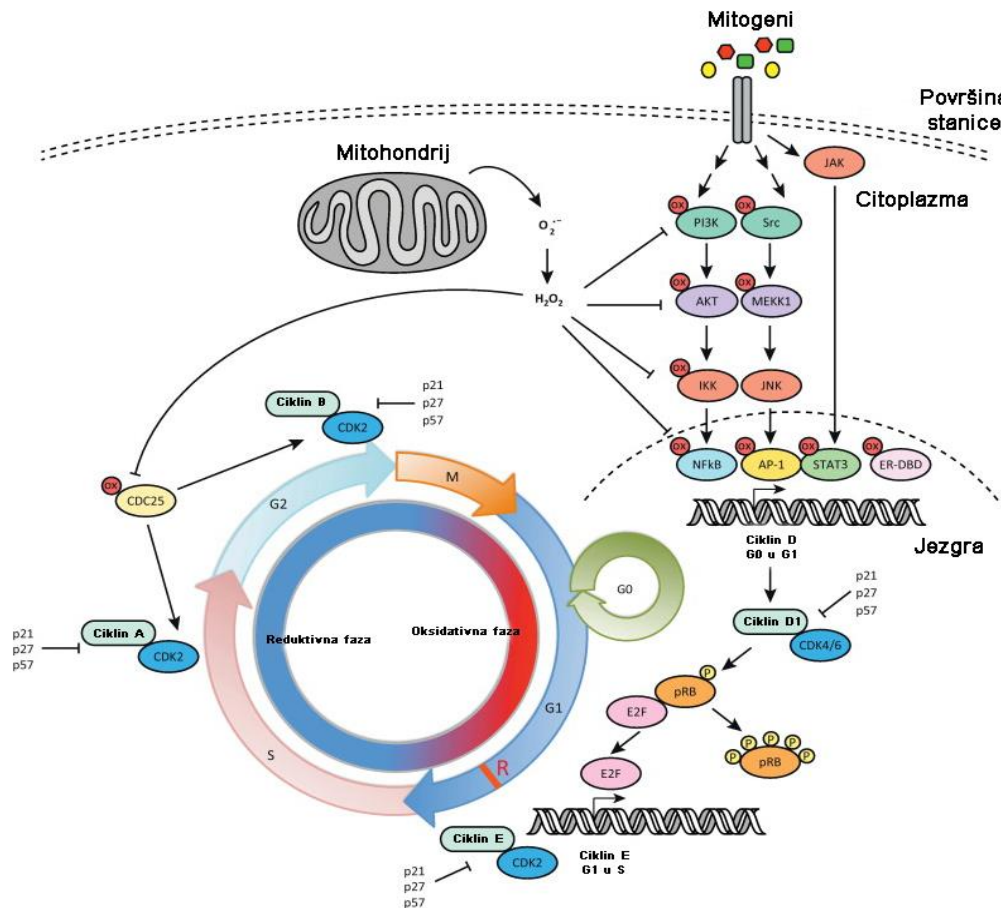
SLIKA 9. Unutarstanični i izvanstanični faktori dovode do nakupljanja molekula ROS što izaziva oksidativni stres unutar stanice, oštećenja molekula i aktivacije mehanizama smrti i upalnih citokina. Preuzeto i prilagođeno iz (23).

Dvojaka uloga reaktivnih kisikovih spojeva

Proliferativni signali prolaze kroz stanicu signalnim putovima kako bi aktivirali stanični ciklus. Signali stresa unutar ili izvan stanice suprotstavljaju se proliferaciji. Stoga se stanice oslanjaju na proliferativne signale, kao i kontrolne točke za nadzor, kako bi regulirale ulazak u stanični ciklus. Signalizacija stresa, posebno kao odgovor na oštećenje DNA i infekciju, od vitalnog je značaja za preživljavanje kako bi se osiguralo da stanice pokrenu odgovarajuće obrambene mehanizme poput mehanizama popravka (31).

Iako može djelovati štetno na stanice, ROS su važni u staničnoj signalizaciji i homeostazi (Slika 10) (3). U stanicama sisavaca poznato je da je interakcija faktora rasta i receptora popraćena stvaranjem ROS koji, pri niskim do umjerenim koncentracijama, djeluju kao signalne molekule koje održavaju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i aktiviraju odgovore na stres kako bi preživjela stanica. Primjerice, H_2O_2 može služiti kao molekula za proliferaciju, diferencijaciju i migraciju stanica. S druge strane, ROS može inducirati proupalne citokine i aktivirati put nuklearnog faktora-kB (NF-kB) (26). Aktiviranje tog kaskadnog signalnog puta može dovesti do stvaranja upalnog okruženja, blokiranja apoptoze, tumorske proliferacije, angiogeneze i metastaziranja (23).

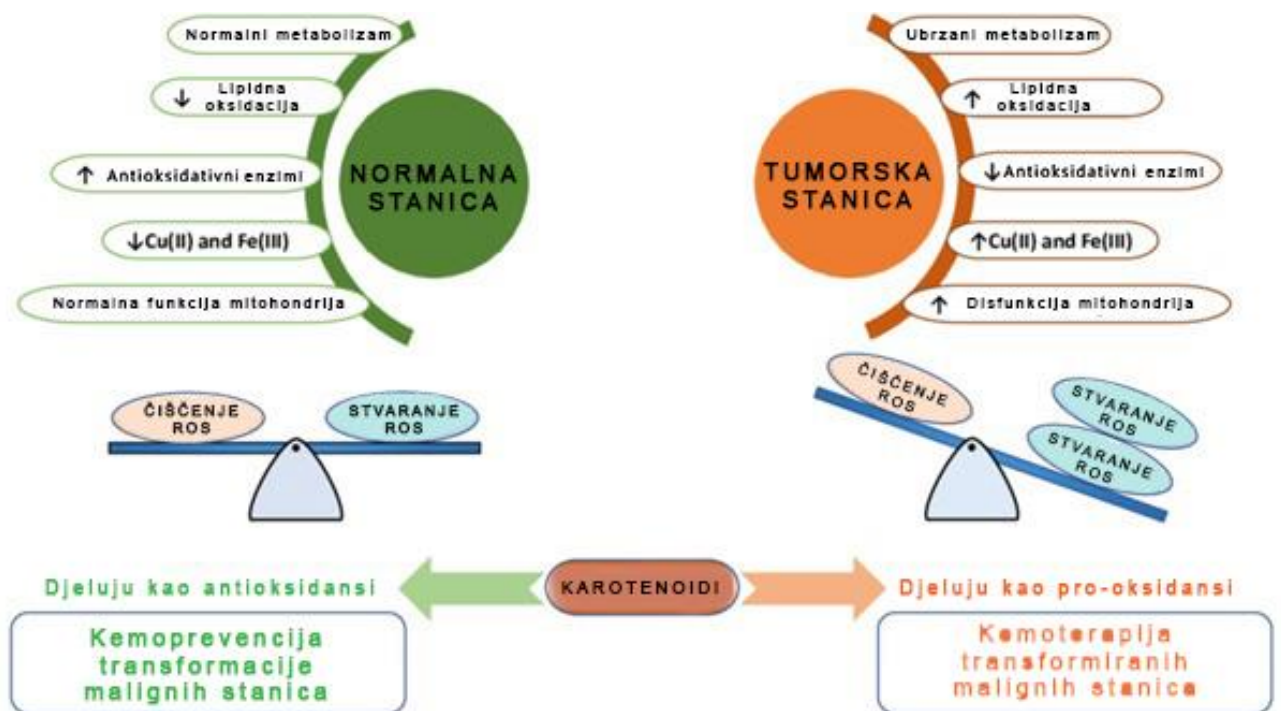
Pri višim razinama ROS stanična dioba staje, a nakon duljeg vremena zastoja stanice umiru procesom apoptoze. Gubitak redoks kontrole u diobi stanica može rezultirati ponovnim ulaskom stanica u staničnu diobu, što dovodi do nakupljanja oštećenja dovodeći do maligne transformacije, poremećenog razvoja fetusa i neurodegenerativnih poremećaja. Stoga je dioba stanica visoko regulirana redoks okruženjem (31).



Slika 10. Prikaz utjecaja ROS na pokretanje staničnog ciklusa. ROS, kao primjerice superoksid O_2^- i H_2O_2 , nastaju u mitohondriju procesom oksidativne fosforilacije. Regulatori staničnog ciklusa: (1) PI3K (protein kinaza B)-AKT (glikogen-sintaza kinaza-3)-IKK (IkB kinaza)-NF-kB (nuklearnog faktora-kB), (2) Src (protoonkogen c-Src)-MEK1 (mitogen-aktivirana protein kinaza kinaza 1)-JNK (c-Jun N-terminalna kinaza)-AP-1 (aktivacijski protein 1), (3) JAK (Janus tirozin kinaza)-STAT3 (transduktor signala i aktivator transkripcije 3), (4) ER-DBD (estrogeni receptor DNA-vezujuća domena) označeni su sa cisteinskim ostatkom (crveni krug). Smatra se da mitogena signalizacija inducira te kaskadne puteve i dovodi do aktiviranja ekspresije ciklina D. Ciklin D zajedno sa ciklin ovisnom kinazom 4 ili 6 (CDK4/6) fosforiliraju protein retinoblastom (pRB) kako bi se odvojio od E2F i omogućuje stanici ulazak iz G0 u G1 fazu. Kad stanica prođe restriktivnu kontrolnu točku R, ona će završiti proces diobe do kraja. Aktivirani E2F tada signalizira transkripciju ciklina E koji omogućuje prijelaz stanice iz G1 u S fazu. Prijelaz iz S u G2 i G2 u M fazu inducira stvaranje ciklina A i ciklina B. Fafataza Cdc25 aktivira ciklin A, B i ciklin ovisnu kinazu 1 (CDK1) za napredovanje ciklusa. Inhibitori kinaza su p21, p27 i p57 koji odvajaju komplekse kinaza i ciklina ovisnih o kinazama te tako inhibiraju njihovo djelovanje. Stanični ciklus usklađen je s metaboličkim. G1 faza usklađena je sa oksidativnom fazom (crveno), dok se S i M faza javljaju tijekom reduktivne faze metabolizma (plavo). Preuzeto i prilagođeno iz (31).

Visoke razine ROS mogu također održavati proliferaciju tumorskih stanica. Povećavanje oksidativnog stresa pomoću kemoterapijskih lijekova (doksorubicin, etopozid, cisplatin) i fitokemikalija može djelovati citotoksično jer povećava razinu ROS koja je za stanicu

smrtonosna. Kao primjer može se uzeti skupina prirodnih spojeva, zvanih karetnoidi, koji mogu djelovati pro- i anti- oksidativno. U zdravim stanicama mogu prevenirati nastajanje tumora svojim antioksidativnim svojstvima potičući normalan metabolizam stanica, smanjenje lipidne oksidacije, povećanje antioksidativnog učinka, smanjenje oksidacije metala, kao i normalnu mitohondrijsku funkciju. Za razliku od zdravih stanica, u tumorskim stanicama može poslužiti kao faktor koji će djelovati suprotno od navedenog i na taj način izazvat citotoksičnu smrt stanica raka (Slika 11) (30).



Slika 11. Prikaz djelovanja bioaktivnih molekula na zdrave stanice kao antioksidansi čime se prevenira razvoj tumorske transformacije, te djelovanje na tumorske stanice kao pro-oksidansi čime djeluju kao kemoterapijska molekula izazivajući toksičnost stanica tumora. Preuzeto i prilagođeno iz (30).

Iz svega navedenog može se zaključiti kako visoke razine ROS imaju veliki utjecaj na metabolizam tumora. Povećana proizvodnja ROS Warburgovim efektom, odnosno aerobnom glikolizom, koja je popraćena oksidativnom fosforilacijom u mitohondriju, povećanjem receptora i onkogenske aktivnosti te stimulacijom signalnih putova posredovanih faktorima rasta ili oksidacijom enzima značajno utječu na nestabilnost genoma (25). Štoviše, velike količine ROS utječu na stanično preživljavanje. Najčešće, pri tome, dolazi do deregulacije popravka DNA, mehanizma apoptoze i autofagije, starenja i metaboličkog statusa (2).

1.1.3. Popravak DNA

Oštećenja molekula DNA mogu biti uzrokovana vanjskim ili unutarnjim faktorima, među kojima su i slobodni radikali. ROS i RNS štetni su i za integritet mitohondrijske DNA (mtDNA) te remete transkripciju mtDNA, odnosno njome kodirane proteine i RNA koje pripadaju kompleksima mitohondrijskog respiratornog lanca. Tada se uspostavlja zatvoreni krug u kojem mitohondriji s oksidiranom mtDNA postaju nefunkcionalni i proizvode visoke razine ROS, što dovodi do daljnjeg oštećenja mitohondrija (27). Akumulacija ROS inducira lezije mitohondrijske DNA, pucanje niti, razgradnju mitohondrijske DNA i poremećaj elektronskog transporta (32). Ovo stanje u konačnici može rezultirati ozbiljnim oštećenjem nuklearne DNA i staničnom smrću. Mitohondrijska DNA podložnija je i osjetljivija djelovanju ROS od stanične jer nije zaštićena histonima i nema enzimski sustav popravka izrezivanjem nukleotida NER (engl. nucleotide excision repair) (27).

ROS mogu utjecati i na epigenetske modulatore kao što su histonske deacetilaze ili DNA metiltransferaze čime se utječe na transkripciju određenih gena (25). Hidroksid (OH^\cdot) može izravno napasti DNA molekulu kroz oksidativno oštećenje, kao primjerice: oksidirane baze, abazična mjesta, adukti DNA-DNA unutar niti, jednostruki lom SSB (engl. single-strand break), dvolančani lom DSB (engl. double-strand break) i DNA-proteinske veze. Među nukleobazama gvanin je najosjetljiviji na ROS zbog niskog redoks potencijala, a glavni produkti njegove oksidacije su 8-hidroksigvanin i 8-hidroksideoksigvanozin (8-OHG i 8-OHdG). Oba su visoko mutageni i kancerogeni jer se mogu podudarati i s citozinom i s adeninom, što dovodi do GC-AT-transverzija (27). Takvo izravno induciranje oštećenja DNA, oksidiranjem nukleinskih baza, smatra se jednim od najmutagenijih lezija (32). Istraživanja su pokazala kako je otprilike 1 na 10^5 gvanina oksidirano u normalnim stanicama, dok je u transformiranim taj broj puno veći, čak 35-50%. 8-okso-gvanin akumulira se u telomerama, inhibira telomerase i smanjuje vezanje telomernih proteina, što vodi do telomernog oštećenja, skraćivanja i poremećaja u funkciji telomernih krajeva kromosoma (25). Oksidirane baze obično se prepoznaju i popravljaju putem popravka ekscizijom baza BER (engl. base excision repair), ali kada se istovremeno pojave na suprotnim zavojnicama BER može uzrokovati dvostruko pucanje DNA. To je posebno opasna lezija koja može inducirati kromosomska preslagivanja ili greške u popravku DNA (32). No, istraživanja pokazuju kako ROS mogu inhibirati BER interferiranjem s proteinima uključenim u proces popravka, čime dolazi do nakupljanja karcinogenih mutacija i progresije tumora (33). Još jedan izvor oštećenja DNA i

stvaranja DSB, u stanicama raka, je onkogenska aktivacija mehanizama replikacijskog stresa. Proto-onkogen u tom procesu mutira i postaje onkogen koji uzrokuje hiperproliferaciju stanica raka. Onkogenska aktivnost popraćena je velikim stvaranjem ROS koja inducira replikacijski stres odnosno poremećenu sintezu DNA, gensku nestabilnost i nakupljanja mutacija (32). Štoviše, hipermetilacija DNA inducirana ROS također potiče tumorigenezu (25).

Oštećenja DNA prepoznaju se pomoću senzornih molekula koje se dijele na one koje prepoznaju slomljene krajeve dvostrukog DNA lanca te one koje prepoznaju zaustavljanje replikacije DNA (34). Jednom kad se pronađe oštećenje DNA stanica mora pretvoriti taj signal preko transduktora do odgovarajućeg efektora. U ljudskim stanicama aktivacija dviju kinaza bitna je za pravilan rad transdukcije oštećenja DNA: ATM (engl. Ataxia Mutirana Telangiectasia) i ATR (engl. ATM and Rad3 related). Ovisno o tome kada se detektira oštećenje DNA, ATM/ATR pokrenut će ciljne proteine kinazu Chk2 koja je aktivirana s ATM i Chk1 koja je aktivirana s ATR. Nakon aktivacije ove kinaze fosforiliraju brojne ciljne proteine koji prenose signal oštećenja DNA nizvodno. Zadnju fazu popravka čine efektorske molekule koje uglavnom sudjeluju u inhibiranju djelovanje ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu, kako bi se zaustavio stanični ciklus, započeo popravak DNA ili, ako je potrebno, aktivirala apoptoza. Primjerice, oštećenje u G1 fazi popraćeno aktivacijom p21, direktno inhibira CDK4 i CDK 6 i tako sprječava transkripciju proteina koji su potrebni za sintezu DNA molekule (35). U ovisnosti o oštećenju aktiviraju se mehanizmi popravka DNA (engl. DDR, DNA damage response) (32).

Gubitak ATM utvrđen je u mnogim vrstama tumora što negativno djeluje na funkciju mitohondrija, dovodi do povećanja oštećenih mitohondrija i to uzrokuje nakupljanja i povećanja ROS. Također, stanice bez ATM imaju povećane vrijednosti ROS zbog nedostatka aktivnosti NRF2 koja osigurava ekspresiju antioksidativnih proteina. ATM se može i direktno aktivirati putem ROS, primjerice putem H₂O₂, koji uzrokuje autofosforilaciju aktivaciju kaskadnog puta DDR. Stoga, kinaze koje sudjeluju u DDR inhibiraju ROS i tako štite genomski integritet (32). Istraživanja su pokazala kako se ATM i ATR signalni putovi mogu iskoristiti u terapijske svrhe. ROS inducirani asperlinom zaustavlja stanicu u G2/M, što je posredovano s ATM-Chk2. Slično tome, aktivacija Chk1, inducirana s ROS, dovodi do p53 neovisnog zaustavljanja stanica u G2/M u kolorektalnog karcinoma. Osim učinaka na aktivaciju proteina kontrolnih točaka ciklusa, ROS također zaustavljaju stanični ciklus izravnim djelovanjem na obitelj proteinskih fosfataza Cdc25 koje pospješuju napredovanje staničnog ciklusa

uklanjanjem inhibitora fosfata na ciklin ovisnim kinazama (CDK) (35). Histon H2AX bitna je molekula u DDR te se njegov nedostatak povezuje s genskom nestabilnosti. Povezanost H2AX i ROS je dvosmjerna. Kronični stres putem ROS uzrokuje razgradnju H2AX, što dovodi do smanjenja fosforiliranog gama-H2AX i tako povećava osjetljivost stanica trostruko negativnog raka dojke na terapiju platinom. Suprotno tome, akutni ROS stres povećava gama-H2AX i aktivaciju popravka DDR (32).

Iz svega navedenog, zaustavljanje staničnog ciklusa i popravak oštećenja ili, ako je potrebno, aktivacija apoptoze iznimno su bitni mehanizmi preživljavanja stanica.

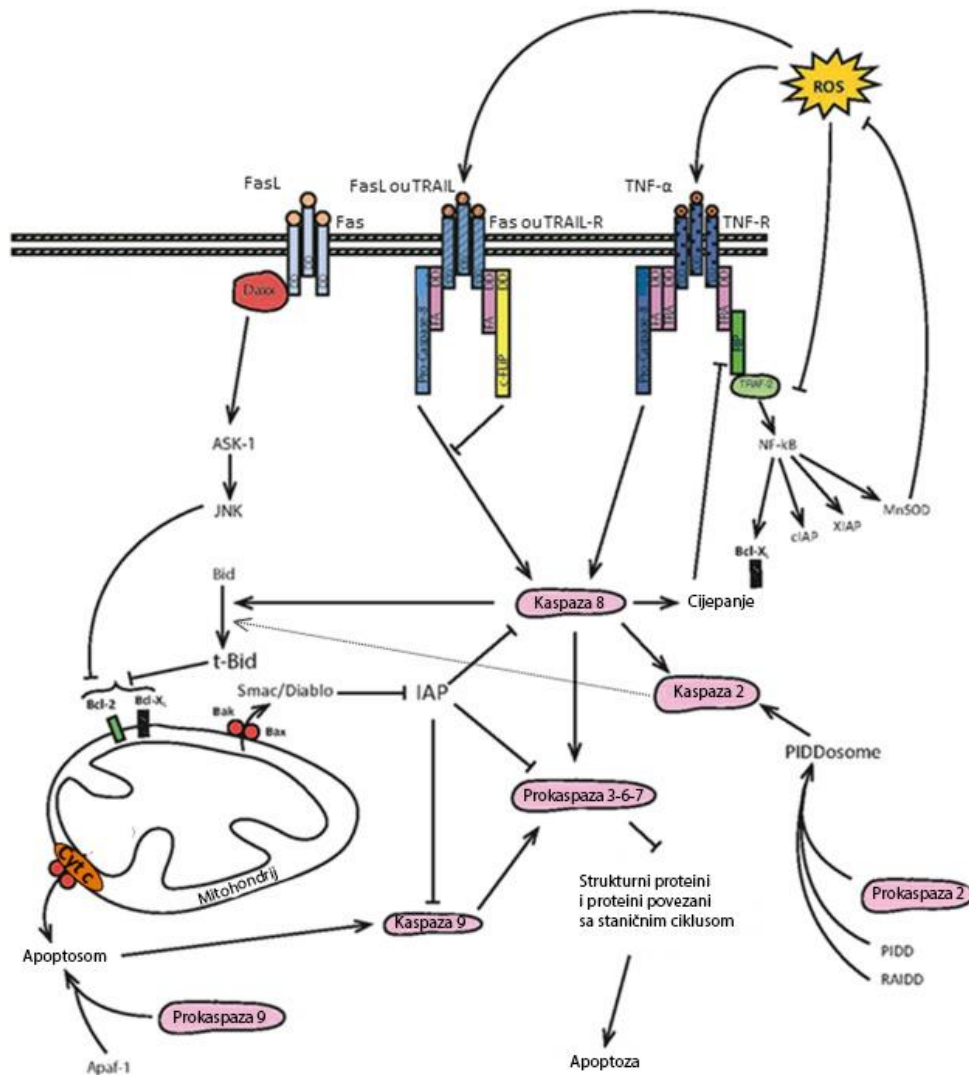
1.2. Apoptoza

Apoptoza je oblik stanične smrti nužan tijekom razvoja organizma i održavanja homeostaze zdravog tkiva. To je aktivan proces kojim se troši energija i aktiviraju geni potrebni za sintezu proteina. Stoga se još naziva i programirana stanična smrt (36). Nužan je u uklanjanju neželjenih, suvišnih ili oštećenih stanica kako bi se prevenirala karcinogeneza (37). Apoptoza se, naime, aktivira prilikom generiranja negativnih signala poput, primjerice, oštećenja DNA, nekontrolirane proliferacije i odvajanja stanice od matriksa, odnosno zbog izostanka ili slabljenja različitih pozitivnih signala uključenih u fiziološke procese (36). Većina DNA oštećenja uzrokovana je s ROS, što ima i pozitivne strane jer ROS može uzrokovati apoptozu, a to je bitan pristup u liječenju tumora (23).

Poremećaj apoptoze bitan je faktor povezan s razvojem različitih bolesti, npr. kroničnih upala, ateroskleroze, respiratornih problema, neurodegenerativnih bolesti i raka (37). Najčešći put aktivacije apoptoze posredovan je aktivacijom cistein-ovisnih aspartat-specifičnih proteaza, zvanih kaspaze. Proces se najčešće odvija unutar 60 minuta od aktivacije apoptoze (30). Proteolitička aktivna mjesta kaspaza cijepaju specifične proteinske supstrate koji se nalaze u jezgri, citosolu i citoskeletu. Ciljni proteini kaspaza različiti su strukturni proteini (aktin) te proteini uključeni u DNA popravak (PARP, engl. Poly (ADP-ribose) Polymerase) i u regulaciju staničnog ciklusa (p21) (37). Cijepanjem tih staničnih proteina dolazi do morfoloških i biokemijskih promjena, uslijed čega se stanice smežuraju, kondenzira se kromatin, cijepa se DNA, »pupaju« dijelovi stanične membrane i formiraju se apoptotska tjelešca koja fagocitiraju susjedne stanice, uz makrofage, čime se stanična smrt (36) završava apoptozom, nekrozom ili

upalom. Kaspaze koje djeluju u apoptozi mogu se podijeliti na inicijatore (2, 8, 9, 10), koji se rano uključuju u apoptozu i aktiviraju kaspaze izvršitelje (3, 6, 7). Različite promjene u aktivnosti djelovanja kaspaza mogu dovesti do razvoja raka (37).

Tri su puta aktivacije apoptoze, unutarnji, vanjski put i pomoću endoplazmatskog retikuluma. Unutarnji, mitohondrijski put, odvija se pomoću detekcije unutarnje minimalne stanične razine stresa koja je potrebna za pokretanje apoptoze (2). Mitohondrijski put aktivira se kao odgovor na različite stresove uključujući oštećenje mitohondrijske DNA, sniženih razina faktora rasta, visoke temperature, hipoksije, stresa endoplazmatskog retikuluma. Put je povezan s propusnosti unutarnje membrane mitohondrija koja je inače strogo nepropusna i održava elektrokemijski potencijal, ključan za odvijanje oksidativne fosforilacije i stvaranja enenergije (ATP-a). U stanju stresa, uzrokovanim s ROS, oštećenje mDNA uzrokovat će promjene u transkripciji proteina bitnih u respiratornom lancu, što dovodi do poremećaja oksidativne fosforilacije i povećanja razine ROS. To dovodi do propusnosti unutarnje membrane mitohondrija, poremećene ATP sinteze i protoka molekula, uključujući i protona, u matriks mitohondrija. Uslijed ovih procesa dolazi do još veće propusnosti vanjske membrane mitohondrija, koja je sama po sebi propusna (37). U slučajevima kada je oštećena DNA ključni aktivator unutarnjeg mehanizma apoptoze je p53 (36). On može pokrenuti apoptozu na dva načina: tako što će dovesti do povećanja razine reaktivnih spojeva kisika koji su snažni aktivatori oštećenja mitohondrija i apoptoze ili će dovesti do promjene mitohondrijskih proteina porodice B-stanica limfoma (Bcl-2) (Slika 12) (2).

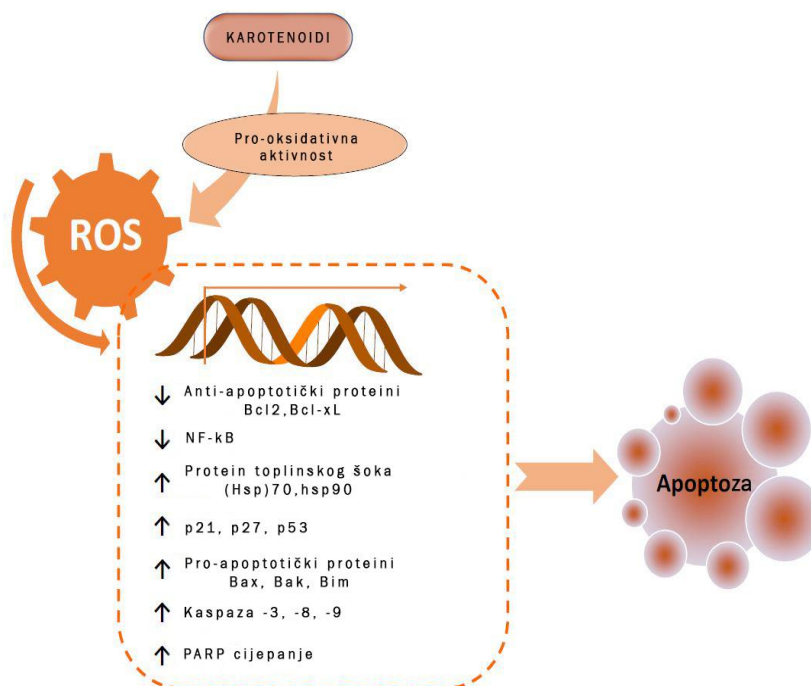


Slika 13. Aktivacija vanjskog puta apoptoze djelovanjem ROS na receptore stanične membrane. Vežanje specifičnih liganda (TNF-alfa, TRAIL, FasL) na transmembranske proteine superobitelji faktora nekroze tumora (TNF), u koje spadaju Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2; TNF-R1, predstavljaju ključne regulatore vanjskog puta apoptoze. Također, za učinkovito prenošenje signala s površine stanice u citosol, ključna je tzv. domena smrti koja se nalazi u središnjem dijelu transmembranskih proteina. Kroz tu 'domenu smrti' prenose se signali do unutarnjeg dijela transmembranskog proteina što se naziva signalni kompleks koji inducira smrt (DISC). Tu postoje dva puta do apoptoze, ovisno o količini prisutnih kaspaza 8 i 10. Ako je njihova količina zadovoljavajuća aktivirati će se kaspaze 8 i 10, koje aktiviraju kaspazu -3, -6, -7 i dolazi do apoptoze. No, ako ih nema dovoljno apoptoza se uključuje preko mitokondrija gdje, kaspaza -8,-10 može potaknuti Bid da aktivira pro-apoptotički protein tBid koji zatim ulazi u mitohondrij i blokira anti-apoptotičke proteine Bcl-2 i Bcl-xl i aktivira Bax i Bak. To vodi do mitohondrijskog puta apoptoze. Štoviše, kaspaza -2 može se aktivirati putem kaspaze -8 ili putem kompleksa PIDD koji se sastoji od prokaspaze 2, PIDD i RAIDD i tako, preko Bid, pokrenut mitohondrijski put. TNF-R1 može aktivirati putove preživljavanja putem adaptivnih proteina TRADD, RIP, Traf-2 što vodi do aktivacije gena za preživljavanje pomoću NF-κB. Preuzeto i prilagođeno iz (37).

Lumen endoplazmatskog retikuluma (ER) jedinstveno je stanično okruženje optimizirano za skladištenje i oslobađanje kalcija, presavijanje i izlučivanje proteina i biogenezu lipida (38). U ER redoks status ima iznimno važnu ulogu jer smatanje proteina (engl. folding) i stvaranje disulfidnih veza zahtijeva oksidativne uvjete. Procjenjuje se kako 25% staničnog ROS dolazi

iz stvaranja disulfidnih veza tijekom smatanja proteina. Proteini koji imaju više disulfidnih veza imaju veći utjecaj na stvaranje ROS nego oni s manje. Tako generiran ROS može uzrokovati poremećaje u ER, što će rezultirati razmotanim ili pogrešno smotanim proteinima. Takvo stanje naziva se ER stres i kao odgovor aktivira se odgovor na nesmotane proteine (engl. UPR, unfolded protein response), koji pomaže stanicama da se prilagode i održe homeostazu. Blagi oksidativni stres pokrenut će UPR kao adaptacijski odgovor kako bi se održala funkcija i preživljavanje stanica. No, pri visokim razinama ili dugoj izloženosti oksidativnom stresu, uz pogrešno smatanje proteina, može doći do aktivacije apoptoze. Tijekom ER stresa može doći i do prijelaza Ca^{2+} iz ER u mitohondrij gdje dolazi do povećane aktivnosti matriks dehidrogenaza osjetljivih na Ca^{2+} , što povećava aktivnost respiratornog lanca i proizvodnju ATP. Također, Ca^{2+} vodi do membranske permeabilnosti u mitohondriju i ispuštanja ATP, GSH i citokroma C, što povećava razine ROS (37).

Poremećen mehanizam apoptoze povezan je s različitim patološkim stanjima kao što su: određene degenerativne, autoimune bolesti, ishemična oštećenja, anomalije, tumori (35). Kod tumora neke stanice uspješno inaktiviraju apoptotički odgovor različitim mehanizmima. Primjerice, zbog mutacija koje inaktiviraju tumor-supresorske gene, npr. TP53 ili se inhibira aktivnost kaspaza (2). Induciranje apoptoze povećanjem razina ROS predstavlja srž tumorske ciljane terapije. Terapijski pristup liječenja tumora, primjerice kemoterapija i radioterapija, uzrokuju nakupljanje velike količine ROS, što vodi u apoptozu. Arsenik-trioksid nedavno se pokazao kao ključan u terapiji tumora jer inducira propuštanje elektrona duž respiratornog lanca, što je uzrokovalo apoptozu u mnogim stanicama kao što su: mijelom, rak pluća i leukemija. Štoviše, 5-fluorouracil stvara ROS putem signalnog puta p53 i vodi do apoptoze stanica kolorektalnog karcinoma (25). Primjena bortezomiba, kao induktora ROS i stvaranja ER stresa, pokazala se korisnom u liječenju skvamoznih tumora glave i vrata. Pokazalo se također kako bioaktivne komponente iz biljaka, kao primjerice rezveratrol, uzrokuju nakupljanje H_2O_2 , što rezultira apoptozom u stanicama karcinoma prostate (PC-3), karcinoma jetre (HepG2) i karcinoma dojke (MCF-7) *in vitro* (15). Nakupljanje ROS i aktivaciju apoptoze uzrokuju i karotenoidi (Slika 14) (30).



Slika 14. Prikaz prooksidativnog djelovanja karotenoida u tumorskim stanicama i izazivanja apoptoze. Preuzeto i prilagođeno iz (30).

1.3. Autofagija

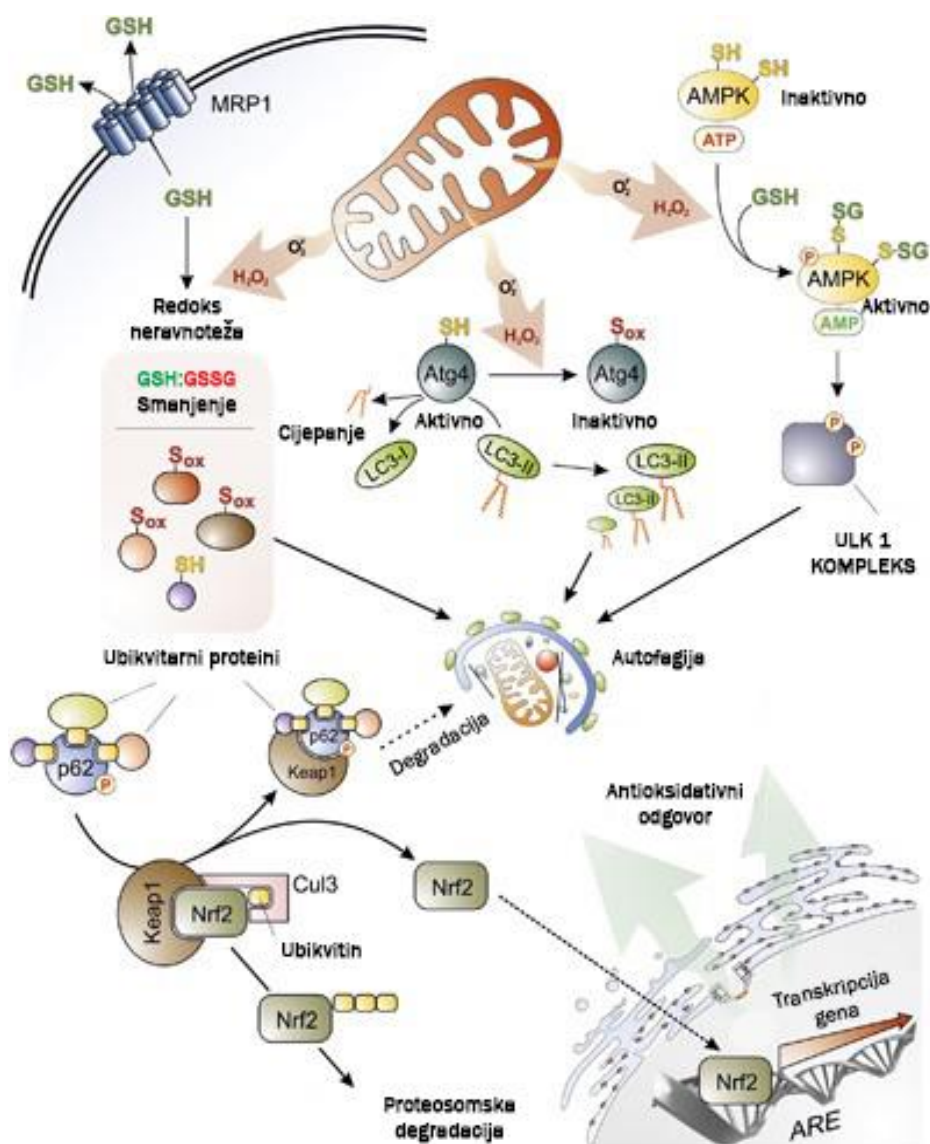
Autofagija je metabolički proces kojim stanica razgrađuje vlastite protein i organele unutar lizosoma. Novija saznanja o autofagiji govore kako je autofagija visoko konzerviran i genetički kontroliran proces uključen u održavanje homeostaze organizma (39). Otkriće gena i proteina povezanih s autofagijom omogućilo je bolje razumijevanje kompleksnog mehanizma. Do danas je opisano 40 gena koji kodiraju proteine povezane s autofagijom (1). Gen BECLIN1, koji kodira protein Beclin1, nužan je za formiranje autofagosoma, te je u 40-75% ljudskih karcinoma dojke, jajnika i prostate obrisan (2). U raznim tumorskim linijama uočena je monoalelska delecija BECLIN1 gena, dok kod određenih staničnih linija pojačana ekspresija Beclin1 proteina može inhibirati nastanak tumora (39).

Tri su glavne vrste autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom (engl. Chaperon-mediated autophagy, CMA). Sve vrste autofagije potiču degradaciju oštećenih ili nefunkcionalnih proteina i organela u stanici (40). Dok makro- i mikro- autofagija mogu, ali ne moraju biti regulirani procesi, autofagija posredovana šaperonima, visoko je reguliran i kontroliran proces (41). Proces autofagije uključuje inicijaciju, fagosomalnu nukleaciju, formaciju autofagosoma (elongacija), fuziju autofagosoma-lizosoma u autofagolizosom i degradaciju (40). U inicijacijskom putu sudjeluju

primjerice ubikvitinsko-proteosomalni kompleks (ULK) te PI3KC3 kompleks, ali i neke mete protutumorskih lijekova, npr. mTOR kompleks koji cilja rapamicin te mTOR predstavlja glavni kompleks koji regulira autofagiju. On je senzor autofagije koji detektira različite razine aminokiselina, glukoze, faktora rasta, kao i genotoksični i ER stres (42).

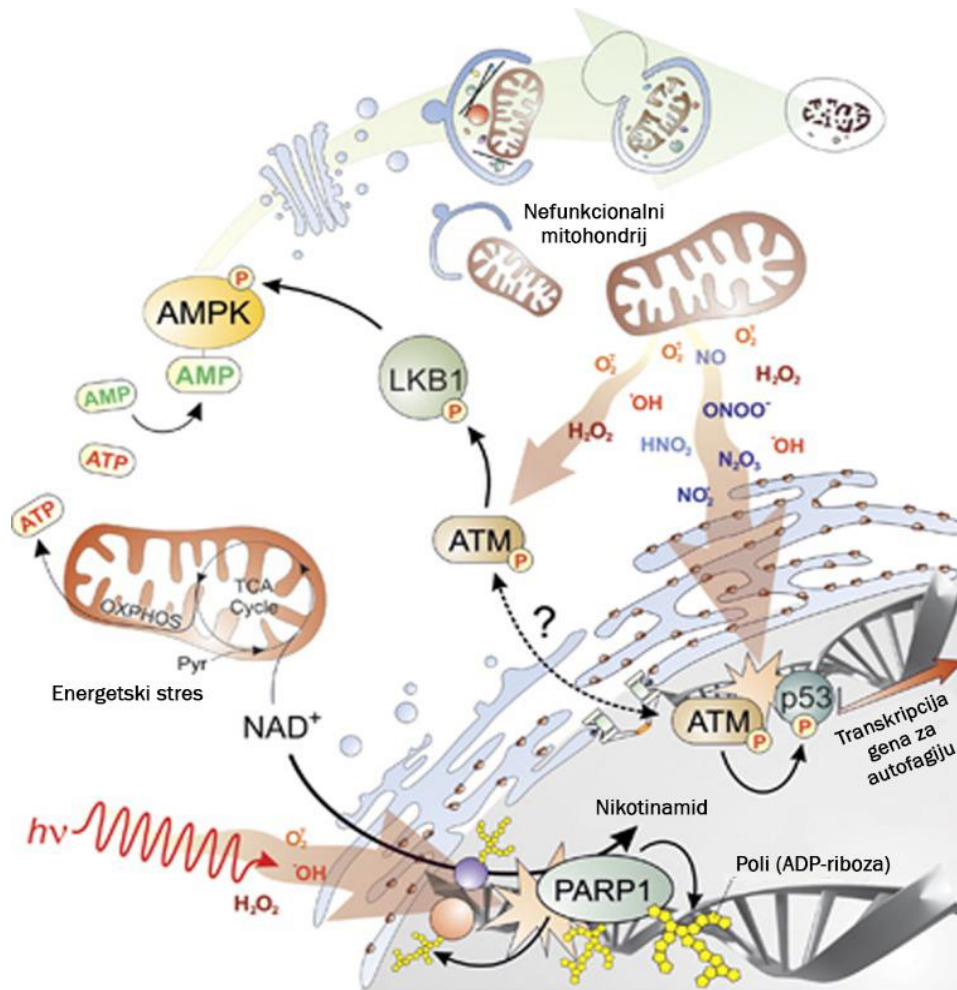
Različite stresne situacije induciraju aktivaciju autofagije poput nedostatka nutrijenata, hipoksije, oksidativnog i ER stresa te infekcije patogenima (27). Pri nedostatku nutrijenata ROS su rani induktori autofagije. Međutim, do danas još uvijek nije jasno koja vrsta ROS točno pokreće proces. Neka istraživanja sugeriraju da je O_2^- primarni ROS uključen u autofagiju uzrokovanu nedostatkom glukoze, glutamina, piruvata ili seruma. Druga istraživanja predlažu da je H_2O_2 molekula koja se stvara neposredno nakon gladi, dok mnogi samo pretpostavljaju da su ROS presudni za izvršavanje autofagije jer tretman antioksidansima djelomično ili u potpunosti vraća proces autofagije (40).

Mnoga istraživanja navode kako su mitohondriji glavni izvor ROS potrebnih za indukciju autofagije. Smatra se kako nedostatak nutrijenata dovodi do povećane potražnje za ATP, te mitohondriji kao glavni izvori ATP pojačano propuštaju elektrone i stvaraju ROS. Nakon kroničnog oštećenja funkcije mitohondrija ROS se može generirati u još većoj mjeri te s uloge induktora autofagije ROS postaje signal samouklanjanja mitohondrija kroz selektivni proces nazvan mitofagija. To predstavlja mehanizam regulacije negativne povratne sprege kojim se putem autofagije uklanja izvor oksidativnog stresa i štiti stanica od daljnjeg oksidativnog oštećenja (40). Brza aktivacija autofagije, nakon stvaranja ROS iz mitohondrija, pripisuje se redoks osjetljivim proteinima poput AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK). O_2^- i H_2O_2 glavni su produkti stanice u nedostatku nutrijenata. Oni mogu djelovati na više različitih načina aktivirajući autofagiju (Slika 15) (27).



Slika 15. Djelovanje mitohondrijskog ROS na različite puteve aktivacije autofagije: (1) djelovanje na AMP-aktiviranu protein kinazu (AMPK), SH procesom S-glutationilacijom cisteina nastaje S-SG, (2) oksidacija proteina povezanog s autofagijom (Atg4) (SH prelazi u Sox) što dovodi do regulacije proteina lakog lanca 3 (LC3) bitnog regulatora autofagije tj. inaktivira se svojstvo delipidacije Atg4-SH i akumulira se pro-autofagijski protein LC3-II, (3) pomoću neravnoteže u redoks balansu između omjera induciranih i oksidiranih glutationa GSH/GSSG i povećanje oksidiranih tiola (SOX) što je popraćeno otpuštanjem reduciranog GSH u izvanstanični dio preko MRP1 (engl. multidrug resistance protein 1), (4) put nevezan za ROS, odvija se pomoću ubikvitinskih proteina i vezanja za p62 te njegovim vezanjem za Keap1 što vodi do autofagije. NRF2 koji se odvojio od Keap1 odlazi u jezgru gdje potiče transkripciju antioksidativnih gena vezajući se za ARE (engl. antioxidant-responsive elements). Preuzeto i prilagođeno iz (27).

Reagirajući vrlo brzo na oksidativni stres i smanjujući toksičnost oksidiranih molekula i organela njihovim selektivnim uklanjanjem, autofagija se može smatrati zasebnim antioksidativnim procesom, kao i mehanizmom za preživljavanje i vrstom stanične smrti (27). Brojni radovi posljednjih godina pokazuju da, kada ROS i RNS oštete DNA, dolazi do aktiviranja DDR i istodobno se signalizira na autofagijski put. Dva su proteina koja se direktno povezuju s DDR-om (Slika 16) (27).



Slika 16. Unutarnji i vanjski izvori ROS uzrokuju oštećenja DNA molekule i aktivira se autofagija. Dva su proteina koja se direktno povezuju s DDR. To su poliADP-riboza polimezraza 1 (PARP1) i serin-protein kinaza (ATM) koji su primarni senzori oštećenja DNA. PARP je nuklearni enzim koji katalizira poli-ribozilaciju (poliADP-riboze) samog sebe, ali i druge nuklearne proteine. U stanju oštećenja DNA, putem ROS, PARP1 je hiperaktivan što dovodi do veće potrošnje NAD^+ i veće potrošnje ATP-a što uzrokuje energetski stres (lijevo dole). Drugi protein, ATM, je senzor oštećenja DNA molekule koji se nalazi i u jezgri i u citosolu. Djelovanjem ROS na ATM jezgre, oni djeluju kao pokretači popravka DNA, djelovanjem na p53, dok u citosolu, djeluje posrednički, preko kinaze jetra B1/AMP-aktivirane protein kinaze (engl. liver kinase B1/AMP-activated protein kinase, LKB1/AMPK) signalnog puta na aktivaciju autofagije. Preuzeto i prilagođeno iz RF (27).

Autofagija se može aktivirati uslijed djelovanja patogena, metaboličkih promjena i genotoksičnog stresa. Mehanizmi autofagije tijekom tumorigeneze još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Tumor supresorska uloga autofagije može se uočiti u tumorima smanjenjem nekroze i kronične upale. Također ima ulogu u selektivnom uklanjanju oštećenih mitohondrija smanjujući ROS, metaboličkoj homeostazi, razgradnji previše eksprimiranih proteina, dijeljenju u imunološkom nadzoru te kod obrane od potencijalno patogenih virusa i bakterija. Autofagija, također, ima utjecaj i na starenje stanica, što doprinosi sprječavanju rasta tumora (2). Normalne stanice s neispravnom autofagijom, međutim, nakupljaju oštećene proteine koji potiču razgradnju stanica, a tumorske stanice s nepravilnom autofagijom također pokazuju

povišene razine oštećenja DNA. U stanicama s neispravnom autofagijom smanjena je prilagodba na stres što može rezultirati manjkom ATP i oštećenim mitohondrijima s viškom ROS. Ograničavajuće količine ATP te ROS mogu inducirati replikacijski stres i aktivaciju mehanizma za popravak DNA, što uzrokuje zastoj u replikaciji te apoptozu, čime se inhibira rana tumorska aktivnost (39). S druge strane postoje dokazi koji upućuju na to da autofagija može potaknuti rast stanica raka i napredovanje tumora. Takve stanice raka mogu preživjeti jake metaboličke stresove, npr. gladovanje i hipoksiju, izbjeći imunološki nadzor, steći invazivne i metastatske osobine te djelovati na preoblikovanje tumorskog mikrookruženja (2). Ovi procesi događaju se paralelno s inaktivacijom p53 proteina. Stanice s defektnom autofagijom i p53 proteinom ne odlaze u apoptozu, već nakupljaju oštećenja u DNA te tako stvaraju povoljne uvjete za razvoj tumora (39). Uloga autofagije u tumorigenezi ovisi vjerojatno o vrsti zahvaćene stanice i stadiju bolesti (2).

1.4. Starenje stanica

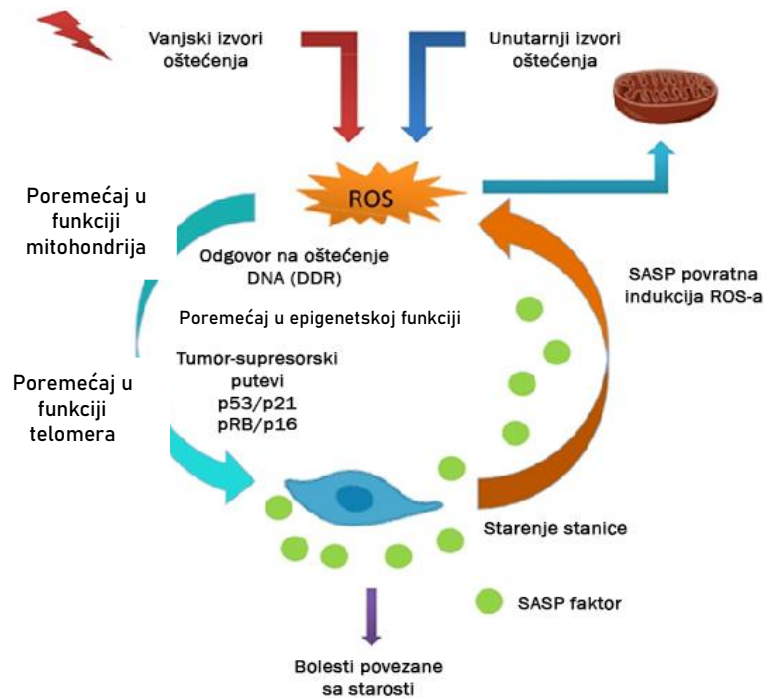
Postoje dvije hipoteze o starenju stanica (engl. senescence) općenito. Smatra se da stanično starenje uzrokuju različiti vanjski ili unutarnji faktori koji oštećuju biomolekule. 1950. godine predložena je teorija uloge slobodnih radikala u procesu starenja. Ta teorija temelji se na tome da stvaranje ROS i njegovo štetno djelovanje na različite stanične komponente, čine glavnu odrednicu dugovječnosti. Tijekom starenja naime, razine antioksidansa u tijelu su manje, odnosno smanjuje se mogućnost organizma da uklonja ROS, zbog čega se nakupljaju oštećenja makromolekula tijekom godina. Druga teorija temelji se na indukciji epigenetskih promjena čime se nakupljaju oštećene stanice (43).

Replikativno starenje podrazumijeva nepovratno zaustavljanje proliferacije stanice (44). Takav mehanizam još se naziva Hayflikova granica, a on postoji zbog skraćivanja telomera tijekom diobe DNA. Svakom novom replikacijom skraćuju se telomere stanica. Kada dođe do kritičnog skraćivanja telomera nastupa starost stanice. Uzastopno dijeljenje stanica može dovesti do ciklusa kromosomske fuzije i lomova, što rezultira nakupljanjem potencijalnih transformirajućih promjena i genskom nestabilnosti. Starost stanice je nepovratni proces izlaska stanice iz životnog ciklusa. No, stare stanice nisu mrtve, već su izgubile sposobnost daljnjeg dijeljenja i biokemijska svojstva su im promijenjena (2). Štoviše, takve stanice otpornije su na apoptotsku smrt od ostalih stanica. Pasivna uloga ostarijelih stanica vidi se i u njihovoj sposobnosti mijenjanja mikrookoliša. One imaju sposobnost izlučivanja sekretornih proteina

koji uključuju topljive signalne molekule, netopljive proteine, komponente matriksa i proteaze. Takva aktivnost vodi u stanični fenotip SASP (engl. Senescence-associated secretory phenotype, SASP). Kratke telomere su univerzalno obilježje zaustavljenih benignih i predmalignih lezija. Produljenje telomera reguliraju uglavnom enzimi telometaze. Određene vrste stanica neće doživjeti starenje, primjerice krvotvorne stanice, spolne stanice, stanice zametne loze koje imaju neograničenu replikaciju, mnogi tumori sadrže besmrtno stanice ili stanice s produženim replikativnim vijekom te matične stanice koje također imaju neograničenu moć dijeljenja (43). Međutim, većina somatskih stanica ne izlučuju enzim telomerazu i s vremenom doživljavaju starost. U malignim oboljenjima, u 10-20% slučajeva, koriste se drugi, još nedovoljno istraženi, mehanizmi produljenja telomera, no ovaj enzim je pojačano eksprimiran čak u 85-90% slučajeva pokušavajući održati telomerne krajeve dovoljno dugima za replikaciju. Uz ovaj prirodni proces starenja starenje može biti izazvano i drugim stresnim situacijama kao što su: oštećenje netelomerne DNA, koje se događa uslijed kemoterapije ili ROS, kod dugotrajnog ili neuravnoteženog mitogenog signaliziranja te kod aktivacije tumorsupresora. Novija istraživanja pokazala su kako proces starenja nije jednosmjernog tipa. Sekretorni fenotip povezan sa starenjem SASP povezan je s protumorskom, ali i protumorskom funkcijom. Tumorsupresorski utjecaj podrazumijeva: autokrini tumorsupresorski efekt, pojačanu imunološku infiltraciju i uklanjanje zastarjelih i transformiranih stanica te popravak tkiva (2). Replikativnim starenjem također se kontroliraju tumorsupresorski geni koji mogu suzbiti tumorigenezu, barem djelomično, inducirajući starenje (43). Suprotno tome, mnoga istraživanja sugeriraju kako starenje može imati i protumorsku ulogu procesima: promicanje upale, simuliranje angiogeneze i doprinos metastaziranju. Stoga, odgovor na stresne situacije starenjem treba proći kroz mnogo istraživanja kako bi se našla terapijska uloga u tom procesu (2).

Oksidativni stres povezan je sa starenjem stanica. Primjerice, pri oštećenju DNA aktivira se DDR (45), putem NF- κ B faktora koja se translocira u jezgru aktivira IL8 i p53 te dolazi do starenja, putem aktivacije p38 MAPK koji povećava p19 i dolazi do aktivacije procesa starenja preko mikroRNA (Slika 17). Oksidativni stres igra važnu ulogu u starenju transformirajući konformaciju proteina, mijenjajući katalitičku aktivnost, proteinske interakcije i interakcije proteina-DNA, utječući na transport proteina i mijenjajući neke signalne mehanizme koji aktiviraju NF- κ B i Smad3. Studije su pokazale da će se u uvjetima staničnog stresa ili oštećenja DNA pokrenuti starenje kako bi se spriječila proliferacija DNA abnormalnih stanica i stvaranje

tumora. Istodobno se pokreće autofagija kako bi se uklonile zaostale organele u stanicama, a na kraju da bi se inducirala apoptoza radi održavanja homeostaze tkiva i tijela (44).



Slika 17. Prikaz djelovanja ROS na aktivaciju starenja. Pri oštećenju DNA dolazi do aktivacije tumorsupresora p53 i gena p21 čime se zaustavlja rast stanica i aktiviraju se pRb/p16 čime stanice ulaze u nepovratno starenje. Kada se stanice zaustave u staničnom ciklusu one počinju izlučivati faktore SASP koji potom mogu potaknuti stvaranje ROS i oštećenje mitohondrija i DNA što potiče mehanizme starenja stanice. Jedan dio ostarjelih stanica može se ukloniti imunološkim mehanizmima no, većina će stanica vjerojatno preživjeti i metabolički aktivno generirati SASP faktore, što vodi u degeneraciju i poremećaj funkcije tkiva. ROS može uzrokovati i poremećaj u funkciji mitohondrija i mehanizama regulacije duljine telomera, što također potiče starenje. Preuzeto i prilagođeno iz (45).

Također, promjene na mitohondriju uzrokovane ROS dovode do starenja. Proces započinje pojačanom oksidacijom lipidne membrane mitohondrija te dolazi do oštećenja. Potom se nakupljaju nepravilno smotani proteini te, kada je nastala šteta toliko velika da na nju ne mogu reagirati kontrolni mehanizmi popravka, aktivira se autofagija. Nakupljaju se i DNA mutacija u mitohondriju te mu funkcija opada zbog čega se također potiče starenje. I peroksisomi imaju važnu ulogu u stvaranju ROS, održavanju oksidativne ravnoteže i lipidne membrane u borbi protiv ROS. Oni mogu bitno utjecati na rad i funkciju mitohondrija. Dođe li do poremećaja metabolizma peroksisoma, stanice postaju osjetljivije na ROS. Poremećaj u njegovoj funkciji dovodi do poremećene oksidativne fosforilacije, povećanja broja abnormalnih mitohondrijskih struktura i promjena aktivnosti i ekspresije respiratornog lanca (45).

1.5. Podjela i klasifikacija tumora

Svjetska incidencija raka je u porastu. Zabilježeno je 18.1 milijuna novih slučajeva u 2018. godini i smatra se kako će do 2040. godine dosegnuti 25 milijuna. Svjetska zdravstvena organizacija WHO (engl. World Health Organisation, WHO) i Unija za međunarodnu kontrolu raka UICC (engl. Union for International Cancer Control, UICC) razvili su određene klasifikacije temeljene na epidemiološkim, morfološkim, fenotipskim i biološkim podacima. Te klasifikacije pomažu pri suradnji interdisciplinarnog tima u uspostavljanju dijagnostičkog protokola, kako bi se olakšalo donošenje odluka o dijagnozi i pristupu liječenja. Trenutno se dijagnoza i liječenje tumora temelje na uspostavi njegove malignosti, mjestu podrijetla, histološkom podrijetlu, stupnju i njegovoj proširenosti po tijelu.

Tumori se uglavnom klasificiraju na četiri nivoa: (1) prema tkivu, organu i sustavu, (2) specifičnom tipu, (3) prema stupnju WHO klasifikacije, (4) prema metastaziranju u limfne čvorove (TNM) klasifikacija. S obzirom na tkivo koje zahvaćaju tumori se mogu podijeliti na četiri glavne skupine: karcinomi nastali od epitelnih stanica (koža, gastrointestinalni trakt, unutarnji organi itd.), sarkomi ili maligni mezenhimalni tumori nastali od vezivnih stanica (mišići, kosti, masno tkivo i žile) limfomi i leukemije nastale od krvnih stanica te neuromi-tumori nastali od stanica živčanog tkiva. Uz ove glavne tipove, definiranano je još mnogo podtipova raka. Nakon grube klasifikacije na histološki tip, slijedi prognostička procjena raka prema citološkim (stanična diferencijacija i displazija) i morfološkim značajkama (npr. broj mitozu i nekrozu). Procjena se izražava brojevima od 1 (visoka razina stanične diferencijacije) do 3 (slaba diferencijacija ili nediferencijacija). No, neke vrste raka imaju vlastiti sustav ocjenjivanja (karcinom prostate). Zatim slijedi klasifikacija prema stadiju oboljenja. Uglavnom se koristi TNM klasifikacija koja opisuje T- veličinu primarnog tumora, N- stupanj širenja u limfne čvorove, M- prisutnost metastazi. Dok su ove standardne klasifikacije tumora usredotočene na histopatologiju, kliničke i epidemiološke podatke, klasifikacije WHO-a počele su uključivati molekularno-genetske značajke tumora. Genomska klasifikacija bi trebala, uz kliničke podatke i odgovore na tretmane liječenja, uključivati i neprestano ažuriranu bazu podataka o najčešćim genomskim promjenama u tumorima, što bi uvelike poboljšalo

postojeće klasifikacije, ali i pomoglo onkolozima u dijagnosticiranju i liječenju raka. Iako mnoge tumore različitog podrijetla karakteriziraju iste genske promjene, primjena genomskih alata u tom slučaju ne bi služila za određivanje podtipa tumora, već kao pomoć u prognozi i načinu liječenja tumora. Kao primjer može se uzeti gen MYC koji je translociran u određenim tumorima, a amlificiran u drugim, što je povezano s agresivnošću tumora, lošom prognozom i rezistencijom na terapiju (46).

1.5.1. Osteosarkom

Osteosarkom (OS) maligni je tumor kostiju nastao iz mezenhimalnih stanica. Javlja se sporadično, s nekoliko slučajeva povezanih s poznatim nasljednim nedostacima u regulaciji staničnog ciklusa, ali oko 70% uzoraka tumora pokazuje kromosomsku abnormalnost. To obično uključuje mutacije u supresorskim genima ili u DNA helikazama. Nakon limfoma i tumora mozga, spada u treći najčešći tumor kod adolescenata, a vrhunac incidencije zahvaća drugo desetljeće života (47). Također se smatra najčešćim primarnim osteogenim malignim tumorom u djetinjstvu i adolescenciji s prevalencijom od 3 slučaja na milijun osoba godišnje (48). Petogodišnja stopa preživljavanja osteosarkoma povećala se sa 20% na >65% uz uvođenje adjuvativne kemoterapije i napredovanje medicine. Uvođenje kemoterapije omogućilo je spašavanje udova, dok je prije amputacija bila rutinsko liječenje visokokvalitetnog OS-a (47). Međutim, tijekom posljednjih nekoliko desetaka godina stopa preživljenja ostala je nepromijenjena. Veliki problem i visoku smrtnost predstavljaju metastaze, npr. u pluća, i ponavljajući osteosarkom, gdje petogodišnja stopa preživljenja iznosi samo 20%. Ti podaci upućuju na ograničenu učinkovitost do sada primjenjivanih terapijskih postupaka (48). Primjena kemoterapeutika, kao što je doksorubicin, i radioterapije u liječenju osteosarkoma, što primarnih što metastatskih plućnih lezija, često je limitirana zbog teških nuspojava i rezistencije stanica raka na te tretmane. Time se naglašava nužna potreba za razvojem novih, sigurnijih terapijskih strategija koje bi mogle poboljšati učinkovitost liječenja osteosarkoma i time povećati preživljenje bolesnika (49).

1.5.2. Glioblastom

Gliom je skupni naziv za primarne tumore mozga koji su klasificirani prema podrijetlu stanica od kojih nastaju. Dijelimo ih na astrocitne tumore (astrocitoma, anaplastična astrocitoma i

glioblastoma), oligodendrogliome, ependimome i pomiješane gliome. Gliomi su najčešći tumori središnjeg živčanog sustava i čine 80% svih malignih tumora mozga. Među astrocitnim tumorima glioblastoma multiforme čini čak 60% svih malignih tumora mozga kod odraslih (50). Glioblastomi neproporcionalno doprinose morbiditetu i smrtnosti, s 5-godišnjim ukupnim relativnim preživljavanjem od samo 6,8%, što varira prema dobi u dijagnozi i prema spolu (51). Iako su rijetki, njihova loša prognoza, sa stopom preživljena 14-15 mjeseci nakon dijagnoze, predstavlja velik zdravstveni problem. Mogu se pojaviti u bilo kojoj godini života, ali vrhunac incidencije smatra se razdoblje 55-60 godina, a češći su kod muškaraca nego kod žena. Glioblastoma multiforme, prema klasifikaciji WHO, pripada IV. stupnju s karakteristikama najagresivnijeg, invazivnijeg i nediferenciranog tipa tumora (50).

Glioblastome karakteriziraju molekularne heterogenosti. Studije su potvrdile 25 polimorfizama s jednim nukleotidom koji su povezani s povećanim rizikom za gliom, gdje je 11 specifičnih za glioblastom. Glioblastome karakteriziraju somatski molekularni defekti u 3 glavna procesa: iniciranju rasta tumora, izbjegavanju starenja i omogućavanju besmrtnog rasta. Genske lezije grupirane su u tri glavna signalna puta, uključujući: RTK/RAS/PI3K, koji je gotovo izmijenjen u 88% glioblastoma, put P53 u 87% i RB signalni put promijenjena u otprilike 78% glioblastoma (50). Uz kirurško liječenje, standardnu kemoterapiju i radioterapiju koristi se i ciljana terapija koja cilja specifične gene ili tkivno okruženje koje doprinosi rastu i preživljavanju tumora. Ovakvo tretiranje tumora blokira njegov rast i širenje te ograničava oštećenje zdravih stanica. Naizmjenična terapija električnim poljem koristi neinvazivni prijenosni uređaj, elektrode se postavljaju na vanjskoj strani glave, čime se ometaju dijelovi stanice potrebni za rast i širenje tumora. Ovakav pristup može se primijeniti kod bolesnika s tek dijagnosticiranim ili rekurentnim glioblastomom. No, unatoč novim saznanjima o molekularnoj osnovi glioblastoma, njegovo liječenje i dalje predstavlja velik izazov za onkologe (52).

1.6. Prirodni spojevi u liječenju malignih oboljenja

Rak predstavlja veliku grupu različitih patologija koje karakterizira nekontroliran rast stanica u tijelu. Tumori pak predstavljaju abnormalni rast stanica u određenom tkivu. Do danas je identificirano više od 200 različitih tipova tumora, od kojih se neki mogu proširiti na okolno područje, odnosno manifestirati metastaze koje su najčešći uzrok smrtnosti od raka. Tumori spadaju u vodeće uzročnike smrti u svijetu, što je izazov u pronalasku učinkovitijih metoda

liječenja. (53). Postoji mnogo različitih pristupa liječenju malignih oboljenja. Različitim parametrima određuje se koja je tehnika najpogodnija za određeno oboljenje, kao i za određenog bolesnika. Uglavnom, većina oboljelih liječi se kombinacijom tretmana kao što su kirurški zahvat s kemoterapijom i/ili radioterapijom. Tumori se tako tretiraju kirurški, radioterapijom, kemoterapijom, imunoterapijom, ciljnom terapijom, hormonskom terapijom, transplantacijom matičnih stanica te personaliziranom terapijom pametnim lijekovima (54). No, trenutno korišteni lijekovi i tretmani liječenja još uvijek imaju ozbiljne nuspojave, uzrokuju toksično djelovanje, ne samo na tumorske, već i na zdrave stanice, stvara se otpornost na određene lijekove te su iznimno skupa liječenja. Stoga, razvoj novih terapijskih sredstava za liječenje raka predstavlja ključan napredak u borbi protiv raka. Prirodni spojevi već dugi niz godina priznati su izvor bioaktivnih spojeva koji se koriste u zdravstvene svrhe. Oko 60% lijekova koji su danas prisutni na tržištu potječu iz prirode te takvo okretanje prirodnim izvorima predstavlja veliki potencijal u liječenju (55).

Tijekom nekoliko desetljeća odobreno je oko 200 novih kemijskih spojeva u borbi protiv raka, od koji su 50% strukturno izvorni prirodni spojevi i njihovi modificirani oblici, kako bi bili sigurniji u primjeni. Zahvaljujući strukturnoj raznolikosti, organske molekule kao terpeni, alkaloidi, saponini, vitamini, ulja, potencijalno su važni u selektivnoj inhibiciji proliferacije i indukciji smrti stanica raka (56). Štoviše, epidemiološke studije pokazuju da prehrana bogata namirnicama biljnog podrijetla štiti od mnogih bolesti, uključujući rak (57). Sve je više istraživanja pokazalo da određeni bioaktivni spojevi mogu održavati redoks ravnotežu i služiti kao antikancerogeni lijekovi zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, smanjene toksičnosti i nuspojave (58). Prirodni spojevi kao pokretači oksidativnoga stresa imaju sposobnost mijenjati različite fiziološke funkcije stanica raka i dovest do preživljavanja stanica ili njihove smrti. Jedno takvo istraživanje provedeno je na stanicama raka dojke (MCF-7) pri čemu su bioaktivne komponente iz kupine, *Rubus fairholmianus*, povećale ROS, oštetile jezgru i inducirale unutarnji put apoptoze (57). Kvarcentin i miricetin su snažno inhibirali tireoredoksin-reduktazu koja sudjeluje u staničnoj redoks kontroli, antioksidativnoj obrani i homeostazi stanica. Kempferol je, nadalje, čimbenik koji inducira apoptozu u stanicama glioma povećavajući oksidativni stres stanica na modelima monoblastičnih (U937) i limfocitnih staničnih linija (CEM) (59). Kurkumin je poznati polifenol koji u zdravim stanicama djeluje antioksidativno, a u stanicama raka kao prooksidans koji inducira apoptozu mitohondrijskim putem. Primjer takvog djelovanja dokazan je na stanicama ljudskog hepatoma, gdje kurkumin povećava stvaranje ROS i time inducira oštećenje mitohondrijske DNA i nesklad u procesu

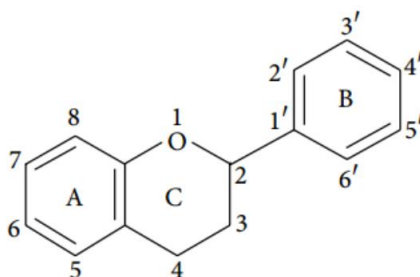
oksidativne fosforilacije, što dovodi do smrti stanica raka. Istraživanje na karcinomu pankreasa pokazalo je kako kaspacain, u koncentraciji od 150 uM, smanjuje SOD aktivnost tako da djeluje na kompleks I i III mitohondrijskog respiratornog lanca. Epigalokatehin galat (EGCG), najzastupljeniji katehin, iz zelenog čaja, pokazao se kao antikancerogena komponenta kod ranog stadija raka kolona, u dozi od 450 mg dva puta dnevno, što se pripisuje njegovoj sposobnosti regulacije ROS. Većina navedenih spojeva pripada skupini prirodnih polifenola od kojih su fenolne kiseline (30%) i flavonoidi (60%) najzastupljeniji (58).

1.6.1. Flavonoidi

Flavonoidi su jedna od najvećih skupina prirodnih heterocikličkih spojeva s kisikom koji se razlikuju prema strukturi, karakteristikama i funkcijama. Do danas je prepoznato više od 6400 vrsta (60). Glavne skupine flavonoida su: flavoni, flavanoni, flavani, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini. Ostale manje zastupljene skupine flavonoida su: kalkoni, dihidrokalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auron (61). Flavonoidi su polifenoli koje možemo naći u mnogim vrstama voća, povrća i medicinskih začina kao što su celer, peršin, brokula, lišće mrkve, luka, paprika, kupusa, kožica jabuke ili pak cvjetovi krizanteme. Oni omogućavaju biljkama obranu od različitih stresnih situacija kao što su: napadi mikroorganizama, insekata i UV zračenje (3).

Biološka aktivnost ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Osnovnu strukturu flavonoida čine difenilpropanski kostur s 15 ugljikovih atoma (15C; C6-C3-C6) tj. dva benzenska prstena (A i B) povezana s heterocikličkim piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 18). Vrste flavonoida mogu se odrediti s obzirom na supstituente koji mogu biti vezani za različita mjesta unutar aromatskih prstena. Flavonoidi s nekoliko mehanizama postižu zaštitnu ulogu organizma kao što je aktivacija antioksidativnih enzima, a inhibiranje oksidaza, sposobnost vezanja ketalnog iona prijelaznih kovina (60) te, zbog svoje rezonantne stabilnosti fenolnog radikala, imaju sposobnost donirati vodik reaktivnim radikalima i tako pozitivno utjecati na lančane reakcije slobodnih radikala. Mnoga su istraživanja pokazala da je upravo to glavna funkcija flavonoida. Njihova sposobnost visokog antioksidativnog djelovanja odgovorna je za antikancerogeni utjecaj u prehrani čovjeka (62). Preporučeni unos flavonoida prehranom iznosi približno 50-800 mg na dan. (63). Istraživanja su pokazala kako se približno 90-95% svih tumora pripisuje stilu života, dok je samo 5% povezano s defektnim genima. U povijesti se bilje koristilo kao komplementarna terapija ili kao prehrambeni sastojak, za utjecanje na stanične

signalne putove. Osobito je zanimljivo njihovo kemoprotektivno i antitumorsko djelovanje. U tom kontekstu mnoge su studije pokazale širok raspon preventivnog i terapijskog djelovanja luteolina na mnoge vrste tumora (64). Kao primjer može se uzeti prospektivna studija provedena na 66940 žena, koja je promatrala incidenciju tumora epitelnih stanica ovarija. Studija je pokazala pad incidencije od 34% kod žena koje su konzumirale najviše luteolina u odnosu na one koje su ga konzumirale najmanje (65).



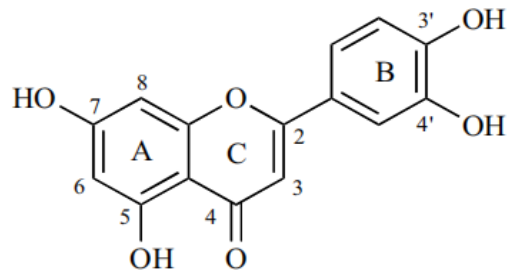
Slika 18. Osnovna struktura flavonoida. Preuzeto iz (61)

Luteolin

Davno u prošlosti kineska tradicionalna medicina koristila je upravo preparate na bazi biljaka bogatih flavonoidom, luteolinom, za liječenje različitih bolesnih stanja kao što su: hipertenzija, upalne bolesti i rak. Studije su također pokazale kako konzumacija biljaka bogatih luteolinom može poslužiti u prehrani kao regulator antioksidativnog statusa organizma, estrogena te može imati antimikrobnu ulogu.

Luteolin se sastoji od C₆-C₃-C₆, dva benzenska prstena (A,B), trećeg prstena koji sadrži kisik (C) i C₂-C₃ dvostruke veze. Posjeduje i hidroksilnu grupu na 5,7,3,4 ugljikovom atomu (Slika 19). Ono što je bitno u njegovoj strukturi upravo su ti hidroksilni dijelovi i dvostruke veze. To su bitne značajke koje utječu na njegovu biokemijsku i biološku aktivnost (3). Luteolin u biljkama može biti prisutan u dva oblika: aglikon (molekula koja nema niti jedan vezan šećer) i glikozid (aglikon koji ima jedan ili više vezanih šećera). Pojavljuje se uglavnom u glikoziliranom obliku, od kojih su većina luteolina O-glikozidi (šećerni dijelovi vezani za aglikon na jednu ili više slobodnih hidroksilnih skupina (OH)). Ti glikozidi obično imaju šećerne dijelove vezane na položajima 5,7,3 i 4 kao što je luteolin 5,7,3,4,-tetrahidroksiflavon. Glukoza je najčešći šećer koji se nalazi u glikozidima luteolina iako se mogu vezati i drugi šećeri poput primjerice apioze, ramnoze, rutinoze, galaktoze, arabinoze, glukuronske kiseline i ksiloze. Tijekom apsorpcije dolazi do hidrolize glikozida u slobodni luteolin. Prolazeći kroz

crijeva dio se apsorbira, a dio se pretvara u glukuronide. Toplinski je stabilan spoj te su njegovi gubitci tijekom kuhanja niski (65).



Slika 19 . Struktura luteolina. Preuzeto iz (65)

Luteolin je jedan od najčešćih flavonoida prisutnih u jestivim biljkama, npr. u mrkvi, paprici, celeru, maslinovom ulju, paprenoj metvici, majčinoj dušici, ružmarinu, origanu, zelenoj salati, šipku, artičoki, čokoladi, špinatu i zelenom čaju. Oralna upotreba (50mg/kg) analoga luteolina, 5,7,3',4'-tetrametoksiflavona, pokazala je 14,3% bioraspoloživosti te da se, nakon 48h, 0,81% izlučuje uglavnom u čistom obliku putem fecesa, a 0,05% mokraćom, što upućuje na to da se velikom većinom izlučuje u obliku metabolita.

Smatra se kako koncentracija luteolina, prisutna u prehranbenim dodatcima, ne može dosegnuti koncentraciju koja može izazvati toksičnost organizma jer je oralna apsorpcija luteolina niska. Istraživanje na T47D stanicama pokazalo je da je koncentracija luteolina u krvi 10 do 100 puta manja od mikromolarnog raspona koji može izazvati toksičnost. No, potrebno je provesti još istraživanja o njegovu utjecaju na organizam jer određena istraživanja sugeriraju da je njegovo djelovanje na endokrini sustav štetno. Na to ukazuju dokazi njegovog afiniteta prema estrogenu te antagonizmu prema progesteronu. Suprotno tomu, druga istraživanja ukazuju na inhibitorni učinak na estrogen te iznimno mali na progesteron (66).

Mnoge studije navode njegovu široku ulogu u patogenezi raka. Njegovo djelovanje u vidu antioksidansa, molekule koja uklanja slobodne radikale, sprječava povećanje razina oksidativnog stresa, a kao prooksidans, visoko reaktivna molekula koja može oštetiti druge molekule, potiče stvaranje reaktivnih molekula koje će izazvati određene greške i lezije na molekulam DNA, RNA i proteina, što će dovesti do apoptoze stanice raka. Kao antioksidans ima sposobnost inhibirati oštećenja lipida, proteina i DNA uzrokovanih ROS (3). No, njegovo djelovanje kao prooksidans smatra se potencijalom u mogućem liječenju raka. Induciranje ROS pomoću luteolina jedan je od ključnih mehanizama kojima luteolin aktivira aktiviranu protein

kinazu, aktivator apoptoze AMPK, čime se blokira djelovanje NF- κ B i aktivira TNF-alfa inducirana apoptoza (67). Istraživanja sugeriraju kako inducira apoptozu djelujući na vanjski i unutarnji put te da taj učinak postiže u koncentraciji od 10 μ M ili većoj (65). Istraživanje na stanicama HT29 pokazalo je kako povećava propusnost membrane mitohondrija što dovodi do apoptoze ovisne o kaspazama (68). *In vivo* i *in vitro* istraživanja pokazala su kako sudjeluje u regulaciji metastaziranja gdje, na stanicama melanoma, djeluje na epitelno-mezenhimalnu tranziciju (engl. epithelial–mesenchymal transition, EMT), inhibiranjem integrin beta3. Istraživanje *in vivo* pokazalo je kako luteolin inhibira rast tumorskih stanica želuca, što se povezuje sa smanjenjem ekspresije VEGF-A i MMP-9, faktora koji sudjeluju u vaskularizaciji tumora (67). Istraživanje na stanicama HT29 pokazalo je kako luteolin sudjeluje u povećanju ROS, što je posljedično dovelo do općenitog unutarstaničnog poremećaja u redoks statusu (68). Istraživanje na stanicama raka pluća, pokazalo je također kako luteolin inducira ROS u ranoj fazi, tako da smanjuje aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) (69).

Ispitivanje antioksidativnog učinka na stanicama ljudskog raka kolona HT-29 pokazalo je kako pri 50 μ g/ml luteolin smanjuje ROS induciran hidrokso radikalom i superoksidom te da na taj način inducira smrt stanica raka. Te se pokazalo kako 48h tretman inducira apoptozu posredovanu kaspazom, regulirajući kaspazu-3/-9 (70).

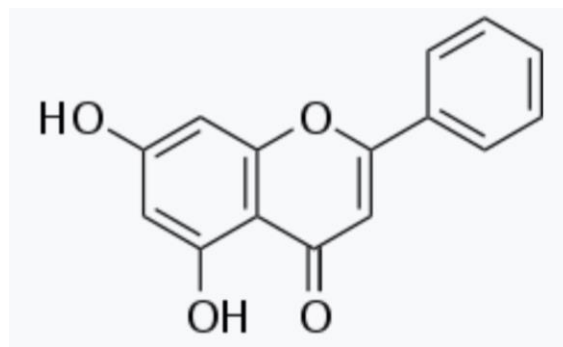
Istraživanje na HeLa stanicama pokazalo je inhibitorno djelovanje luteolina na proliferaciju ovisno o koncentraciji i vremenu tretiranja, u usporedbi s netretiranom 0,11% DMSO kontrolom. Veći učinak vidio se na tretmanu od 48h pri većim koncentracijama (20-40 μ M) pri čemu je inhibicija bila veća čak i od pozitivne kontrole 5 μ M cisplatinom. IC50 vrijednost, koncentracija koja uzrokuje 50% inhibicije rasta stanica, mjerena na 48h, bila je 20 μ M. Pri koncentraciji 10 μ M i 20 μ M, tijekom 48h, uočene su morfološke promjene i vidljiva je apoptoza (71).

Na stanicama raka želuca, MKN45 i BGC823, luteolin je inhibirao proliferaciju stanica. S porastom koncentracije (5-100 μ M) te s porastom vremena tretiranja (24, 48, 72h) pad vijabilnosti bio je veći. IC50 vrijednost, izmjerena tijekom 48h i 72h, za obje stanične linije iznosila je približno 40 μ M (72).

Kakvu će funkcionalnu ulogu luteolin pokazati ovisi o koncentraciji i izvoru slobodnih radikala, o specifičnoj situaciji i mikrookruženju u kojem se stanice nalaze, te njegovoj koncentraciji i vremenskoj izloženosti stanicama (3).

Krizin

Krizin, 5,7-dihidroksiflavon, je flavon koji pripada skupini hidroksilnih flavonoida. Može se pronaći u različitim koncentracijama u gljivama, primjerice *Pleurotus ostreatus* (prosječna zastupljenost 0.17-0.34 mg/kg), među gdje koncentracija varira, medljikovac 0,10 mg/kg i šumski med 5,3 mg/kg, kamilici i propolisu (25 g/L). Sastoji se od dva benzenska prstena (A, B) s jednim kisikom koji čini heterociklički prsten. Ima dvostruke veze među 2C-3C, karbonilnu grupu na 4C atomu, a nedostaje mu oksigenacija na 3C atomu. Hidroksilna grupa nalazi se na 5C i 7C atomu (Slika 20). Njegova struktura razlikuje se od ostalih flavonoida jer na B prstenu ne sadrži niti jedan kisikov atom (73).



Slika 20. Prikaz molekularne strukture krizina. Preuzeto iz (73).

Mnoga istraživanja pokazala su kako krizin ima nisku biološku dostupnost u ljudi, što ograničava njegovu terapijsku ulogu. Smanjena biološka dostupnost ne pripisuje se oksidaciji unutar crijeva i jetra, već djelovanju određenih enzima koji konjugiraju krizin, putem glukuronizacije i sulfatne katalize (73). Klinička istraživanja na zdravoj populaciji pokazala su kako je koncentracija krizina u plazmi, nakon oralne primjene, od 400 mg, jako niska, a koncentracija u fecesu iznimno visoka, što ukazuje na njegovu lošu apsorpciju. Niska količina zastupljenosti krizina u svakidašnjoj prehrani smatra se netoksičnom za zdravlje, dok bi se pri visokim dozama razvila određena oštećenja, što se pokazalo na jetrenim stanicama pastreve. Njegovo citotoksično djelovanje pripisuje se peroksidazi slične aktivnosti, što dovodi do oksidacije krizina koji posljedično stvara toksične komponente. Mnoga su istraživanja ukazala

na to da ima blagotvorno djelovanje na zdravlje kao npr. protuupalno, protiv dijabetesa, vazodilatacijsko, neuroprotektivno, hepatoprotektivno te antioksidativno (74).

Uz to, krizin ima sposobnost kemopreventivnog djelovanja, djelujući na različite faze karcinogeneze kao što je inicijacija, promocija i progresija. Takvo djelovanje pripisuje se promjeni karcinogene transformacije, hvatanju slobodnih radikala te reguliranju ekspresije gena koji sudjeluju u procesu apoptoze, proliferacije i diferencijacije. Njegovo široko djelovanje prikazano je u istraživanju na 7,12-dimetilbenzen antracena (DMBA) induciranom karcinomu bukalne vrećice hrčka (HBP). Pokazalo se kako prevenira prokarcinogenu aktivaciju, regulira antioksidativnih enzima (GSH, GPX, GST), pokreće apoptozu, inhibira proliferaciju, invaziju, angiogenezu i metastaziranje tumora (75). Oralna primjena krizina (1mg/kg i 10mg/kg) pokazala se kako, kao antioksidans, značajno umanjuje stvaranje slobodnih radikala i inhibira aktivnost SOD, CAT, GPX na miševima (74). Apoptoza uzrokovana krizinom posredovana je mitohondrijem i njegovom depolarizacijom, stvaranjem ROS molekula i lipidnom peroksidacijom u obje stanične linije raka prostate, DU145 PC3 (76). Može djelovati i kao modulator antiapoptotskih proteina Bcl-2, Bcl-x i Mcl-1 te povećati Bax protein što dovodi do apoptoze (77). Ima sposobnost zaustavljanja staničnog ciklusa (78) i indukcije stresa endoplazmatskog retikuluma djelujući na regulatorne proteine u stanicama DU145 i PC3 (76). Nadalje, na staničnim linijama glioblastoma, raka dojke, leukemije i raka pluća pokazao je citotoksično djelovanje (74). Također, može djelovati na angiogenezu preko HIF-1 *in vivo* i autofagiju, primjerice na MCF-7 stanicama pojačavajući razinu LC3-II. Pokazalo se kako može pojačati citotoksično djelovanje različitih protutumorskih lijekova djelujući na smanjenje staničnog GSH (78). Netransformirane stanice pokazale su veću rezistenciju na citotoksično djelovanje krizina u odnosu na stanice raka (75). Njegovo djelovanje uvelike ovisi o koncentraciji i vremenu izloženosti stanica tretmanu. Istraživanje provedeno na MCF-7 stanicama pokazalo je kako tretman krizinom ima inhibitorno djelovanje ovisno o koncentraciji i vremenu izloženosti tretmana. Tretman od 24h, pri niti jednoj koncentraciji krizina, nije pokazao značajno djelovanje, dok je pri 48h i 72h tretmana vidljiv značajan pad vijabilnosti stanica raka pri koncentracijama 5-20 μM . IC50 vrijednosti za 48h iznosila je $19.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$, a za 72h $9.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$. Ovo je istraživanje pokazalo i kako krizin, pri 48h tretmanu koncentracije 5-20 μM , inducira apoptozu tumorskih stanica (79).

Drugo istraživanje na stanicama raka mokraćnog mjehura, T24 i 5637, pokazalo je kako krizin, pri 24h tretmanu, inhibira proliferaciju stanica u ovisnosti o koncentraciji, gdje je najveći učinak

dobiven pri najvećoj koncentraciji od 80 μ M. Stanice su se tretirale 40 μ M krizinom u različitim vremenima (12, 24, 36, 48h) pri čemu je najveći inhibitorski utjecaj pokazan u najdužem tretmanu, 48h. Kontrola su bile zdrave stanice mokraćnog mjehura SV-HUC-1 na koje krizin u oba istraživanja nije pokazao statistički značajan utjecaj. Iz toga se zaključilo da krizin ima selektivno antitumorsko djelovanje na stanice raka, a nema na zdrave stanice. Istraživanje je još pokazalo kako krizin, tijekom 24h tretmana, pri 40 μ M i 80 μ M, značajno inducira apoptozu u stanicama raka T24 te vrlo malo u zdravim SV-HUC-1. Pri koncentraciji 40 μ M i 80 μ M inducirao je apoptozu aktivacijom kaspaze-3/9, ali ne i kaspaze-8 (77).

2. CILJ RADA

Broj oboljelih od raka u stalnom je porastu. Prema WHO podacima broj novooboljelih u svijetu porast će s 18 milijuna (2018. godina) na 29,5 milijuna godišnje (2040. godine) (80). Rak predstavlja vodeći uzrok smrti u svijetu, od kojeg je, tijekom 2020. godine, umrlo približno 10 milijuna ljudi (81). Takvi podaci ukazuju kako rak predstavlja ne samo zdravstveni, već i socio-ekonomski problem. Podaci ukazuju na visoku stopu smrtnosti, što zbog kasno uspostavljene dijagnoze bolesti, iznimno skupih tretmana liječenja nedostižnih velikoj populaciji ljudi, što zbog neučinkovitog liječenja i ozbiljnih nuspojava. Postoji opravdano zanimanje za istraživanje prirodnih spojeva kao potencijalnih preventivnih i terapijskih spojeva u liječenju raka.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio istražiti učinak prirodnih antioksidansa, krizina i luteolina kao potencijalne supstancije s pozitivnim terapijskim učinkom u liječenju raka, na rast tumorskih staničnih linija osteosarkoma (U2OS) i glioblastoma (A1235) u uvjetima *in vitro*. Hipoteza istraživanja bila je kako će navedeni spojevi djelovati antiproliferativno u ovisnosti o dozi i vremenu tretmana. Ukoliko se potvrdi hipoteza i tesirani flavonoidi uzrokuju smanjenje proliferacije stanica, cilj je bio utvrditi generiranje molekula ROS kao jednog od mogućih mehanizama djelovanja na rast tumorskih stanica. Rezultati se uspoređuju s djelovanjem na nemalignu staničnu liniju humanih embrionalnih stanica bubrega (HEK293).

SPECIFIČNE HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA:

1. Krizin i luteolin inhibiraju proliferaciju staničnih linija raka U2OS i A1235, ali ne i proliferaciju embrionalnih stanica bubrega HEK293
2. Krizin i luteolin najveću inhibiciju proliferacije pokazat će u ovisnosti o dozi i vremenu tretmana odnosno pri većim koncentracijama i dužem vremenu tretmana (48h i 72h).
3. Krizin i luteolin pri visokim koncentracijama (80 μ M i 100 μ M) pokazat će najveću akumulaciju molekula ROS u staničnim linijama raka, ali ne i u nemalighnih stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Korištene kemikalije i reagensi

Proces odmrzavanja, presađivanja i tretiranja stanica:

- Dulbeccov modificirani Eaglov medij za uzgoj stanica, DMEM (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium)- visoko glukozni (4.5g/l), L-glutamin, natrijev piruvat; sterilno filtrirano (Capricorn Scientific, Njemačka)
- Fetalni teleći serum, FBS (engl. Fetal bovine serum) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Antibiotik Penicilin-Streptomycin (2%) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Fosfatni pufer, PBS (engl. phosphate buffered saline); sterilno filtrirano
 - 137mM NaCl
 - 2,7mM KCl
 - 1,4mM KH₂PO₄
 - 4.3mM Na₂HPO₄
- 0,05% tripsin – EDTA (Gibco)
- Trypan Blue boja
- luteolin (Sigma-Aldrich, SAD)
- krizin (Sigma-Aldrich, SAD).

Procjena preživljavanja stanica metodom MTT:

- matična otopina reagensa MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2-5-Difeniltetrazolium bromid), sterilno filtrirano (Sigma-Aldrich, SAD)
- dimetil sulfoksid, DMSO (Sigma-Aldrich, SAD)

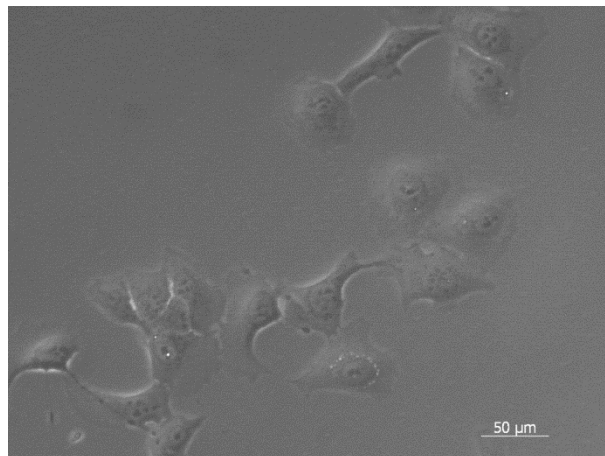
Kvantitativna i slikovna metoda procjene oksidativnog stresa:

- dikloro-dihidro-fluorescin diacetat, DCFH-DA (Sigma-Aldrich, SAD)
- formaldehid (10%) (Sigma-Aldrich, SAD)

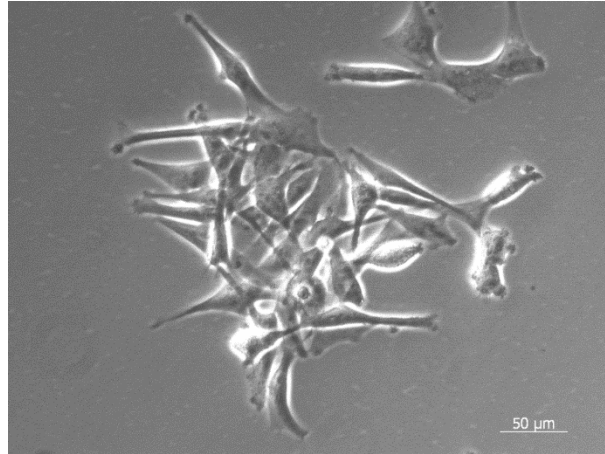
3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica

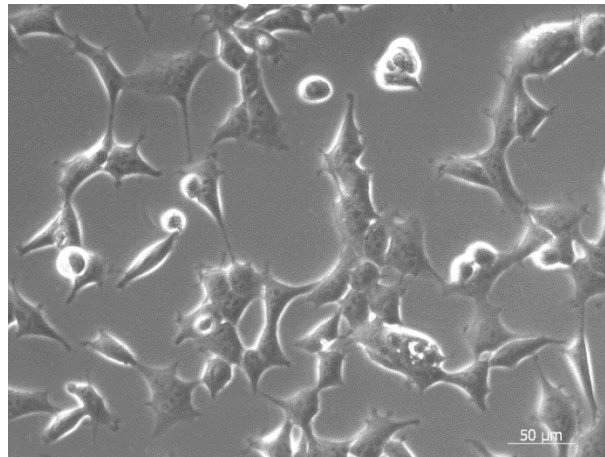
U svrhu provođenja istraživanja koristile su se ljudske stanične linije ustupljene od Klinike za dječje bolesti Zagreb (U2OS), Instituta Ruđer Bošković (A1235) i Klinike za traumatologiju Zagreb (HEK293). U2OS stanična je linija ljudskog osteosarkoma (Slika 21), mezenhimalnog podrijetla. A1235 stanična je linija ljudskog glioblastoma iz skupine neuroma (Slika 22). HEK293 stanična je linija zdravih embrionalnih stanica bubrega čovjeka epitenog podrijetla (Slika 23). Sve stanične linije karakterizira rast i uzgoj na adherentnim površinama u jednom sloju. Stanične linije uzgajane su u velikim petrijevkama (Sarstedt, Njemačka) u tekućem mediju DMEM u koji je dodano 10% FBS, 100 u/ml penicilin i 100 u/ml streptomycin. Stanice su rasle u inkubatoru na 37°C i 5% CO₂ (Panasonic, Japan). Prije tretiranja stanice su provjerene pod mikroskopom (Zeiss Axiovert 40 CFL, Njemačka), a kad dosegnu 80-90% konfluentnosti, rasade se. Rasadiivanje stanica provodi se uklanjanjem medija iz petrijeve zdjelice, ispiranjem stanica dva puta s 2 ml PBS, dodavanjem 1ml tripsina te inkubiranjem 4 minute (Panasonic, Japan) kako bi se stanice odlijepile od podloge, zatim se dodaje novi medij, stanice se resuspendiraju i presade u nove petrijevke (Sarstedt, Njemačka). Tim postupkom održavaju se stanične kulture tijekom istraživanja.



Slika 21. Stanična linija U2OS osteosarkoma slikana mikroskopom (Zeiss Axiovert 40 CFL, Njemačka) pri povećanju od 200x.



Slika 22. stanična linija A1235 glioblastoma slikana mikroskopom (Zeiss Axiovert 40 CFL, Njemačka) pri povećanju od 200x.



Slika 23. stanična linija HEK293 embrionalnih stanica bubrega slikana mikroskopom (Zeiss Axiovert 40 CFL, Njemačka) pri povećanju od 200x.

3.2.2. Mjerenje stanične vijabilnosti uz pomoć MTT testa

3.2.2.1. Brojanje stanica i nasađivanje na pločicu s 96-mikrojažica

Nakon što su stanice dosegle konfluentnost 80-90% korištene su za eksperiment. Proces manipulacije stanicama odvijao se u laminaru (Nuve MN 090, Turska) u sterilnim uvjetima (uz prisutstvo plamenika). Iz petrijevki (Sarstedt, Njemačka) se vakuumom odstranio medij DMEM-HG, a stanice su ostale zalijepljene za dno. Da bi se odstranili inhibitori tripsina iz medija, stanice se ispiru u 10 mL PBS te se PBS ukloni vakuumom. Zatim se dodaje 2 mL tripsina (inkubacija 4 minute, 37°C, 5% CO₂) (Panasonic, Japan) kako bi se stanice odlijepile.

Dodavanjem 10 mL medija DMEM-HG neutralizira se djelovanje tripsina i stanice u suspenziji prebrojavaju se pomoću uređaja za brojanje stanica (Luna Logos Biosystem, Južna Koreja) (trypan blue, faktor razrijeđenja 2). Nakon brojanja stanica napravila se nova suspenzija stanica, gdje se odvoji određeni volumen stanične suspenzije, čija je koncentracija poznata nakon brojanja, te se razrijedi medijem DMEM-HG kako bi broj stanica iznosio 5×10^4 st/mL. Stanice se nasade u mikrotitarske pločice s 96 jažica (Sarstedt, Njemačka) i ostave u inkubatoru (Panasonic, Japan) preko noći kako bi se prihvatile za podlogu.

3.2.2.2. Tretiranje stanica

Stanične linije tretirane su s dva flavona, luteolinom i krizinom otopljenim u DMSO. Ukratko, vakuumom se odstranio medij, a spojevi su dodani na stanice u rastućim koncentracijama spojeva: 20, 40, 60, 80, 100 μ M. Svaka koncentracija testirana je u triplikatu. Na pločicama su ostavljene mikrojažice za negativnu kontrolu bez stanica i mikrojažice u koje su nasade stanice bez tretmana (tretman 0). Obje kontrole bile su u triplikatima. Stanice su inkubirane 24, 48 i 72 sata na 37°C i 5% CO₂ (Panasonic, Japan).

3.2.2.3. Inkubacija s MTT i mjerenje

Vijabilnost nasadenih stanica određena je pomoću MTT testa. To je standardni kolorimetrijski test kojim se mjeri aktivnost enzima dehidrogenaza. MTT spoj ulazi u staničnu membranu, zbog promjene potencijala, te dolazi do redukcije MTT-a (blijedo-žuta boja) u formazan (intenzivno tamnoplavo obojenje) pomoću dehidrogenaza. Sposobnost redukcije MTT spoja imaju samo žive stanice, stoga se ovim testom mjeri metabolička aktivnost stanica. MTT spoj topiv je u vodi, dok formazan nije, a pojavljuje se u obliku ljubičastih kristala unutar stanice. U različitim vremenskim očitavanjima (24, 48 i 72h) iz jažica se uklonio medij, stanice su isprane u PBS i dodala se priređena otopina MTT koncentracije 0,5 mg/mL volumena 40 μ L (5mg/ml razrijeđen u DMEM-HG) u svaku mikrojažicu. Matična otopina MTT priprema se otapanjem krutog MTT u sterilnom PBS te se tako dobije koncentracija 5 mg/ml. Tako pripremljena otopina profiltrirana je kroz 0.2 μ m filter i čuvana na +4 °C zaštićeno od svjetla. Radna se otopina dobila miješanjem određenog volumena reagensa i hranjivog medija DMEM do konačne 5% otopine MTT reagensa.

Nakon inkubacije (Panasonic, Japan) stanica s MTT od 3 sata dodalo se 170 μ L DMSO koji lizira stanice i otapa ljubičaste kristale formazana. Postupak se obavljao u laminaru (Nuve MN 090, Turska) bez prisutstva svjetla, a stanice su tijekom inkubacije prekrivene aluminijskom folijom i postavljene na miješalicu (Stuart SSL3 Rocker, Giratory, UK) 30 minuta kako bi se kristali formazana ravnomjerno razbili. Rezultati su očitani kolorimetrijski na 560 nm na uređaju Glomax-Multi (Promega, USA). Za svaku koncentraciju tretmana određivala sam IC50 vrijednosti, koncentracije koje uzrokuju 50% inhibicije rasta stanica za 72h tretman.

3.2.3. Kvantitativna metoda procjene oksidativnog stresa

Pokus je proveden sa stanicama koje su dosegle visoku konfluentnost te potom rasađene na tri pločice sa 6 jažica (Falcon, Njemačka). Stanice su preko noći inkubirane kako bi se prihvatile za površinu. Sljedeći dan stanice su tretirane tretmanima: DMEM-HG, 0,1% DMSO, 20 μ M krizin, 100 μ M krizin, 20 μ M luteolin, 100 μ M luteolin. U tu svrhu stanicama se uklonio medij i dodalo se po 2 mL finalne otopine za tretman u duplikatima. Stanice su inkubirane (Panasonic, Japan) preko noći. Nakon 24h tretmana uklonio se medij, stanice su isprane dva puta s 2 ml PBS i tripsinizirane sa 500 μ L tripsina (inkubacija 4 min, 37°C, 5% CO₂). Uz pomoć 2 ml medija/jažici stanice su sakupljene za svaki tretman i kontrole zasebno u epruvetu (Falcon, Njemačka). Stanice su sakupljene centrifugiranjem pri 1300 rpm/5 minuta (Rotofix 32A Hettich, Njemačka). Isprane su s PBS i dobro resuspendirane za brojanje (željeni volumen 1 ml, koncentracija 1x10⁶ st/ml). Nakon brojanja iz suspenzije stanica uzeo se odgovarajući volumen uz dodatak PBS. Stanice se inkubiraju 30 minuta u pripremljenoj otopini DCFH-DA koncentracije 5 μ M, volumena 0,5 μ L, (PBS i boja DCFH-DA). Zatim slijedi centrifugiranje (400g/5 minuta) (Rotofix 32A Hettich, Njemačka), uklanjanje boje, resuspendiranje u 1ml PBS i tretmani su preneseni na crnu mikrotitarsku pločicu s 96 mikrojažica (Sarstedt, Njemačka). Svaki tretman izmjeren je u kvadrilikatu. Rezultati su očitani na spektrofotometru (Glomax-Multi Promega, SAD) kolorimetrijski pri emisiji 525 nm i ekscitaciji 488 nm.

3.2.4. Slikovna metoda detekcije oksidativnog stresa

Stanice su za ovaj pokus nasadene na pločicu sa 6 jažica (Falcon, Njemačka) u koncentraciji 1×10^5 st/ml. Preko noći su stanice inkubirane na 37°C i 5% CO_2 (Panasonic, Japan). Sljedeći dan iz jažica se uklonio postojeći medij i dodalo se po 1 ml tretmana: čisti medij DMEM-HG, 0,1% DMSO, $20\mu\text{M}$ krizin, $100\mu\text{M}$ krizin, $20\mu\text{M}$ luteolin i $100\mu\text{M}$ luteolin. 0,1% DMSO koristio se kao negativna kontrola. Stanice su inkubirane pri 37°C i 5% CO_2 preko noći (Panasonic, Japan). U uvjetima bez svjetla stanice su sljedeći dan tretirane s nefluorescentnom lipofilnom probom DCFH2-DA. DCFH2-DA ima svojstvo prolaska kroz staničnu membranu. Unutar stanice, pomoću enzima deacetilaze, formira se DCFH2, koja je također nefluorescentna proba, no bez mogućnosti prolaska kroz membranu stanice. Konačno, reakcijom DCFH2 s unutarstaničnim molekulama ROS dolazi do formiranja DCF i emitiranja fluorescencije. U pokusu je, stoga, iz svih jažica uklonjen medij i dodalo se po 1mL pripremljene otopine boje DCFH2-DA koncentracije $5\mu\text{M}$ ($5\mu\text{M}$ DCFHDA 10mM razrijeđena u 10mL PBS-a). Inkubacija je trajala 30 minuta pri 37°C i 5% CO_2 (Panasonic, Japan). Zatim se uklonila boja ispiranjem u 1mL PBS-a. Dodalo se na stanice 100uL formaldehida (10%), prekrilo pokrovnicom, papirom se uklonio višak tekućine te su stanice analizirane mikroskopom (Olympus DP70, Japan) pri ekspoziciji 1/10, povećanju 200x.

3.3. Statistička obrada rezultata

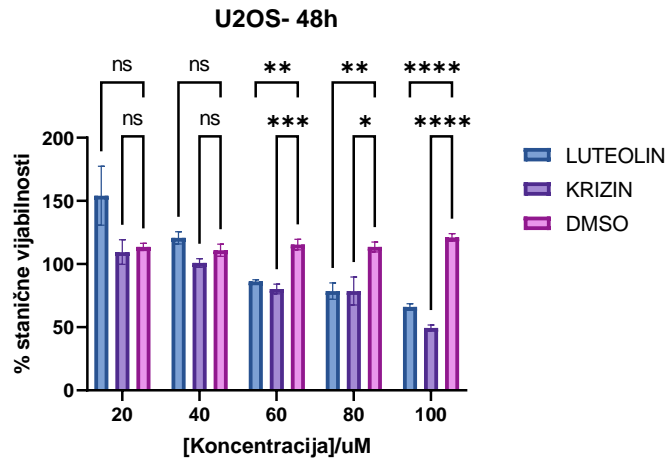
Rezultati su analizirani pomoću GraphPad programa. Brojčani podaci prikazani su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Testiranje značajnosti promjena među staničnim linijama provedeno je pomoću statističkog testa analize varijance dvosmjerna ANOVA na razini značajnosti od $p < 0,05$. Pomoću tog testa htjela se vidjeti statistička značajnost djelovanja luteolina i krizina na sve tri stanične linije obzirom na vrijeme i koncentraciju.

4. REZULTATI

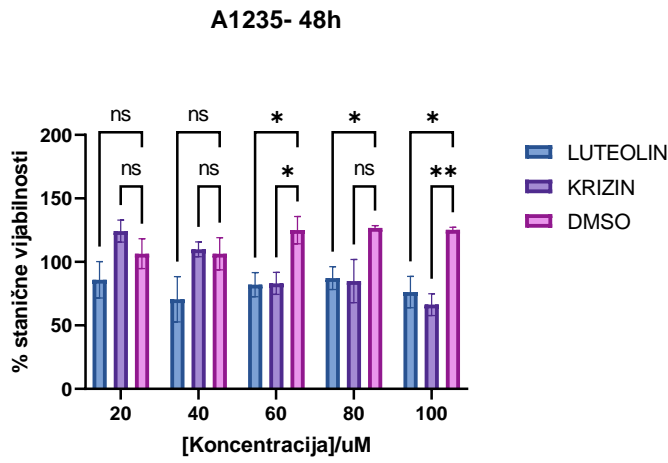
4.1. Procjena vijabilnosti stanica MTT testom

Učinak luteolina i krizina na vijabilnost tumorskih stanica U2OS, A1235 i zdravih stanica HEK293 testiran je s rastućim koncentracijama spojeva 20, 40, 60, 80 i 100 μ M tijekom 24, 48 i 72h. Učinak spojeva na staničnu vijabilnost određena je uz pomoć MTT testa. Luteolin i krizin imali su značajan inhibitorski učinak na rast stanica, koji je ovisio o koncentraciji i vremenu tretmana. Nakon 24h tretmana, međutim, nije bilo mjerljivog učinka na stanice tretirane luteolinom i krizinom obzirom na kontrolu DMSO, ali obzirom na negativnu kontrolu (100%) sva tri spoja, luteolin, krizin, DMSO, potaknuli su proliferaciju zdravih stanica HEK293. Značajni učinak na vijabilnost izmjeren je nakon 48 i 72h tretmana (Slika 24.). Oba spoja su značajno inhibirali rast stanica U2OS i A1235 pri koncentracijama 60 i 100 μ M nakon 48h tretmana. Pri koncentraciji 80 μ M luteolin je smanjio vijabilnost obje stanične linije, dok krizin nije imao učinka na vijabilnost A1235 u usporedbi s kontrolom (DMSO). Luteolin i krizin u 48h tretmanu nisu pri testiranim koncentracijama pokazali značajan učinak na zdrave stanice HEK293.

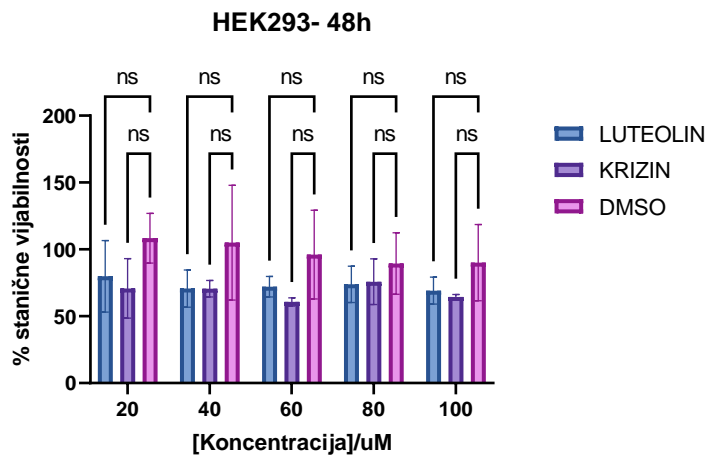
Tijekom 72h tretmana, luteolin u koncentraciji 40 μ M te luteolin i krizin pri koncentracijama 60, 80 i 100 μ M, značajno su smanjili vijabilnost stanica tumora U2OS u odnosu na kontrolu (DMSO). Citotoksično djelovanje pokazala su oba spoja pri koncentraciji 80 μ M, dok je pri 100 μ M značajan utjecaj na pad vijabilnosti A1235 imao samo krizin. Na zdravim stanicama HEK293 inhibitorski je djelovao luteolin pri koncentraciji 60 μ M.



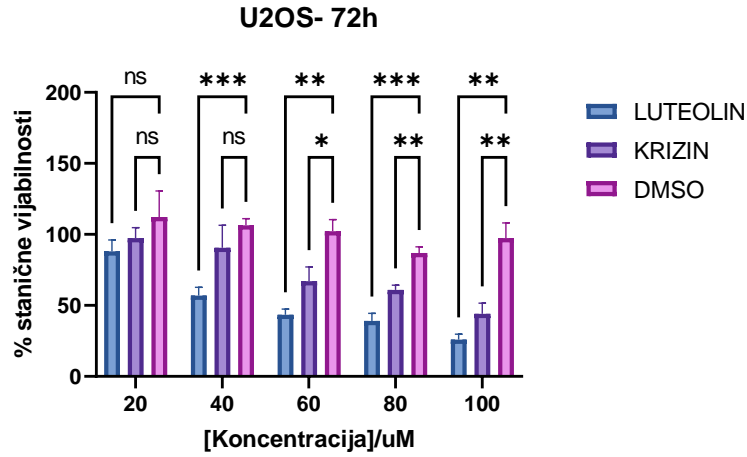
A.



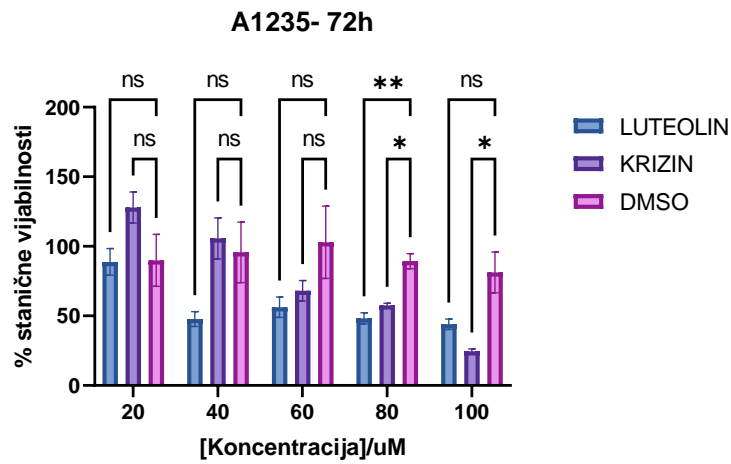
B.



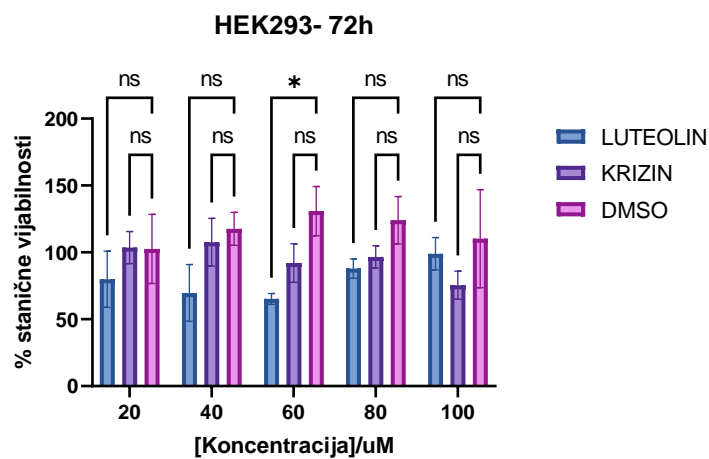
C.



D.



E.



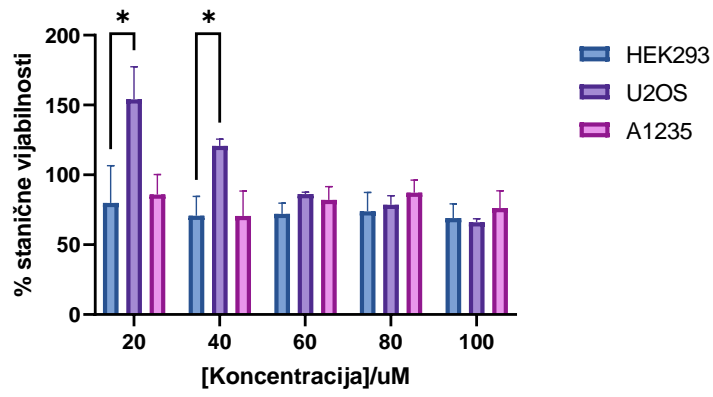
F.

Slika 24. Rezultati MTT testa nakon 48h (paneli A-C) i 72h (paneli D-F) tretmana tumorskih staničnih linija U2OS i A1235 te zdrave stanične linije HEK293 spojevima luteolin i krizinin u rastućim koncentracijama (20, 40, 60, 80, 100µM). DMSO je korišten kao kontrola. Svi podaci su normalizirani prema negativnoj kontroli te su prikazani kao srednja vrijednost stanične vijabilnosti iskazana u postotku u odnosu na negativnu kontrolu ± standardna devijacija bioloških pokusa. Negativna kontrola = 100% vijabilnosti. *Ns* $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Pojedinačni učinak luteolina i krizina na sve tri stanične linije s obzirom na vrijeme tretmana prikazano je na Slici 25 (Slika 25.). Luteolin i krizin nakon 24h tretmana nisu značajno inhibirali vijabilnost testiranih staničnih linija pri niti jednoj koncentraciji. Djelovanje spojeva, nakon 48 i 72h tretmana, praćeno je i za tumorske stanice U2OS i A1235 u usporedbi s normalnim stanicama HEK293. Luteolin je nakon 48h tretmana pri svim koncentracijama uzrokovao pad vijabilnosti s izuzetkom pri niskim koncentracijama 20 i 40 μM u kojima je inducirao vijabilnost U2OS stanica u usporedbi s HEK293. Tijekom 72h, pri 60 μM pad vijabilnosti vidljiv je na U2OS stanicama usporedno sa zdravim. Također, pri 80 i 100 μM vidljiv je značajan pad vijabilnosti kod obje tumorske stanične linije, u usporedbi sa zdravim stanicama.

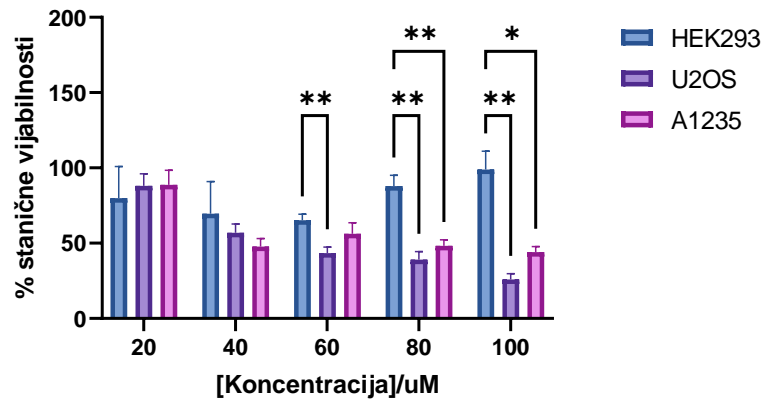
Krizin je nakon 48h tretmana pri niskim koncentracijama 20, 40, 60 μM smanjio vijabilnost zdravih HEK293 stanica. Značajan pad vijabilnosti HEK293 stanica uoćen je i pri koncentraciji 40 μM u odnosu na obje tumorske stanične linije te pri 60 μM u usporedbi s U2OS. Pri 100 μM veći pad vijabilnosti zabilježen je za U2OS u usporedbi sa zdravima. U dužem tretmanu (72h) krizin je smanjio vijabilnost pri većim koncentracijama 80 i 100 μM kod obje tumorske stanične linije.

LUTEOLIN- 48h



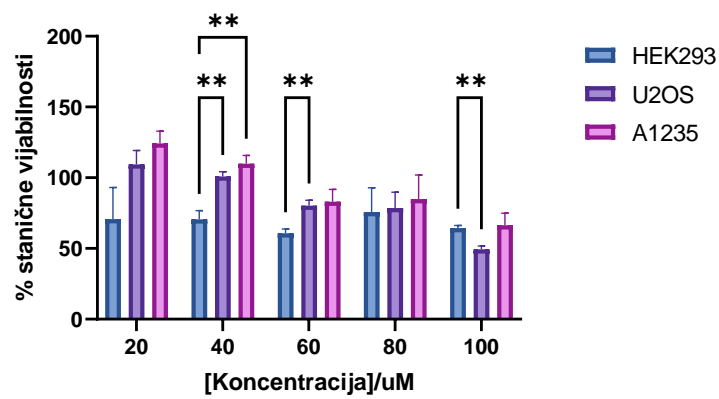
A.

LUTEOLIN- 72h

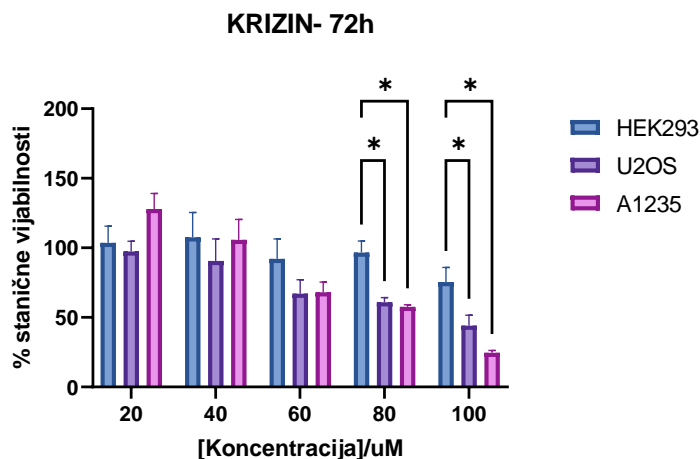


B.

KRIZIN- 48h



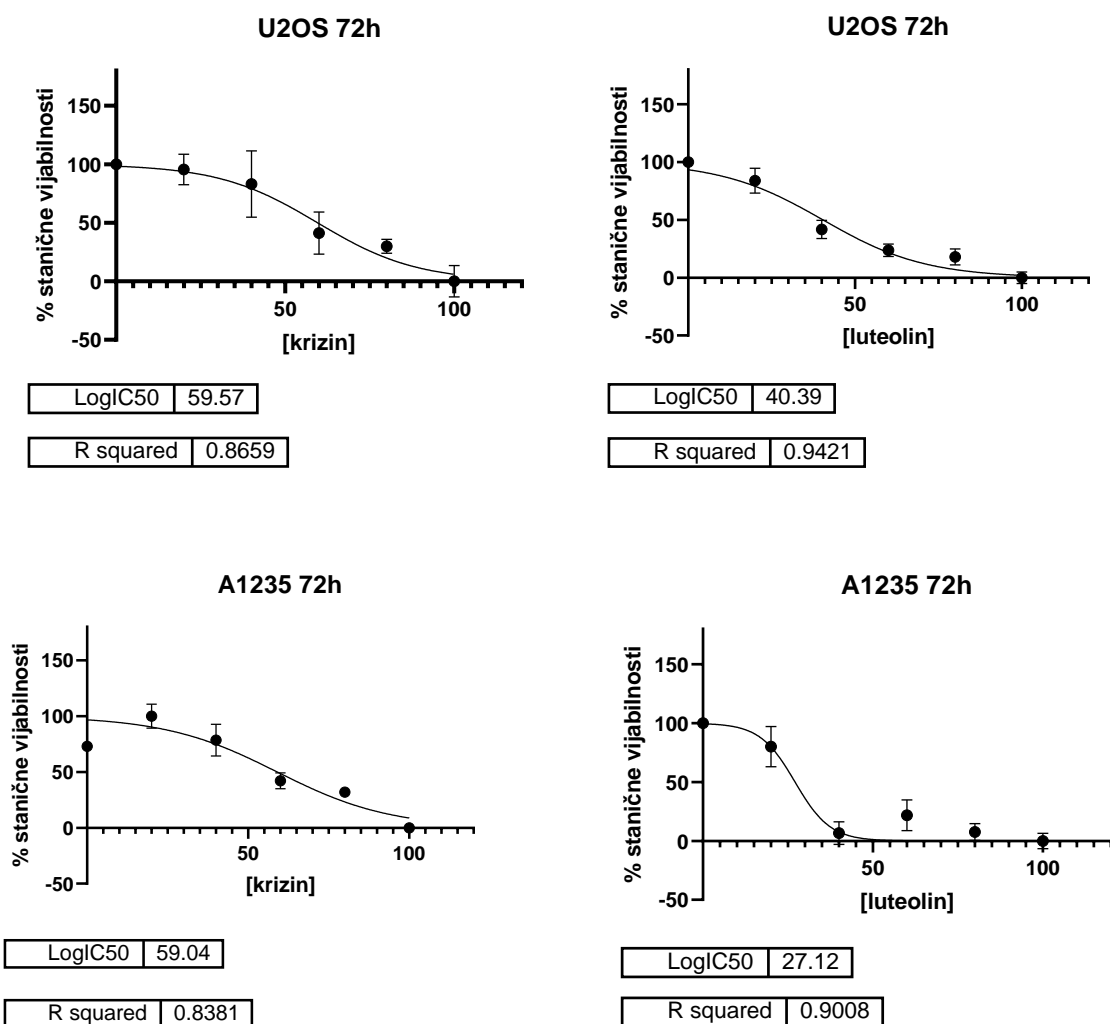
C.



D.

Slika 25. Rezultati MTT testa nakon 48h (paneli A i C) i 72h (paneli B i D) tretmana tumorskih staničnih linija U2OS i A1235 te zdrave stanične linije HEK293 spojevima luteolin i krizin u rastućim koncentracijama (20, 40, 60, 80, 100 µM). DMSO je korišten kao kontrola. Svi podaci su normalizirani prema negativnoj kontroli te su prikazani kao srednja vrijednost stanične vijabilnosti iskazana u postotku u odnosu na negativnu kontrolu ± standardna devijacija bioloških pokusa. Negativna kontrola = 100% vijabilnosti. Ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Za svaki je spoj, po očitavanju rezultata MTT testa nakon 72h, određena koncentracija pri kojoj spoj uzrokuje inhibiciju rast stanica za 50%. Dobivena vrijednost naziva se IC50 vrijednost (od eng. inhibitory concentration 50) (Slika 26.).



Slika 26. Krivulje rasta stanica A1235 i U2OS nakon 72h tretmana spojevima luteolin i krizin.

Pokazalo se kako luteolin najjače djeluje na obje tumorske stanične linije (IC_{50} (A1235) = $27,12\mu M$, IC_{50} (U2OS) = $40,39\mu M$). Krizin je imao slabije ili podjednako djelovanje na obje tumorske stanične linije (IC_{50} (A1235) = $59,04\mu M$, IC_{50} (U2OS) = $59,57\mu M$). IC_{50} vrijednost luteolina na zdrave stanice HEK293 nije se mogla odrediti, dok je krizin pri IC_{50} = $74,15\mu M$ djelovao na 50% inhibiciju rasta (Tablica 1.).

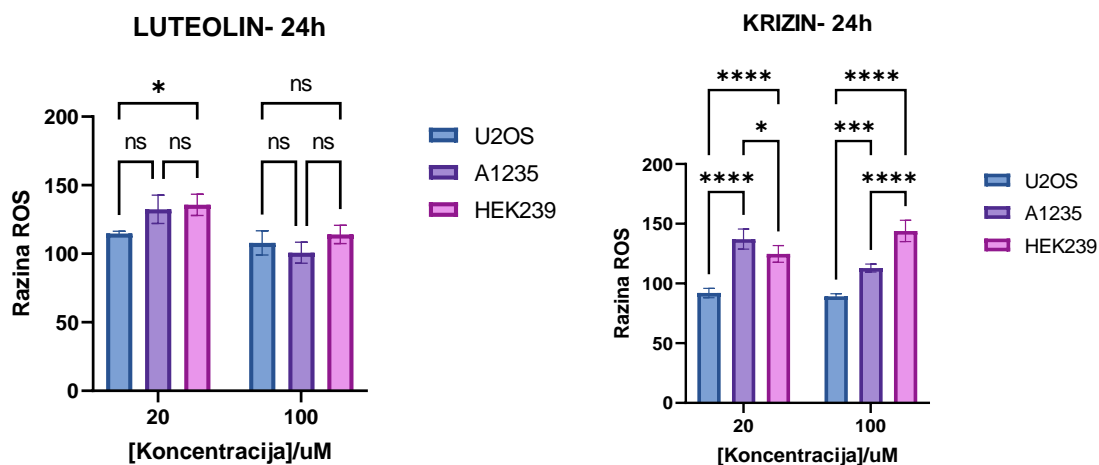
Tablica 1. IC50 vrijednosti za luteolin i krizin nakon 72h tretmana staničnih linija U2O2,A1235 i HEK293.

VRSTA STANICA	IC50 (μM)	
	Luteolin	Krizin
U2OS	40,39	59,57
A1235	27,12	59,04
HEK293	-	74,15

4.2. Procjena oksidativnog stresa

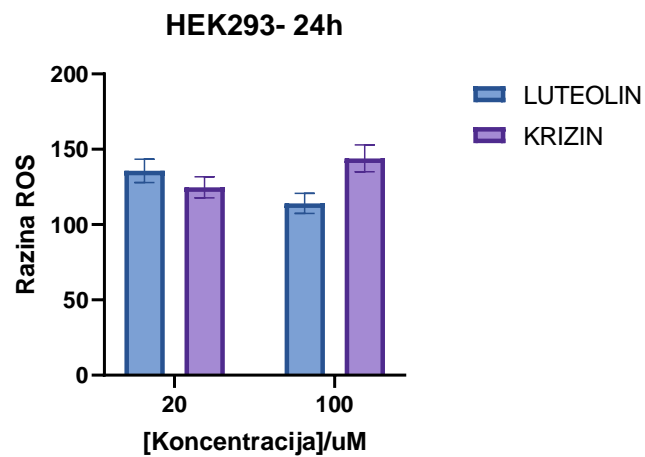
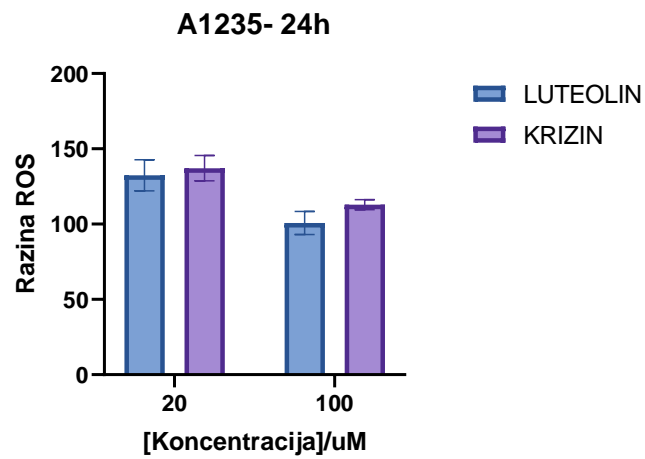
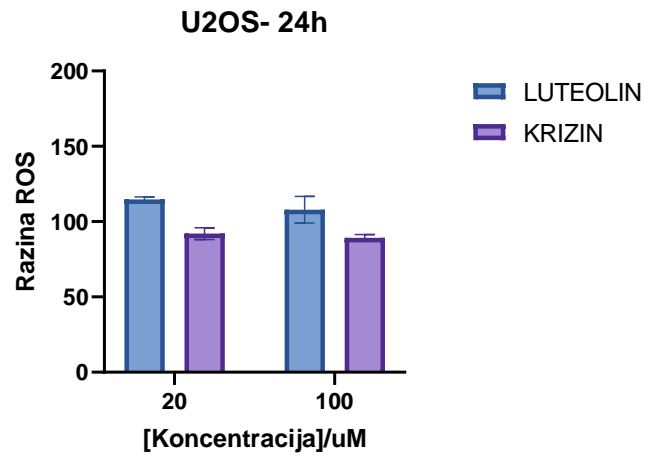
Flavonoidi se, pa tako i luteolin i krizin, smatraju antioksidansima. Razlog tomu je njihova kemijska struktura koja može neutralizirati ('hvatati') molekule ROS. Međutim, u literaturi je opisan i tzv. prooksidativni učinak ovih spojeva, osobito u tumorskim stanicama, u sklopu kojega se razina ROS povećava. Kako bismo utvrdili mehanizam antiproliferativnog učinka koji je zapažan u ovom radu, odredili smo oksidativni stres uz pomoć fluorescentne boje H2DCFDA, čija je fluorescencija bila proporcionalna proizvodnji ukupnog ROS u stanicama. Ova fluorescentna proba uglavnom detektira vodikov peroksid H₂O₂ i hidrosilne radikale te emitira fluorescenciju tek nakon formiranja diklorofluorescina. U ovom istraživanju tumorske stanične linije U2OS i A1235 i stanična linija HEK293 bile su izložene koncentracijama spojeva luteolina i krizina od 20 i 100 μM tijekom 24h (Slika 27.).

Rezultati su pokazali kako luteolin nakon 24h izaziva veći oksidativni stres pri nižoj koncentraciji (20 μM) nego pri višoj koncentraciji (100 μM), i to najviše kod netransformirane stanične linije HEK293. Krizin je u U2OS stanicama pri obje koncentracije uzrokovao pad ROS molekula. Međutim, u koncentraciji 20 μM krizin je povećao razine ROS u A1235, odnosno pri 100 μM u HEK293 stanicama.



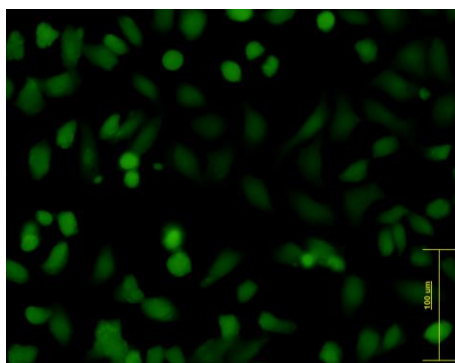
Slika 27. Prikaz rezultata indukcije molekula ROS u stanicama U2OS, A1235 i HEK293 nakon 24h tretmana luteolinom i krizinom u koncentracijama 20 i 100μM. Svi podaci normalizirani su prema negativnoj kontroli s razinom ROS 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost razine ROS ± standardna devijacija. Ns p>0.05, *p<=0.05, ** p<=0.01, *** p<=0.001, **** p<=0.0001.

Učinak testiranih spojeva prikazan je i prema vrsti stanica na slici 28. (slika 28.). Tretman luteolinom u U2OS stanicama povećao je ROS u obje koncentracije, dok krizin nije značajno utjecao na promjenu razine ROS. Pri koncentraciji 20μM oba spoja su u A1235 stanicama izazvala značajan porast razine ROS, dok pri koncentraciji 100μM nije bilo značajnih promjena. U HEK293 stanicama spojevi su povećali razine ROS, osobito luteolin pri 20μM, a krizin pri 100μM.

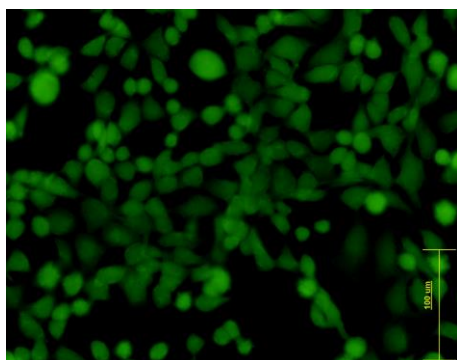


Slika 28. Prikaz rezultata indukcije molekula ROS u stanicama U2OS, A1235 i HEK293 nakon 24h tretmana luteolinom i krizinom u koncentracijama 20 i 100 μM. Svi podaci normalizirani su prema negativnoj kontroli s razinom ROS 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost razine ROS ± standardna devijacija. Ns p>0.05, *p<=0.05, ** p<=0.01, *** p<=0.001, **** p<=0.0001.

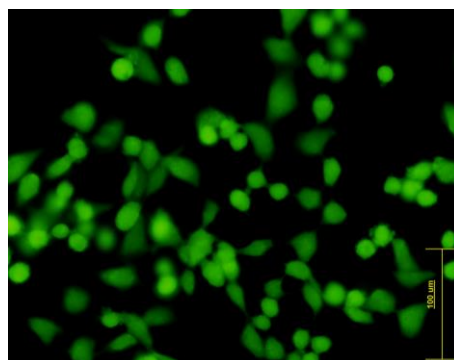
Tretman luteolinom i krizinom inducirao je stvaranje ROS molekula u stanicama, što je praćeno i pomoću mikroskopa (Olympus – DP70, Japan), a fluorescencija se «hvatala» pomoću filtera za zelenu fluorescenciju: ekspozicija 490 nm, emisija 510-570 nm (Slike 29-31). Fluorescentna boja DCFH-DA koristila se za detekciju ROS. Njezina dvostruka oksidacija uzrokuje stvaranje visoko fluorescentne DCF. Intenzitet fluorescencije DCF unutar stanice proporcionalan je količini nastalog ROS u stanicama.



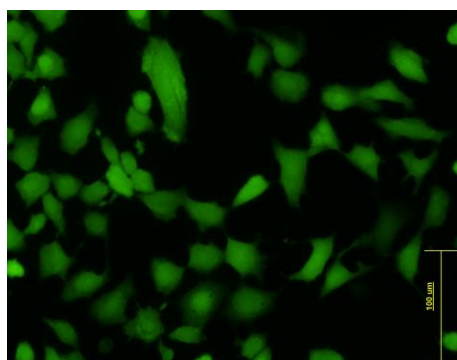
0,1% DMSO



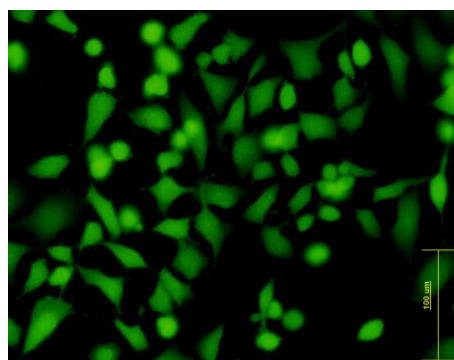
K 20 μ M



L 20 μ M

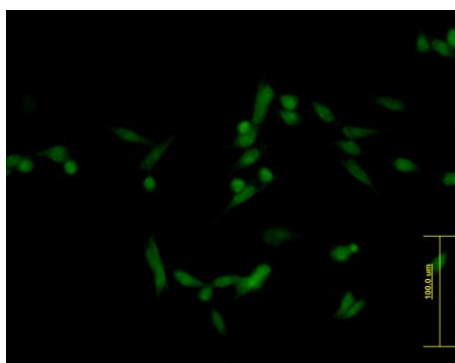


K 100 μ M

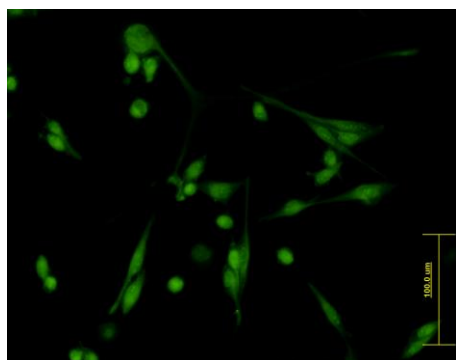


L 100 μ M

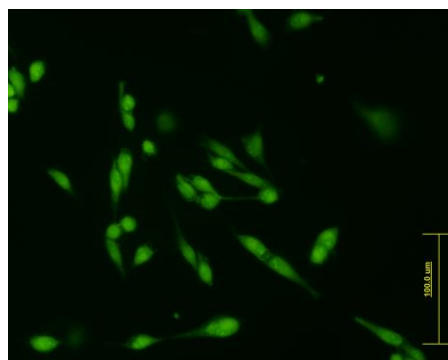
Slika 29. Procjena oksidativnog stresa u U2OS tumorskim stanicama pomoću DCFH2-DA probe. Stanice su tretirane luteolinom i krzinom (20 i 100 μ M) tijekom 24 h. 0,1% DMSO se koristio kao kontrola. Stanice su slikane uz pomoć mikroskopa (Olympus- DP70, Japan) pod povećanjem 200x, na ekspoziciji 1/10. filtar za zelenu fluorescenciju: ekspozicija 490 nm, emisija 510-570 nm.



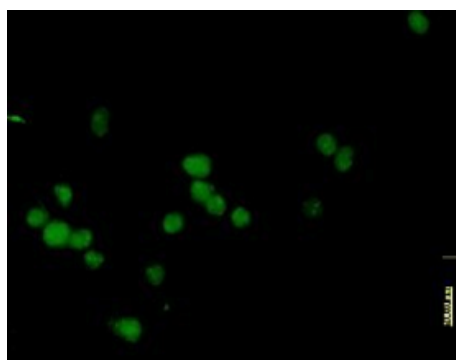
0,1% DMSO



K 20 μ M



L 20 μ M

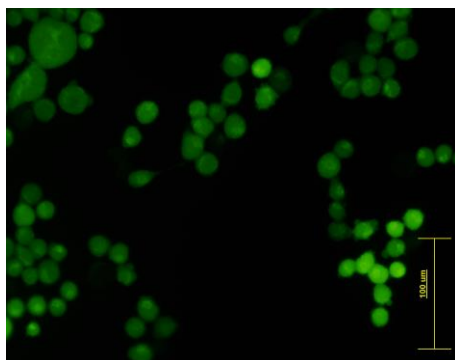


K 100 μ M



L 100 μ M

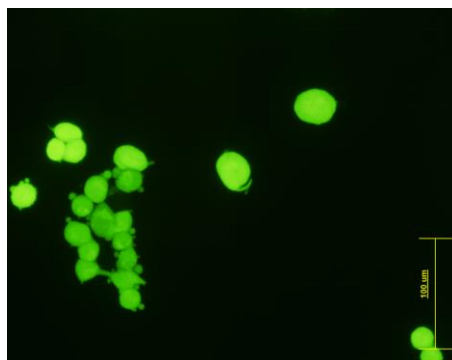
Slika 30. Mikroskopski prikaz rezultata procjene oksidativnog stresa, pomoću DCFHDA boje, na A1235 tumorskim stanicama. Stanice su tretirane luteolinom i krzinom (20 i 100 μ M) tijekom 24 h. 0,1% DMSO se koristio kao kontrola. Stanice su se gledale mikroskopom (Olympus- DP70) na povećanju 200x, na ekspoziciji 1/10, filter za zelenu fluorescenciju: ekspozicija 490 nm, emisija 510-570 nm.



0,1% DMSO



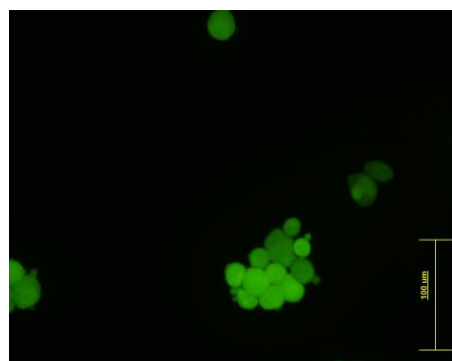
K 20 μM



L 20 μM



K 100 μM



L 100 μM

Slika 31. Mikroskopski prikaz rezultata procjene oksidativnog stresa, pomoću DCFHDA boje, na HEK293 zdravim stanicama. Stanice su tretirane luteolinom i krzinom (20 i 100 μM) tijekom 24 h. 0,1% DMSO se koristio kao kontrola. Stanice su se gledale mikroskopom (Olympus- DP70) na povećanju 200x, na ekspoziciji 1/10. filter za zelenu fluorescenciju: ekspozicija 490 nm, emisija 510-570 nm.

5. RASPRAVA

Maligna oboljenja svrstavaju se među najsmrtonosnije bolesti diljem svijeta. Glioblastom je najzastupljeniji i najletalniji intrakranijalni tumor, dok je osteosarkom najčešći primarni zloćudni tumor kostiju i drugi najletalniji tumor u djece i adolescenata. Ova dva oblika malignih oboljenja karakteriziraju invazivnost i metastaziranje u okolno tkivo te, posljedično, i velika smrtnost (82, 83). Unatoč velikom napretku medicine u uspješnosti liječenja malignih oboljenja i dalje je postotak smrtnosti oboljelih visok, što se pripisuje nezadovoljavajućem odgovoru na propisanu terapiju. Konvencionalna terapija bolesnika s recidivirajućim ili metastatskim osteosarkomom ili bolesnika s glioblastomom ima ograničeno djelovanje i ozbiljne nuspojave koje su rezultat nespecifičnog djelovanja lijekova i nespecifičnog djelovanja na sve stanice a ne samo one tumorske (48). Jedan od najopasnijih problema koji se javlja uslijed konvencionalnog liječenja je razvoj rezistencije na terapiju i recidiviranja bolesti. Stoga je važno i dalje razvijati nove preventivne i terapijske proizvode i lijekove usmjerene protiv raka (82). Budući da prehrambene navike i stil života značajno utječu na pojavu i progresiju raka, istraživanja su pokazala kako su flavonoidi, zastupljeni u svakodnevnoj prehrani, potencijalni kandidati za zaustavljanje i usporavanje progresije maligne transformacije. Smatra se da je prednost takvih spojeva, u odnosu na trenutno primjenjivane kemoterapeutske pripravke, njihova visoka razina sigurnosti prilikom primjene. Karakteristike koje bi idealni kemopreventivni spoj trebao imati su netoksičnost, oralna primjena, visoka učinkovitost, laka dostupnost i prihvatljiva cijena (84).

Luteolin i krizin značajni su prirodni spojevi koji spadaju u skupinu flavonoida prisutnih u raznom voću i povrću. Luteolin je važna fitokemikalija. Među povrćem najviše je zastupljen u radiču 37.96 ± 0.10 i kineskom celeru 34.87 ± 0.04 mg/100 g. Origano je najveći izvor luteolina među začinima 1,08.75 mg/100 g, a svježa kadulja, 16.70 mg/100 g, i limun bez kore, 1.50 mg/100 g, također su jako dobar izvor luteolina (85). Krizin je, nadalje, prirodni spoj koji se može sintetizirati nizom enzimatskih reakcija iz aminokiseline fenilalanin. Prisutan je u mnogim biljnim ekstraktima uključujući propolis, plavi cvijet pasijonke te u medu (86). Oba su ova flavonoida poznata zbog svoje sposobnosti »hvatanja« slobodnih radikala te protuupalnog, antitumorskog, antiproliferativnog i antioksidativnog djelovanja, što je dokazano u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama (87, 88, 89, 90, 91).

In vitro istraživanja, provedena na različitim tumorskim stanicama, pokazala su kako flavonoidi imaju značajan inhibitorni učinak na rast stanica tumora prostate, pluća, kolona. Međutim, malo je istraživanja učinaka luteolina i krizina provedenih na stanicama tumora osteosarkoma i glioblastoma. S obzirom na obećavajući protutumorski učinak flavonoida, koji mogu biti korisni u liječenju raka, cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak luteolina i krizina kao potencijalnih sredstava za tretman osteosarkoma i glioblastoma u uvjetima *in vitro* (92).

U ovom *in vitro* istraživanju koristile su se stanice tumora osteosarkoma U2OS i glioblastoma A1235 te nemaligne embrionalne stanice bubrega HEK293 kao kontrola. Pratila se vijabilnost stanica tretiranih različitim koncentracijama luteolina i krizina (20, 40, 60, 80, 100 μM) 24, 48 i 72h. Iz rezultata MTT testa vidi se kako krizin i luteolin imaju selektivni antiproliferativni učinak na ciljne tumorske stanice, u odnosu na zdrave HEK 293, pri tretmanu od 48h i 72h, s izuzetkom luteolina pri 60 μM u tretmanu 72h na HEK293 stanicama gdje je značajno inhibirao vijabilnosti netransformiranih stanica u odnosu na kontrolni spoj DMSO. Oba spoja inhibiraju rast tumorskih stanica U2OS i A1235 u ovisnosti o vremenu i koncentraciji tretmana. Luteolin je jače inhibitorno djelovao na obje tumorske stanične linije. Istraživanje je pokazalo i kako luteolin i krizin pri većim koncentracijama (80 i 100 μM) i dužem tretmanu (72h) jače inhibitorno djeluju na rast stanica tumora U2OS i A1235. Tretman s oba spoja, pri 24h izloženosti, nisu značajno utjecali na pad vijabilnosti stanica tumora, već na rast vijabilnosti nemalignih stanica HEK293.

Rezultate ovog istraživanja potvrđuju i druge studije provedene na staničnim linijama tumora glioblastoma U251MG i U87MG u kojima je nakon 48h tretmana luteolinom u koncentracijama 5, 10, 20, 40, 80 μM došlo do pada vijabilnosti u ovisnosti o dozi. U istoj studiji luteolin nije djelovao na vijabilnost zdravih vaskularnih endotelnih stanica miša pri koncentraciji do 40 μM (82). Inkubacija tumorskih stanica kolona HT-29, nakon 48h tretmana luteolinom, uzrokovao je pad vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije. Utjecaj na zdrave stanice kolona (FHC) nije bio značajan (70). Krizin je selektivno inhibirao rast tumorskih stanica prostate u ovisnosti o dozi, dok isti učinak nije zabilježen na zdravim urotelnim stanicama (77). Slično tomu, netransformirane zdrave stanice, primjerice fibroblasti i epitelne stanice, bile su otpornije na antiproliferativni učinak krizina u odnosu na maligne.

Mnogo je dokaza kako u *in vitro* uvjetima primjena fenolnih spojeva, izoliranih iz različitih biljaka, ima antioksidativno djelovanje. Hvatanje radikalnih iona razlikuje se s obzirom na kemijsku sturkturu, hidrofobnost, biološku i oksidativnu aktivnost (93). Međutim, dokazano je da fenolni spojevi općenito mogu imati i tzv. prooksidativni učinak koji inducira nakupljanje molekula ROS, specifično u tumorskim stanicama. Za stanice raka karakteristično je da proizvode veću količinu ROS i podnose veću neravnotežu antioksidativnog statusa u usporedbi sa zdravim stanicama. Zbog toga stanice tumora ne podnose povećanje razina ROS, što je za njih toksično i vodi u staničnu smrt. Proučavanje mehanizma djelovanja tretmana fenolnim spojevima s obzirom na djelovanje na ROS molekule važno je u razvoju novih, potencijalno djelotvornih i specifičnih terapijskih pristupa u liječenju raka. Neki standardni kemoterapeutici također djeluju i na razini ROS molekula, poput cipsplatine i paklitakela (82).

Prirodni spojevi, koji imaju sposobnost induciranja nakupljanja ROS, npr. flavon baikalein djeluje protutumorski na stanice tumora mjehura u uvjetima *in vitro* (94) Krizin, nadalje, povećava razine ROS u stanicama tumora T24 tijekom 24h tretmana u ovisnosti o koncentraciji (77). U ovom radu slično je praćena razina ROS u stanicama nakon tretmana luteolinom i krizinom tijekom 24h. Luteolin je djelovao kao prooksidans s obzirom da je inducirao povećanje razine ROS na stanicama tumora U2OS, pri obje koncentracije (20 i 100 μ M). Krizin je pak imao blago antioksidativno djelovanje. Na drugoj staničnoj liniji tumora A1235 pri nižoj koncentraciji 20 μ M luteolin je djelovao prooksidativno, a pri većoj (100 μ M) nije imao učinak na razine ROS. Dok je krizin pri obje koncentracije (20 i 100 μ M) djelovao prooksidativno, znatno veći učinak vidio se pri nižoj koncentraciji 20 μ M. Zanimljivo je istaknuti kako su oba spoja na zdravim HEK293 stanicama izazvali znatno nakupljanje ROS pri obje koncentracije, a najveće razine ROS utvrđene su u tretmanu s krizinom pri većoj koncentraciji (100 μ M). S obzirom da su ROS molekule normalni medijatori staničnih procesa, pa tako i njihove proliferacije, u zdravim stanicama, ovaj rezultat na HEK293 bio je očekivan (26). ROS su izuzetno reaktivne molekule koje mogu mijenjati tijekom staničnih procesa s obzirom na njihovu razinu. Rezultati tretmana stanica luteolinom i krizinom ukazuju kako je razina ROS direktno proporcionalna s vijabilnosti stanica, odnosno može se zaključiti da je antiproliferativni učinak spojeva povezan s razinama ROS nakon 24h tretmana.

Djelovanje na signalne putove tumorskih stanica, u terapiji raka, promjenom količine ROS molekula podrazumijeva remećenje protumorske signalizacije. Stoga je protutumorsko

djelovanje preko ROS molekula vezano uz povećavanje razina ROS molekula s ciljem induciranja toksičnosti na stanice, odnosno, iskorištavanje antioksidativnog kapaciteta s ciljem pokretanja apoptoze. Suprotno tomu, inhibicija stvaranja ROS molekula u tumorskim stanicama mogla bi u određenim tumorskim stanicama djelovati kao potiskivanje protumorigene signalizacije. Smanjenje nakupljanja ROS molekula može dovest do smanjenja proliferacije i preživljavanja stanica tumora, smanjene potrebe za metaboličkom adaptacijom i smanjenja oštećenja DNA molekula i genske nestabilnosti (95). Prooksidativno djelovanje flavonoida povezano je sa sposobnošću prolaska kroz autooksidaciju kataliziranu prijelaznim metalima, pri čemu nastaje superoksidni anion, dok druga saznanja ukazuju kako se fenolni prstenovi metaboliziraju djelovanjem peroksidaze te stvaraju prooksidativne fenolne radikale koji su dovoljno reaktivni da kooksidiraju s glutationom (GSH) ili nikotinamid-adenin vodikom (NADH) što je popraćeno velikim unosom kisika i produkcijom ROS (3).

Krizin i luteolin su prema literaturnim podacima spojevi širog spektra djelovanja na molekularne mehanizme, uključujući i one u tumorskim stanicama. Pad vijabilnosti stanica tumora U2OS i A1235 moguće je pripisati indukciji apoptoze. Apoptoza je proces programirane stanične smrti koji pokreću različiti signali unutar i izvan stanice te ima bitnu ulogu u rastu i razvoju stanica. Poznato je da je apoptoza važan mehanizam djelovanja kemoterapeutika pa tako i flavonoida. Unutarnji i vanjski put apoptoze istraženi su kao glavni mehanizmi djelovanja u tretmanu tumorskih stanica flavonoidima. Flavonoidi mogu utjecati na neravnotežu homeostaze mitohonrija i ER, čime se inducira apoptoza (73). To potvrđuje i istraživanje u kojem je luteolin, kao potencijalni kemoterapijski agens, inducirao apoptozu stanica raka glioblastoma *in vitro* i *in vivo* potičući stres endoplazmatskog retikula i poremećaj u funkciji mitohondrija (82). Luteolin može inhibirati rast različitih stanica raka, primjerice hepatocelularnog karcinoma, kolorektalnog karcinoma i karcinoma gušterače, aktivacijom kaspaze-3 i povećanja ekspresije Bax uz smanjenje razine BCL-2 proteina (83). Zabilježeno je da se antitumorsko djelovanje krizina postiže indukcijom apoptoze preko kaspaze-3 i kaspaze-9, ali ne i indukcijom kaspaze-8. Povećava se također ekspresija proapoptotičkih proteina Bax, što ukazuje na pokretanje unutarnjeg puta apoptoze. Slični rezultati dobiveni su i na stanicama hepatocelularnog karcinoma i karcinoma pluća (77). Mnoga istraživanja na stanicama tumora dojke, kolona, prostate, pluća pokazala su da flavonoidi mogu inducirati apoptozu i zaustaviti stanični ciklus u fazi G2/M tako što se inducira ekspresija p21 i p53 (88). Mogući mehanizam inhibicije rasta tumorskih stanica su i autofagija (73) te stres endoplazmatskog retikuluma, gdje

je zabilježeno kako krizin povećava razine proteina koji su rani glasnici ER stresa (77). Istraživanja sugeriraju kako se luteolin može primjenjivati kao terapijska strategija za učinkovito upravljanje stanica melanoma u uvjetima *in vitro* (A2058), gdje učinkovito povećava ER stres i razinu Ca²⁺ u mitohondiju, čime se inducira apoptoza. Prijelaz kalcija između mitohondrija i ER ima bitnu ulogu u staničnoj signalizaciji i regulaciji metabolizma i indukcije smrti stanice (96).

Primjena flavonoida, luteolina i krizina mogla bi biti korisna i u sprječavanju kemorezistencije. Glavni problem primjene kemoterapije je, naime, razvijanje rezistencije tumorskih stanica na određeni kemoterapeutik (73). Povećane razine ROS mogu poticati staničnu proonkogenu signalizaciju, što vodi do rezistencije na osobito lijekove i daljnju progresiju raka (95). Na temelju biološke aktivnosti prirodni spojevi u liječenju tumora mogu stanice tumora učiniti osjetljivijima na kemoterapiju. Zato se često intenzivno i primjenjuju s kemoterapijskim sredstvima. Krizin se tako često primjenjuje zajedno sa standardnim kemoterapeutikom cisplatinom povećanjem otpornosti na razvoj rezistencije. Specifično, krizin smanjuje razine Nrf2, čimbenika koji je u molekularnoj podlozi kemorezistencije (73).

Unatoč velikim naporima znanstvenika, koji su usmjereni na razumijevanje složenosti karcinogeneze i uključenih signalnih puteva u malignim oboljenjima s ciljem pronalaska učinkovitije i selektivno toksične terapije, razvoj novih terapeutika u liječenju raka i dalje su veliki izazov. Iako su u posljednjih nekoliko godina fitokemikalije priznate kao važan doprinos antitumorskoj terapiji, većina flavonoida još uvijek je u ranoj fazi kliničkih ispitivanja. Osobito su tome razlog podaci o niskoj topivosti, apsorpciji te vrlo brzom metabolizmu koji zahtijevaju dodatna istraživanja vezana uz učinkovitu primjenu i sigurnost (97). Potrebno je provesti i dodatna istraživanja s obzirom na moguću interakciju prirodnih spojeva s određenim standardno korištenim lijekovima.

Kako bi se postigla maksimalna iskoristivost prirodnih spojeva u kemopreventivnom djelovanju, razvile su se nove metode kojima se kani postići veća biološka dostupnost spojeva te smanjiti eventualna toksičnost. Osobito je u tom kontekstu važna nanotehnologija koja predstavlja novo područje istraživanja te se može primjenjivati u različitim područjima dijagnostike i terapije raka (84). Primjerice, nanonosači mogu povećati bioraspoloživost

prirodnih spojeva, što je pokazano u različitim istraživanjima provedenim *in vitro* i *in vivo*-primjerice na stanicama raka pluća A549, melanoma B16F10 i dojke MCF-7. Trenutno je prisutno nekoliko vrsta nanonosaa flavonoida koji se koriste u terapiji raka kao što su polimerne nanočestice, nanokapsule, metalne nanočestice i čvrsti lipidni nanonosai (97). Zamisao da se tretman liječenja sastoji od kemoterapijskog lijeka zajedno s antitumorskom komponentom leži u tome da je takva kombinacija izuzetno bitna za specifično ciljanje tumorskih stanica kemoterapijom. Nanočestice mogu osigurati antitumorski učinak lijeka time što omogućavaju specifičnu dostavu lijeka samo u stanice tumora, pa time i bolju akumulaciju i učinak u ciljnim tumorskim stanicama. Štoviše, zbog male veličine, nanočestice lakše ulaze u stanice i izbjegavaju makrofage i bubrežnu filtraciju (73). Usprkos tomu, nanočestice mogu biti toksične, akumulirati se u tijelu, pa je ovo područje istraživanja, što uključuje i nanodostavu flavonoida u tumore uz pomoć nanočestica, još u razvoju te se moraju provesti mnoga dodatna istraživanja vezana uz bolje razumijevanje učinkovitosti i toksičnosti takvih nanočestica.

Zaključno, dobiveni rezultati pokazuju kako postoji potencijal korištenja luteolina i krizina u terapiji osteosarkoma i glioblastoma iako su potrebna dodatna opsežna istraživanja sa svrhom boljeg razumijevanja mehanizma protutumorskog djelovanja ovih spojeva. Dobiveni rezultati ovog *in vitro* istraživanja mogu poslužiti daljnjim studijama koja za cilj imaju razvoj novih terapijskih pristupa malignim oboljenjima.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitani su učinci flavonoida luteolina i krizina na vijabilnost stanica tumora osteosarkoma U2OS i glioblastoma A1235 u uvjetima *in vitro* u usporedbi s nemaligim embrionalnim stanicama bubrega HEK293. Njihov je učinak ispitan u rastućim koncentracijama spojeva 20, 40, 60, 80 i 100 μM tijekom 24h, 48h i 72h tretmana. Uz antiproliferativni učinak spojeva praćen je i učinak na oksidativni stres tijekom 24h mjerenjem razina ukupnog ROS u stanicama. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti kako:

- Luteolin i krizin povećavaju vijabilnost nemalighnih stanica HEK293 nakon 24h tretmana pri svim testiranim koncentracijama (luteolin u rasponu 50,57 - 91,23%), (krizin u rasponu 29,77 - 97,70%), dok u tretmanu 48h i 72h nije bilo značajnog učinka na vijabilnost stanica.
- Luteolin i krizin nisu značajno utjecali na vijabilnost tumorskih stanica U2OS i A1235 tijekom tretmana od 24h.
- Učinak luteolina i krizina na pad vijabilnosti tumorskih stanica U2OS i A1235, ovisi o duljini vremena izloženosti i o koncentraciji, pri čemu luteolin i krizin smanjuju vijabilnost tumorskih stanica U2OS i A1235 u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) nakon 48h i 72h tretmana. Rasponi inhibicije u tretmanu luteolinom su: nakon 48h za stanice U2OS 13,83 - 33,94%, za stanice A1235 12,77 - 29,44%; nakon 72h za stanice U2OS 11,93 - 74,08%, za stanice A1235 11,18 - 56,00%. Rasponi inhibicije u tretmanu krizinom su: nakon 48h za stanice U2OS 19,73 - 50,59%, za stanice A1235 15,13 - 33,65%; nakon 72h za stanice U2OS 2,25 - 55,88%, za stanice A1235 31,91 - 75,39%.
- Pri tretmanu 72h spojevi su djelovali inhibitorno na sve stanice pri svim koncentracijama u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) osim krizina koji je u nižim koncentracijama (20, 40 μM) poticao proliferaciju A1235 u rasponu 5,67 - 27,86%.
- Pri tretmanu od 48h spojevi su pri nižim koncentracijama (20, 40 μM) povećali proliferaciju stanica. Luteolin je povećao rast stanica U2OS u rasponu 20,84-54,06%, a krizin 0,85-9,48%. Krizin je povećao rast stanica A1235 za 9,85-24,25%, dok luteolin nije povećao rast stanica A1235 pri nižim testiranim koncentracijama (20, 40 μM).

- Luteolin je jače inhibirao rast stanica U2OS i A1235, pri čemu su IC_{50} (A1235)= 27,12 μ M te IC_{50} (U2OS)= 40,39 μ M. Za krizin su vrijednosti IC_{50} (A1235)= 59,04 μ M, odnosno IC_{50} (U2OS)= 59,57 μ M.
- Luteolin i krizin inducivali su stvaranje molekula ROS u ovisnosti o koncentraciji i tipu stanica. Najveće razine ROS izmjerene su u nemalignim stanicama HEK293 u tretmanu krizinom pri 100 μ M (43,95%) i luteolinom pri 20 μ M (35,70%).
- Učinak luteolina i krizina na pad vijabilnosti stanica bio je proporcionalan razini proizvedenog ROS, što ukazuje kako je indukcija ROS važan mehanizam antiproliferativnog učinka luteolina i krizina na stanice U2OS i A1235.

7. LITERATURA

1. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija; Biologija raka. Drugo izdanje; 2013. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. 1–2.
2. Fouad Y.A., Aanei C. Review Article- Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2017;7(5):1016–36.
3. Lin Y, Shi R, Wang X, Shen H-M. Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *National Institutes of Health*. 2008;8(7):634–46.
4. Cooper Geoffrey M. *The Cell- A Molecular Approach*. 2000. 523–524.
5. Aleem E, Arceci RJ. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015;3.
6. Fleisch MC, Maxwell CA, Barcellos-Hoff M-H. The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocrine-Related Cancer*. 2006;13(2).
7. Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, et al. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Research*. 2018;6(1).
8. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*. 2010;31(6).
9. Labar B, Sertić D, Davidović S, suradnici. Dijagnostičko-terapijski pristup u bolesnika s Philadelphia pozitivnom kroničnom mijeloičnom leukemijom – Smjernice Hrvatske kooperativne grupe za hematoloških bolesti (Krohem). *Medicina Fluminensis*. 2011;47(4):404–6.
10. Cortes J, Silver RT, Kantarjian HM. Chronic myeloid leukemia. *Oncohematol Key*. 2017.
11. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(4):813–25.
12. Jurić V. Tumor supresorski geni i mehanizmi popravka oštećene DNA u stanicama tumora. [Zagreb]; 2017.
13. Dyson NJ. RB1 : a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes & Development*. 2016;30(13).
14. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & Cancer*. 2011;2(4).
15. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 2009;19(5).
16. Uloga čimbenika induciranih hipoksijom u tumorigenezi. *Znanstveni časopisi*. 2019.
17. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Letters*. 2008;266(1).
18. Kuczynski EA, Vermeulen PB, Pezzella F, Kerbel RS, Reynolds AR. Vessel co-option in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(8).

19. He B, Ganss R. Modulation of the Vascular-Immune Environment in Metastatic Cancer. *Cancers*. 2021;13(4).
20. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*. 2011;278(1).
21. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*. 2010;7;44(5).
22. Toehawng L, Deng S, Pervaiz S, Yap CT. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion*. 2013;13(3).
23. Aggarwal V, Tuli H, Varol A, Thakral F, Yerer M, Sak K, et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*. 2019;9(11).
24. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2015;30(1).
25. Perillo B, di Donato M, Pezone A, di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020;52(2).
26. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013;12(12).
27. Filomeni G, de Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death & Differentiation*. 2015;22(3).
28. Yoboue ED, Sitia R, Simmen T. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death & Disease*. 2018;9(3).
29. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020;38(2).
30. Shin J, Song M-H, Oh J-W, Keum Y-S, Saini RK. Pro-oxidant Actions of Carotenoids in Triggering Apoptosis of Cancer Cells: A Review of Emerging Evidence. *Antioxidants*. 2020;9(6).
31. Chiu J, Dawes IW. Redox control of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*. 2012;22(11).
32. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*. 2019;25.
33. Sahan AZ, Hazra TK, Das S. The Pivotal Role of DNA Repair in Infection Mediated-Inflammation and Cancer. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9.
34. Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays in Biochemistry*. 2018;62(5).
35. Renthal W. Cancer and the role of cell cycle checkpoints. *International Journal of Excellence in Undergraduate Research*. 2002;1:1--7.
36. Žlender V. APOPTOZA – PROGRAMIRANA SMRT STANICE. Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb. 2003;54:267–74.

37. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016;1863(12).
38. Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;23(2).
39. Paparić LL. *Autofagija i tumori [Zagreb]*; 2021.
40. Yun HR, Jo YH, Kim J, Shin Y, Kim SS, Choi TG. Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(9).
41. Okamoto K. Organellophagy: Eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *Journal of Cell Biology*. 2014;205(4).
42. Maier H, Britton P. Involvement of Autophagy in Coronavirus Replication. *Viruses*. 2012;4(12).
43. Campisi J. Aging and Cancer: The Double-Edged Sword of Replicative Senescence. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1997;45(4).
44. Zhu M-J, Wang X, Shi L, Liang L-Y, Wang Y. Senescence, oxidative stress and mitochondria dysfunction. *Medical Research and Innovations*. 2018;2(4).
45. Pole A, Dimri M, P. Dimri G. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Molecular Science*. 2016;3(3).
46. Carbone A. Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers*. 2020;12(4).
47. Misaghi A, Goldin A, Awad M, Kulidjian AA. Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT-J*. 2018;4.
48. Wang S, Li H, Chen S, Wang Z, Yao Y, Chen T, et al. Andrographolide induces apoptosis in human osteosarcoma cells via the ROS/JNK pathway. *International Journal of Oncology*. 2020.
49. Niu J, Yan T, Guo W, Wang W, Zhao Z. Insight Into the Role of Autophagy in Osteosarcoma and Its Therapeutic Implication. *Frontiers in Oncology*. 2019;9.
50. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi MS, Simjee US. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *National Library of Medicine*. 2017;18(1):1–7.
51. Wen PY, Weller M, Lee EQ, Alexander BM, Barnholtz-Sloan JS, Barthel FP, et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncology*. 2020;22(8).
52. Brain Tumor: Types of Treatment. *Cancer.Net*. 2020.
53. Martínez Andrade K, Lauritano C, Romano G, Ianora A. Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties. *Marine Drugs*. 2018;16(5).
54. Precision Medicine in Cancer Treatment. NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2017.
55. Wittine K, Saftić L, Peršurić Ž, Kraljević Pavelić S. Novel Antiretroviral Structures from Marine Organisms. *Molecules*. 2019;24(19).
56. Nguyen NH, Ta QTH, Pham QT, Luong TNH, Phung VT, Duong T-H, et al. Anticancer Activity of Novel Plant Extracts and Compounds from *Adenosma bracteosum* (Bonati) in Human Lung and Liver Cancer Cells. *Molecules*. 2020;25(12).

57. George BP, Abrahamse H. Increased Oxidative Stress Induced by Rubus Bioactive Compounds Induce Apoptotic Cell Death in Human Breast Cancer Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019.
58. NavaneethaKrishnan S, Rosales JL, Lee K-Y. ROS-Mediated Cancer Cell Killing through Dietary Phytochemicals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019.
59. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, de Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, et al. Interfering with ROS Metabolism in Cancer Cells: The Potential Role of Quercetin. *Cancers*. 2010;2(2).
60. Kazazić P S. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Hrčak- portal hrvatskih znanstvenih i stručnih časopisa*. 2004;55(4):279–90.
61. Marko Morović. FLAVONOIDI – METABOLIČKE PROMJENE I UTJECAJ NA ENZIMSKE SUSTAVE. [Split]; 2017.
62. Ahmadi SM, Farhoosh R, Sharif A, Rezaie M. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Luteolin and Catechin. *Journal of Food Science*. 2020;85(2).
63. Moghadam ER, Ang HL, Asnaf SE, Zabolian A, Saleki H, Yavari M, et al. Broad-Spectrum Preclinical Antitumor Activity of Chrysin: Current Trends and Future Perspectives. *Biomolecules*. 2020;10(10).
64. Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, Nadeem M, Shariati MA, Khan IA, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;112.
65. Lopez-Lazaro M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2009;9(1).
66. Nabavi SF, Braidy N, Gortzi O, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M, Skalicka-Woźniak K, et al. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Research Bulletin*. 2015;119.
67. Tuorkey MJ. Molecular targets of luteolin in cancer. *European Journal of Cancer Prevention*. 2016;25(1).
68. Yang H, Liu B, Xie F, Yang W, Cao N. Luteolin induces mitochondrial apoptosis in HT29 cells by inhibiting the Nrf2/ARE signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020.
69. Ju W, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky SA, Lin Y. A Critical Role of Luteolin-Induced Reactive Oxygen Species in Blockage of Tumor Necrosis Factor-Activated Nuclear Factor- κ B Pathway and Sensitization of Apoptosis in Lung Cancer Cells. *Molecular Pharmacology*. 2007;71(5).
70. Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Hyun YJ, Park JE, Shilnikova K, et al. Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2017;51(4).
71. Raina R, Pramodh S, Rais N, Haque S, Shafarin J, Bajbouj K, et al. Luteolin inhibits proliferation, triggers apoptosis and modulates Akt/mTOR and MAP kinase pathways in HeLa cells. *Oncology Letters*. 2021;21(3).
72. Pu Y, Zhang T, Wang J, Mao Z, Duan B, Long Y, et al. Luteolin exerts an anticancer effect on gastric cancer cells through multiple signaling pathways and regulating miRNAs. *Journal of Cancer*. 2018;9(20).

73. Moghadam ER, Ang HL, Asnaf SE, Zabolian A, Saleki H, Yavari M, et al. Broad-Spectrum Preclinical Antitumor Activity of Chrysin: Current Trends and Future Perspectives. *Biomolecules*. 2020;10(10).
74. Mehdi SH, Nafees S, Zafaryab M, Khan MA, Alam Rizvi MdM. Chrysin: A Promising Anticancer Agent its Current Trends and Future Perspectives. *European Journal of Experimental Biology*. 2018;08(03).
75. Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, V AK, Gogoi R, Barua CC. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicology Letters*. 2015;233(2).
76. Ryu S, Lim W, Bazer FW, Song G. Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress. *Journal of Cellular Physiology*. 2017;232(12).
77. Xu Y, Tong Y, Ying J, Lei Z, Wan L, Zhu X, et al. Chrysin induces cell growth arrest, apoptosis, and ER stress and inhibits the activation of STAT3 through the generation of ROS in bladder cancer cells. *Oncology Letters*. 2018.
78. Samarghandian S, Afshari JT, Davoodi S. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. *Clinics*. 2011;66(6).
79. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Borji A, Hasanzadeh M, Jabbari F, Farkhondeh T, et al. Inhibitory and cytotoxic activities of chrysin on human breast adenocarcinoma cells by induction of apoptosis. *Pharmacognosy Magazine*. 2016;12(47).
80. Nacionalni strateški okvir protiv raka do 2030. *Narodne novine- službeni list Republike Hrvatske*. 2020;1–9.
81. Cancer. World Health Organisation. 2021.
82. Wang Q, Wang H, Jia Y, Pan H, Ding H. Luteolin induces apoptosis by ROS/ER stress and mitochondrial dysfunction in gliomablastoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2017;79(5).
83. Wang Y, Kong D, Wang X, Dong X, Tao yingying, Gong H. Molecular Mechanisms of Luteolin Induced Growth Inhibition and Apoptosis of Human Osteosarcoma Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. 2015;14(2):531–8.
84. Majumdar D, Jung K-H, Zhang H, Nannapaneni S, Wang X, Amin ARM, et al. Luteolin Nanoparticle in Chemoprevention: In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. *Cancer Prevention Research*. 2014;7(1).
85. Manzoor MF, Ahmad N, Ahmed Z, Siddique R, Zeng X, Rahaman A, et al. Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives. *Journal of Food Biochemistry*. 2019;43(9).
86. Mani R, Natesan V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*. 2018;145.
87. Törmäkangas L, Vuorela P, Saario E, Leinonen M, Saikku P, Vuorela H. In vivo treatment of acute Chlamydia pneumoniae infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octyl gallate, in a mouse model. *Biochemical Pharmacology*. 2005;70(8).
88. Chen P, Zhang J-Y, Sha B-B, Ma Y-E, Hu T, Ma Y-C, et al. Luteolin inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis via down-regulation of mitochondrial membrane potential in esophageal carcinoma cells EC1 and KYSE450. *Oncotarget*. 2017;8(16).

89. Su Bog Y, Jung Hwa L, Hae Young C, Kwang Sik I, Song Ja B, Jae Soo C, et al. Inhibitory effects of luteolin isolated from *Xeris sonchifolia* hance on the proliferation of hepg2 human hepatocellular carcinoma cells. *Archives of Pharmacal Research*. 2003;26(2).
90. Wu B, Zhang Q, Shen W, Zhu J. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2008;313(1–2).
91. Sassi A, Boubaker J, Loussaief A, Jomaa K, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Protective Effect of Chrysin, a Dietary Flavone against Genotoxic and Oxidative Damage Induced by Mitomycin C in Balb/C Mice. *Nutrition and Cancer*. 2021;73(2).
92. Seydi E, Salimi A, Rasekh HR, Mohsenifar Z, Pourahmad J. Selective Cytotoxicity of Luteolin and Kaempferol on Cancerous Hepatocytes Obtained from Rat Model of Hepatocellular Carcinoma: Involvement of ROS-Mediated Mitochondrial Targeting. *Nutrition and Cancer*. 2018;70(4).
93. Majewska M, Skrzycki M, Podsaid M, Czczot H. Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: an in vitro study. *National Library of Medicine; PubMed*. 2011;68(4):611–5.
94. Choi E-O, Park C, Hwang H-J, Hong SH, Kim G-Y, Cho E-J, et al. Baicalein induces apoptosis via ROS-dependent activation of caspases in human bladder cancer 5637 cells. *International Journal of Oncology*. 2016;49(3).
95. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018;80.
96. Kim JK, Kang KA, Ryu YS, Piao MJ, Han X, Oh MC, et al. Induction of Endoplasmic Reticulum Stress via Reactive Oxygen Species Mediated by Luteolin in Melanoma Cells. *National Library of Medicine, PubMed*. 2016;36(6):2281–9.
97. Dobrzynska M, Napierala M, Florek E. Flavonoid Nanoparticles: A Promising Approach for Cancer Therapy. *Biomolecules*. 2020;10(9).

ŽIVOTOPIS

Karla Ostojić rođena je 30.07.1996. godine u Zagrebu. Akademsku titulu stručne prvostupnice (back. med. lab. diagn.) stekla je 2018. godine na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu, stručni smjer Medicinsko- laboratorijska dijagnostika s obranom teme završnog rada pod naslovom »Biomarkeri u dječjoj onkologiji« uz mentorstvo doc. dr. sc. Jasminke Stepan Giljević prof.v.š. Iste godine upisuje Diplomski sveučilišni studij Klinički nutricionizam u Rijeci koji završava 2021. godine ovim diplomskim radom, pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Kraljević Pavelić i u suradnji s laboratorijem Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod laboratorijskim vodstvom izv.prof.dr.sc. Inge Urlič.

Lektorirala: Mr.sc. Mary Ann Škare, prof.

Dr. Škare