Mehanizmi djelovanja fenolnih kiselina na oksidacijski stres, polarizaciju makrofaga, angiogenezu i rast Ehrlichova ascitesnoga tumora

Kunštić, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:363228

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

MARTINA KUNŠTIĆ

MEHANIZMI DJELOVANJA FENOLNIH KISELINA NA OKSIDACIJSKI STRES, POLARIZACIJU MAKROFAGA, ANGIOGENEZU I RAST EHRLICHOVA ASCITESNOGA TUMORA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

MARTINA KUNŠTIĆ

THE MECHANISMS OF PHENOLIC ACIDS ACTION ON OXIDATIVE STRESS, POLARIZATION OF MACROPHAGES, ANGIOGENESIS AND EHRLICH ASCITES TUMOR GROWTH

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.

Ovaj je doktorski rad izrađen u *Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu*, pod vodstvom *prof. dr. sc. Nade Oršolić*, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Ovim putem najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na predloženoj temi, nesebičnom pomaganju, savjetima, znanstvenom i stručnom vodstvu i podršci tijekom izrade ove doktorske disertacije. Svojim neizmjernim znanjem, iskustvom, ogromnim entuzijazmom i neiscrpnom energijom odškrinula mi je vrata svijeta znanosti te pokazala da se snovi ipak mogu ostvariti,…

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Karmen Branović Čakanić i dr. sc. Branku Šoštariću kao i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za transmisivne spongiformne encefalopatije pri Hrvatskom veterinarskom institutu koji su me srdačno primili i pružili priliku za svladavanje i učenje Western blot tehnike.

Veliko hvala doc. dr. sc. Romani Gračan kao i tehničarki Zrinki Benčini koje su mi bile od velike pomoći prilikom izrade i mikroskopske analize histoloških preparata.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ivanu Kosalcu sa Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta što mi je uvijek bio na raspolaganju prilikom ustupanja instrumenta za analizu uzoraka.

Također, zahvaljujem se dr. sc. Nevenki Kopjar s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada što mi je omogućila analiziranje uzoraka za komet test.

Najljepše se zahvaljujem svojim diplomanticama Marini Kukolj i Josipi Dragun koje su nesebično pomagale oko izvođenja pokusa i analize rezultata te unosile vedrinu tijekom rada u laboratoriju.

Svim suradnicima Zavoda za animalnu fiziologiju, a posebno tehničarima Mariji Potočić i Hrvoju Jedvaju iskreno se zahvaljujem na stručnoj i tehničkoj pomoći koju su mi pružili tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala mojim prijateljima Ivani, Ivoni, Ireni, Marini, Aniti i Daliboru koji su mi bili morala potpora tijekom studija te dijelili moje uspjehe i padove na tom putu,…

Veliko HVALA cijeloj mojoj obitelji, na razumijevanju i bezuvjetnoj potpori tijekom doktorskog studija bez čije potpore, bezuvjetne ljubavi i vjere ovo ne bi bilo izvedivo!

Od srca zahvaljujem svojoj majci na molitvama koje su me pratile cijelo ovo vrijeme!

Ovaj rad posvećujem svoj sestri Andreji!

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

SAŽETAK

MEHANIZMI DJELOVANJA FENOLNIH KISELINA NA OKSIDACIJSKI STRES, POLARIZACIJU MAKROFAGA, ANGIOGENEZU I RAST EHRLICHOVA ASCITESNOGA TUMORA

Martina Kunštić
Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

Angiogeneza, proces nastanka krvožilja, zajedno s upalom ključna je za rast i metastaziranje raka. Novačenje makrofaga te produkcija citokina/kemokina, čimbenika rasta i proteolitičkih enzima je zajednička karakteristika upale, angiogeneze i raka, te važan cilj novog pristupa liječenja raka. Fenolne kiseline (galna, kafeinska i taninska kiselina) kao prirodne fitokemikalije i snažni antioksidansi pokazuju kemopreventivna i terapijska svojstva u liječenju raka. Istražili smo učinak fenolnih kiselina na rast tumora, angiogenezu, polarizaciju makrofaga i oksidacijski stres na modelu angiogeneze prouzročene *ip* unosom EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) u Swiss albino miša. Rezultati pokazuju da fenolne kiseline pokazuju imunostimulatorni, protuupalni, antiangiogeni i protutumorski učinak. Protutumorski učinak fenolnih kiselina temelji se na citotoksičnoj djelotvornosti M1 makrofaga, izravnoj inhibiciji rasta EAT stanica, inhibiciji čimbenika rasta krvožilnog endotela (VEGF) te rasta krvožilja u peritonealnoj šupljini miševa nositelja EAT. Fenolne kiseline kroz inhibiciju produkcije proangiogenih čimbenika, posebice VEGF čimbenika, metaloproteinaza 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9) te aktivnosti ciklooksigenaze 2 (COX-2), inhibiraju proces angiogeneze, rast tumora i povećavaju preživljenje miševa nositelja EAT stanica. Antioksidativna sposobnost fenolnih sastavnica blokira pojavnost M2 tumoru pridruženih makrofaga (TAMs) i značajno inhibira tumorogenezu u mišjem modelu. Temeljem navedenog, inhibicija TAMs može biti učinkovita u liječenju tumora i drugih kroničnih bolesti povezanih s procesom angiogeneze.

(XXI + 417 stranica, 148 slika, 42 tablica, 574 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski).
Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: angiogeneza/ fenolne kiseline/ oksidacijski stress/ polarizacija makrofaga/ proangiogeni čimbenici/ TAMs
Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen: 07. 03. 2018.
Ocjenitelji: 1. Dr. sc. Domagoj Đikić, izvanredni profesor
2. Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izvanredni profesor
3. Dr. sc. Svjetlana Terzić, znanstveni savjetnik

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

ABSTRACT

THE MECHANISMS OF PHENOLIC ACIDS ACTION ON OXIDATIVE STRESS, POLARIZATION OF MACROPHAGES, ANGIOGENESIS AND EHRLICH ASCITES TUMOR GROWTH

Martina Kunštić
Division of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science,
University of Zagreb

Angiogenesis, the process of formation of blood vessels, together with inflammation, is essential for tumor growth and metastasis. Macrophage recruitment and cytokine/chemokine production, growth factors and proteolytic enzymes is a common feature of inflammation, angiogenesis and cancer, and an important goal of a new approach to cancer treatment. Phenolic acids (gallic, caffeic and tannic acid) as natural phytochemicals and strong antioxidants show chemopreventive and therapeutic properties in cancer treatment. We investigated the effect of phenolic acids on tumor growth, angiogenesis, macrophage polarization and oxidative stress on the angiogenic model caused by *ip* inoculation of EAT cells ($2.5x10^6$) in Swiss albino mouse. The results show that phenolic acids exhibit immunostimulatory, anti-inflammatory, antiangiogenic and antitumor effects. The antitumor effect of phenolic acids is based on the cytotoxic efficacy of M1 macrophage, direct inhibition of EAT cell growth, inhibition of vascular endothelial growth factors (VEGF) and growth of blood vessels in the peritoneal cavity of EAT-bearing mice. Phenolic acids through the inhibition of proangiogenic factors, particularly VEGF, metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) and cyclooxygenase 2 activity (COX-2), inhibit process of angiogenesis, tumor growth and increase survival of EAT-bearing mice. The antioxidant ability of phenolic components blocks the occurrence of M2 tumor associated macrophages (TAMs) and significantly inhibits tumorigenesis in mouse model. Based on the above, TAMs inhibition may be effective in the cancer treatment and other chronic diseases associated with process of angiogenesis.

(XXI + 417 pages, 148 figures, 42 tables, 574 references, original in Croatian).

Thesis deposited in Central Biological Library, Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: angiogenesis/ phenolic acids/ oxidative stress/ macrophage polarization/ proangiogenic factors/ TAMs

Supervisor: Nada Oršolić, PhD, Full Professor
Thesis accepted: 07. 03. 2018.
Reviewers: 1. Domagoj Đikić, PhD, Associate Professor
2. Sandra Radić Brkanac, PhD, Associate Professor
3. Svjetlana Terzić, PhD, Scientific Advisor

SADRŽAJ

SAŽETAK ..... **IX**

ABSTRACT ..... **XI**

§ 1. UVOD **1**

1.1. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA **6**

1.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA **7**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **8**

2.1. TUMORI **8**

2.1.1. Metastaziranje *13*

2.1.2. Tumorska angiogeneza *19*

2.1.2.1. Čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF) 30

2.1.2.2. Mehanizam djelovanja VEGF-a 37

2.1.2.3. Matriks metaloproteinaze (MMPs) 43

2.1.2.4. Učinak ROS-a na angiogenezu 52

2.2. UPALNI PROCESI **55**

2.2.1. Ciklooksigenaze (COX) 60

2.3. HIPOKSIJA **64**

2.4. POLARIZACIJA MAKROFAGA **70**

2.4.1. Tumoru pridruženi makrofagi (TAMs, engl. tumor-associated macrophages) 77

2.5. POLIFENOLI **81**

2.5.1. Galna kiselina 85

2.5.2. Kafeinska kiselina 94

2.5.3. Taninska kiselina 96

§ 3. MATERIJALI I METODE **100**

3.1. MATERIJALI **100**

3.1.1. Tumorske stanice *100*

3.1.2. Pokusne životinje *100*

3.1.3. Priprema galne kiseline (GA) *101*

3.1.4. Priprema kafeinske kiseline (CA) *101*

3.1.5. Priprema taninske kiseline (TA) *101*

3.1.6. Otapalo *101*

3.1.7. Kemikalije *102*

3.1.8. Instrumenti *106*

3.2. METODE **107**
3.2.1. Praćenje promjena tjelesne težine životinja *107*
3.2.2. Plan pokusa i način obrade životinja *107*
3.2.3. Protutumorska učinkovitost fenolnih kiselina *109*
3.2.4. Određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga iz peritonealne tekućine *111*
3.2.5. Analiza hematoloških i biokemijskih parametara *112*
3.2.6. Komet test *112*
3.2.7. Mikronukleus test *113*
3.2.8. Učinak fenolnih kiselina na angiogenezu *114*
3.2.8.1. Priprema histoloških preparata peritoneuma 114
3.2.8.2. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti 115
3.2.9. Određivanje koncentracije parametara oksidacijskog stresa i antioksidativne zaštite *115*
3.2.9.1. Izolacija i priprema tkiva 115
3.2.9.2. Određivanje proteina metodom po Lowry-u 116
3.2.9.3. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH) 118
3.2.9.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT) 120
3.2.9.5. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) 121
3.2.9.6. Mjerenje količine lipidne peroksidacije (MDA) 123
3.2.10. Polarizacija makrofaga slezene i ascitesa *124*
3.2.10.1. Izolacija i stimulacija makrofaga slezene s LPS-om 124
3.2.10.2. Izolacija i stimulacija makrofaga ascitesa s LPS-om 125
3.2.10.3. Izolacija makrofaga ascitesa bez stimulacije s LPS-om 126
3.2.10.4. Mjerenje dušikova(II) oksida (NO) indirektnom metodom prema Griessu 126
3.2.10.5. Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti Arg-1 129
3.2.11. Određivanje koncentracije proangiogenih čimbenika: VEGF, MMP-2, MMP-9 i COX-2 *131*
3.2.11.1. ELISA određivanje koncentracije VEGF-a 131
3.2.11.2. ELISA određivanje koncentracije MMP-2 i MMP-9 133
3.2.11.3. ELISA određivanje koncentracije COX-2 134
3.2.12. Određivanje koncentracije Th1/Th2/Th17 citokina iz nadtaloga tumorskih stanica *136*
3.2.13. Određivanje ekspresije enzima Arg-1, iNOS i COX-2 Western blot tehnikom *138*
3.2.14. Statistička obrada podataka *140*
§ 4. REZULTATI **141**
4.1. PROTUTUMORSKI UČINAK FENOLNIH KISELINA **141**
4.1.1. Promjena tjelesne mase tumora *142*
4.1.2. Preživljenje životinja *145*
4.1.3. Ukupni volumen peritonealne tekućine *151*

4.1.4. Ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini *154*

4.1.5. Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine *157*

4.2. PROTUUPALNI UČINAK FENOLNIH KISELINA **162**

4.2.1. Hematološki pokazatelji u krvi *163*

4.2.2. Biokemijski pokazatelji u serumu *170*

4.2.3. Promjena mase unutarnjih organa *175*

4.2.4. Koncentracija ciklooksigenaze 2 (COX-2) u uzorcima *177*

4.2.4.1. Koncentracija COX-2 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa 177

4.2.4.2. Koncentracija COX-2 u nestimuliranim makrofagima ascitesa 180

4.2.4.3. Koncentracija COX-2 u tumorskim stanicama 183

4.2.5. Koncentracija Th1/Th2/Th17 citokina u nadtalogu tumorskih stanica *186*

4.3. GENOTOKSIČNI UČINAK FENOLNIH KISELINA **188**

4.3.1. Analiza komet testa *189*

4.3.2. Analiza mikronukleus testa *210*

4.4. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK FENOLNIH KISELINA **211**

4.4.1. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima *212*

4.4.2. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima *221*

4.4.3. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima *230*

4.4.4. Koncentracija lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima *239*

4.5. UČINAK FENOLNIH KISELINA NA POLARIZACIJU MAKROFAGA **248**

4.5.1. Funkcionalna aktivnost makrofaga iz peritonealne tekućine *249*

4.5.2. Rezultati mjerenja NO indirektnom metodom prema Griess-u *255*

4.5.2.1. NO aktivnost u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima slezene 255

4.5.2.2. NO aktivnost u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima ascitesa 258

4.5.2.3. NO aktivnost u nadtalogu nestimuliranih makrofaga ascitesa 261

4.5.2.4. NO aktivnost u nestimuliranim makrofagima ascitesa 264

4.5.2.5. NO aktivnost u nadtalogu tumorskih stanica 267

4.5.3. Enzimska aktivnost Arg-1 u uzorcima *270*

4.5.3.1. Enzimska aktivnost Arg-1 u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima slezene ... 270

4.5.3.2. Enzimska aktivnost Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima slezene 273

4.5.3.3. Enzimska aktivnost Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa 276

4.5.3.4. Enzimska aktivnost Arg-1 u nadtalogu nestimuliranih makrofaga ascitesa 279

4.5.3.5. Enzimska aktivnost Arg-1 u nestimuliranim makrofagima ascitesa 282

4.5.3.6. Enzimska aktivnost Arg-1 u nadtalogu tumorskih stanica 285

4.5.4. Western blot analiza Arg-1 i iNOS u tumorskim stanicama *288*

4.6. ANTIANGIOGENI UČINAK FENOLNIH KISELINA **291**

4.6.1. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti *292*

4.6.2. Razina VEGF čimbenika u uzorcima *299*

4.6.2.1. Razina VEGF-a u nestimuliranim makrofagima ascitesa 299

4.6.2.2. Razina VEGF-a u nadtalogu tumorskih stanica 302

4.6.2.3. Razina VEGF-a u tumorskim stanicama 305

4.6.3. Koncentracija matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) u uzorcima *308*

4.6.3.1. Koncentracija MMP-2 u nestimuliranim makrofagima ascitesa 308

4.6.3.2. Koncentracija MMP-2 u nadtalogu tumorskih stanica 311

4.6.3.3. Koncentracija MMP-2 u tumorskim stanica 314

4.6.4. Koncentracija matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u uzorcima *317*

4.6.4.1. Koncentracija MMP-9 u nestimuliranim makrofagima ascitesa 317

4.6.4.2. Koncentracija MMP-9 u nadtalogu tumorskih stanica 320

4.6.4.3. Koncentracija MMP-9 u tumorskim stanica 323

§ 5. RASPRAVA 326

***5.1. MODEL ANGIOGENEZE U SWISS ALBINO MIŠU IZAZVAN EAT-om* 327**

***5.2. UČINCI FENOLNIH KISELINA NA ANGIOGENEZU U MIŠA NOSITELJA EAT-a* 328**

5.2.1. Učinci GA na angiogenezu u miša nositelja EAT-a *328*

5.2.2. Učinci CA na angiogenezu u miša nositelja EAT-a *339*

5.2.3. Učinci TA na angiogenezu u miša nositelja EAT-a *351*

***5.3. PROCJENA STUPNJA OŠTEĆENJA DNA U MIŠA NOSITELJA EAT-a NAKON OBRADE FENOLNIM KISELINAMA* 357**

§ 6. ZAKLJUČAK 362

§ 7. LITERATURA 366

§ 8. ŽIVOTOPIS XVII

§ 1. UVOD

Učestalost zloćudnih bolesti je u porastu kao i njihova smrtnost kako u razvijenim zemljama tako i u zemljama u razvoju, te je zbog toga iznalaženje novih načina liječenja tumora od svjetske važnosti. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, engl. *World Health Organization*) rak kao jedan od vodećih uzroka smrtnosti uzrokovao je 7,9 milijuna smrtnih slučajeva (što čini oko 13 % svih smrtnih slučajeva) u 2007. godini, s 38 % u razvijenim zemljama i 62 % u zemljama u razvoju. Do 2030. godine procjenjuje se da će u svijetu biti gotovo 21,4 milijuna novih slučajeva raka s više od 13,2 milijuna smrtnih ishoda (Globocan, 2008). Poznato je da posebice brzu smrt izazivaju tumori koji dovode do stvaranja peritonealne karcinomatoze koja za posljedicu ima stvaranje ascitesa. Neučinkovita klasična terapija, kao i neselektivnost te posljedična toksičnost zahtijevaju pronalazak novih i učinkovitijih protutumorskih lijekova i iznalaženje novih terapijskih modaliteta. Posebna pažnja je usmjerena na prirodne sastavnice, bez toksičkog djelovanja s izraženim kemopreventivnim sposobnostima temeljenim na višestrukim mehanizmima koji inhibiraju, usporavaju ili sprječavaju procese karcinogeneze i proliferacije tumorskih stanica.

Najmanje tri različita patološka događaja mogu prouzročiti ascites: (a) smanjena limfna drenaža iz peritonealne šupljine uzrokovana opstrukcijom limfnih žila sa stanicama tumora; (b) povećana propusnost (hiperpermeabilnost) kapilara peritonealne šupljine; i (c) angiogeneza. Poznato je da je peritonealna karcinomatoza često praćena s malignim ascitesom, a njen nastanak može se povezati i s bijegom tumorskih stanica tijekom operacije uznapredovalog tumora.

Rast tumora ovisi o procesu angiogeneze i primjeni inhibitora angiogeneze, koji nisu izravno citotoksični za tumorske stanice, a mogu povećati apoptozu/nekrozu tumorskih stanica, Takvi inhibitori mogu također smanjiti proizvodnju čimbenika rasta krvožilnog endotela (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) koji je jedan od odgovornih čimbenika za stvaranja ascitesa kroz povećanje krvožilne propusnosti i rasta novih krvnih žila (angiogeneze), ali i prouzročiti usporavanje rasta tumora kroz samu inhibiciju proliferacije endotelnih stanica i formiranje novih kapilara koje sudjeluju u opskrbi rastućeg tumora ili prouzrokuje apoptozu tumora i/ili endotelnih stanica (Carmeliet, 2003; Folkman i Shing, 1992).

Osim VEGF-a čija je ekspresija kod karcinoma povezana s tumorskim rastom i invazijom, matriks metaloproteinaze (MMPs), kao cink-ovisne endopeptidaze, također omogućuju napredovanje raka, posebice poticanjem rasta stanica raka, zatim migracije i invazije, te metastaziranja i angiogeneze. Matriks metaloproteinaze sudjeluju u razgradnji vezivnog stromalnog tkiva i bazalne membrane, ključnih događaja u invaziji i metastaziranju tumora (McCawley i Matrisian, 2000; Yang i sur., 2003), ujedno povećavaju bioraspoloživost čimbenika rasta i citokina te reguliraju funkciju bioaktivnih molekula proteolitičkom obradom. Ove proteaze reguliraju angiogenezu u tumoru putem aktivacije proangiogenih čimbenika ili je inhibiraju kroz nastajanje inhibitornih čimbenika. Smatra se da je izražaj MMP-2 i MMP-9 povezan s metastatskim i invazivnim potencijalom raka budući da stromalne MMP-9 pridonose malignom ponašanju raka poticanjem stvaranja i širenja novih krvnih žila i rasta tumora. Od velikog broja proangiogenih čimbenika ističu se citokini poput čimbenika rasta krvožilnog endotela/krvožilnog čimbenika permeabilnosti (VEGF/VPF, engl. *vascular endothelial growth factor* ili *vascular permeability factor*), kiselog i bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (aFGF i bFGF, engl. *fibroblast growth factor*) i angiopoetina-2, dok su poznati inhibitori angiogeneze heparin, angiostatin, trombospondin i endostatin (Sheela i sur., 2006). Postoje dvije skupine inhibitora angiogeneze: izravni i neizravni (Cao i Lin 2004). Izravni inhibitori angiogeneze sprječavaju proliferaciju, migraciju krvožilnih endotelnih stanica ili izbjegavanje odgovora stanice na spektar proangiogenih proteina. Neizravni inhibitori angiogeneze općenito sprječavaju ekspresiju ili blokiraju aktivnost tumorskog proteina koji aktivira angiogenezu ili blokiraju izražaj svog receptora na endotelnim stanicama. Mnogi od tih tumor-staničnih proteina su proizvodi onkogena koji pokreću taj angiogenetski preokret.

Upravo je ravnoteža između proangiogenih čimbenika i njihovih inhibitora rezultat mirovanja endotelnih stanica ili pokretanja angiogeneze. Izražaj VEGF-a kao specifičnog mitogena endotelnih stanica potiče rast animalnih i humanih tumora, njihovu invaziju putem stvaranja kapilara te metastaziranje (Carmeliet i Jain, 2000; Ferrara, 2004; Yancopoulos i sur., 2000) u *in vitro* i *in vivo* sustavima. VEGF iskazuje svoju aktivnost kroz vezanje za površinske receptore Flt-1 i KDR / FLK-1 na stanicama endotela. Upravo se povećanje krvnih žila u peritonealnoj sluznici kod miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom (EAT) pripisuje lučenju proangiogenih čimbenika iz stanica EAT te se stoga smatra da povećanje vaskularizacije može biti odgovorno za progresiju malignih oboljenja. Stoga je inhibicija

proizvodnje VEGF-a kao i njegove funkcije obećavajući pristup u liječenju, prognozi tijeka bolesti te prevenciji raka (Fong i sur., 1999; Maeno i sur., 2002).

Proces karcinogeneze čvrsto je reguliran antioksidativnim enzimima i matriks metaloproteinazama. Kancerogeni uvjeti vode povećanju stvaranja reaktivnih vrsta kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) kroz mitohondrijsku disfunkciju što prouzrokuje promjene u ravnoteži proteaza/anti-proteaza. Oksidacijski stres je ključni čimbenik u promjeni aktivnosti i izražaju regulatornih proteina posebice matriks metaloproteinaza.

Nadalje, osim reaktivnih vrsta kisika, procesu rasta i širenja tumora pridonose i drugi brojni čimbenici uključujući brojne genetske i epigenetske čimbenike, te oslabljeni imunosni nadzor.

Tijekom napredovanja tumora, tumor aktivno privlači (regrutira) monocite i makrofage iz cirkulacije u tumor, gdje makrofagi u nazočnosti raznih mikrookolišnih signalnih molekula tumora i stromalnih stanica mijenjaju mikrookoliš tumora i ubrzavaju njegov rast (Mantovani i sur., 2002; Pollard, 2004). Osim fenotipa, makrofagi mijenjaju i svoju funkciju; dolazi do polarizacije makrofaga od klasičnih M1 u alternativne M2 makrofage. M1 makrofagi uključeni su u upalni odgovor, uništavanje patogena, i protutumorsku imunost. Nasuprot tome, M2 makrofagi utječu na protuupalni odgovor, zacjeljivanje rana i imaju prokarcinogene značajke (Través i sur., 2012).

Makrofagi pridruženi tumoru (TAMs; engl. *Tumor-associated macrophages*) predstavljaju dominantnu populaciju upalnih stanica koje su prisutne u tumorima te mu osiguravaju povoljno mikrookruženje za rast i razvoj kroz pojačanu angiogenezu i imunosupresiju (Mantovani i sur., 2002). TAMs su uglavnom karakterizirani kao alternativno aktivirani M2-makrofagi uključeni u regulaciju svih faza progresije tumora. TAMs kao imunosupresivne stanice doprinose otpornosti na lijekove i zračenje te se njihov povećani broj podudara s neuspjehom terapije i lošom prognozom pacijenata oboljelih od raka (Pollard, 2004; Sica i sur., 2006).

Poznato je također da TAMs imaju slabi antigen-predočni kapacitet, a brojnim supresivnim čimbenicima smanjuju aktivnost citotoksičnih stanica T i NK stanica dok brojni čimbenici rasta i kemokina, proteaze te drugi čimbenici pojačavaju angiogenezu i progresiju tumora.

Budući da je protumorska aktivnost TAMs u velikoj mjeri ovisna o njihovom novačenju (regrutaciji) u tumore i aktivaciji, terapijske mogućnosti na TAMs kao cilj su: a) inhibicija

novačenja makrofaga; b) supresija preživljenja TAMs; c) povećanje M1 tumoricidne djelotvornosti TAMs; i d) blokiranje M2 tumorske aktivnost TAMs.
Temeljem navedenog, TAMs kao potencijalne ciljne stanice, predstavljaju novi pristup za liječenje raka.

Epidemiološka istraživanja pokazala su da je visok unos hrane koja obiluje antioksidansima povezan s manjom učestalosti nastanka raka (Vainio i Bianchini, 2001). Njihovo protutumorsko djelovanje temelji se na više različitih mehanizama, primjerice njihovim antioksidativnim svojstvima, inhibiciji prooksidativnih enzima (ciklooksigenaza, lipooksigenaza, ksantin oksidaza), inhibiciji prijenosa signalnih molekula, modulaciji aktivnosti onkogena, poticanju procesa apoptoze/nekroze, promjeni redoks stanja stanica tumora, inhibiciji angiogeneze te enzima metaloproteinaza, telomeraza i topoizomeraza, ornitin dekarboksilaza, sinteze poliamina, kao i brojnih kinaza (protein tirozin kinaza, cAMP-ovisnih protein kinaza, fosfoinozitol 3-kinaza, mitogen aktiviranih protein kinaza, ciklin-ovisnih kinaza) uključenih u proliferaciju stanica. Također, pokazano je da inhibicijom prooksidativnih enzima flavonoidnim sastavnicama dolazi do inhibicije angiogeneze te odlaska stanica u apoptozu.
Antioksidativni i endogeni redoks enzimi djeluju kao prva linija obrane protiv ROS-a u svim staničnim odjeljcima (organelima), ali i izvan stanice. Najvažniji enzimi su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaze (GPX), katalaze (CAT) i peroksiredoksini (PRX) (Cerutti, 1994; Choudhury i sur., 2008; Mates i sur., 1999; Sinclair i sur., 1990). Specifična uloga ovih enzima u karcinogenezi je detoksifikacija ROS-a.

Važna značajka polifenolnih sastavnica je njihovo selektivno djelovanje na tumorske stanice u odnosu na normalne. Pri tome nije zanemariv i njihov imunostimulatorni učinak u odbacivanju tumora, koji se prvenstveno temelji na nespecifičnoj aktivaciji makrofaga te pojačanom lučenju različitih citokina kojima štite organizam u cijelosti kako od gubitka homeostaze tako i od pojave malignih oboljenja.
Smatra se da makrofazi lučenjem litičkih enzima, reaktivnih oblika kisika (H_2O_2) i dušika (NO) te čimbenika tumorske nekroze (TNF-α, engl. *tumor necrosis factor α*) izravno citotoksično djeluju prema tumorskim stanicama. Prema dosadašnjim istraživanjima polifenolne sastavnice uzrokuju proliferaciju

splenocita, povećavaju izražaj IFN-γ, IL-2 i IL-6 u splenocitima, stimuliraju proizvodnju NO i TNF-α u peritonealnim makrofazima te povećavaju sposobnost fagocitiranja (Cao i sur., 2010). Nadalje, uz makrofage, limfociti također mogu lučiti protutumorske citokine poput TNF-a, IFN-γ kako bi inhibirali proliferaciju tumorskih stanica i inducirali njihovu apoptozu (Wang i sur., 1997). Citokini poput IFN-γ, IL-12, te IP-10 (interferon-inducibilni protein 10) mogu inhibirati angiogenezu *in vivo* ili *in vitro* (Angiolilli i sur., 1995; Friesel i sur., 1987; Voest i sur., 1995), dok IL-12 i IFN-γ reguliraju izražaj VEGF-a kod tumora (Dias i sur., 1998).

Makrofagi su ključni regulatori imunosnog odgovora na tumor te svojim citokinima aktiviraju pomoćničke i citotoksične limfocite T koji oslobađanjem svojih citokina potiču aktivnost ne samo ostalih makrofaga već i stanica NK te limfocita T i B (Oršolić i sur., 2002; Oršolić i Bašić 2005; 2007).

Stoga bi povećanje M1 tumorocidne djelotvornosti TAMs; te istovremeno blokiranje M2 tumorske aktivnost TAMs moglo biti ključno u inhibiciji angiogeneze te inhibiciji rasta tumora.

Temeljem navedenog cilj je na modelu miša nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora istražiti učinak fenolnih kiselina (galne, kafeinske i taninske kiseline) na: a) rast tumora; b) angiogenezu; c) funkcionalnu sposobnost makrofaga; d) polarizaciju makrofaga; e) oksidacijski stres i f) razinu oštećenja DNA.

1.1. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

1. Fenolne kiseline snažni su antioksidativni, protuupalni, apoptotski, protutumorski i antiangiogeni spojevi učinkoviti u inhibiciji angiogeneze i rasta tumora.
1. Fenolne kiseline mogu potaknuti različite mehanizme koji mogu spriječiti proliferaciju tumorskih stanica i inhibirati peritonealnu angiogenezu u miša.
2. Modulacija imunosne reakcije kroz repolarizaciju makrofaga uz pomoć fenolnih kiselina (galne, kafeinske i taninske kiseline) može povećati tumorocidnu aktivnost M1 makrofaga i blokirati nastanak M2 makrofaga.
3. Fenolne kiseline (galna, kafeinska i taninska kiselina) mogu izazvati izravnu citotoksičnost na stanice tumora, a zaštitno djelovati na zdrave stanice.
4. Primjena fenolnih kiselina (galne, kafeinske i taninske kiseline) može prouzročiti smrt stanica tumora apoptozom ili nekrozom te potaknuti uspješnije predočavanje tumorskih antigena preko M1 makrofaga.
5. Reaktivne vrste kisika (ROS) kao posljedica stvaranja u oksidacijskom stresu dovode do oštećenja bioloških makromolekula te se njihova razina može smanjiti uz djelovanje fenolnih kiselina.
6. Primjena fenolnih kiselina (galne, kafeinske i taninske kiseline) može posljedično smanjiti razinu VEGF-a i progresiju angiogeneze kroz inhibiciju aktivnosti matriks metaloproteinaza, VEGF-a i rasta krvožilja, te ujedno smanjiti volumen ascitesa u peritonealnoj šupljini.
7. Temeljem mogućih pozitivnih i selektivnih učinaka fenolnih kiselina na angiogenezu, stvaranje ascitesa i rast tumora bez toksičnih posljedica dati zaključak je li moguća primjena fenolnih kiselina u liječenju i terapiji drugih tumora, ali i u kombinaciji s drugim pristupima liječenja s ciljem poboljšanja terapije na tumor.
8. Djelotvornost fenolnih kiselina kao snažnih antioksidanata mogla bi se iskoristiti u liječenju drugih kroničnih bolesti posljedično nastalih povećanom razinom ROS-a gdje MMPs, VEGF i pojačana angiogeneza mogu imati štetne posljedice, primjerice, dijabetička retinopatija, reumatoidni artritis, endometrioze, kronične opstruktivne bolesti pluća itd.

1.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Naći funkcionalnu poveznicu između aktivacije VEGF-a, volumena ascitesa te MMP-2 i MMP-9.
2. Utvrditi vezu između inhibicije VEGF-a i matriks metaloproteinaza s fenolnim kiselinama te inhibicije razvoja tumora i povećanja životnog vijeka domaćina.
3. Potvrditi vezu između oksidacijskog stresa, angiogeneze, VEGF-a i matriks metaloproteinaza u ascitesu.
4. Pronaći vezu između razine oksidacijskog stresa i angiogeneze te oksidacijskog stresa i razine DNA oštećenja stanica tumora i limfocita.
5. Istražiti aktivnost M1 i M2 makrofaga nazočnih u slezeni i ascitesu tumora kroz analizu inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS) i arginaze 1 (Arg-1), te proupalnih i protuupalnih citokina.
6. Razjasniti imunomodularne aktivnosti fenolnih kiselina kroz praćenje povećanja M1 tumorocidne djelotvornosti TAMs te blokiranja M2 tumorske aktivnost TAMs, koji predstavljaju ključne mehanizme u inhibiciji angiogeneze te inhibiciji rasta tumora.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. TUMORI

Normalni višestanični organizam visoko je socijalno organizirana nakupina stanica u kojoj se održava stroga dinamička ravnoteža između umiranja stanica i njihova obnavljanja. Stanice u organima i tkivima, propale zbog isteka životnoga vijeka, u pravilu se nadomještaju novima iste vrste, tako da ukupan broj i arhitektura ostaju nepromijenjeni (Taradi, 2010).

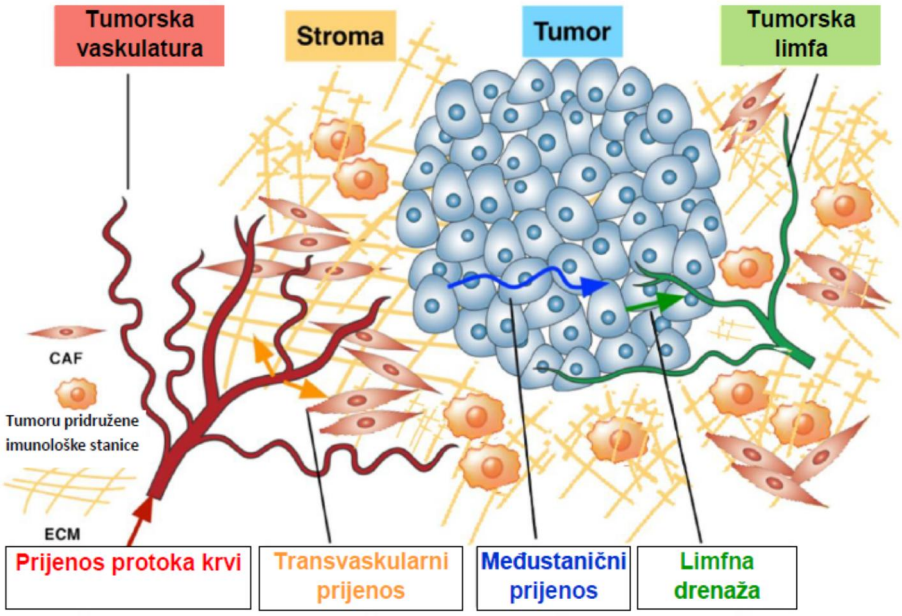
Pojava stanica koja su izgubile normalne mehanizme regulacije rasta i koja se nastavljaju neobuzdano, autonomno, nesvrhovito dijeliti stvarajući besmrtne potomke značajka je tumorskih stanica koje umnožavanjem stvaraju klinički zamjetljiv **tumor** (lat. *tumor, -oris*, *m*. - oteklina), **neoplazmu** (lat. *neoplasia, -ae*, *f.*, - novotvorevine) ili **blastom** (grč. *blastos, -u, m.* – klica + - sufiks *-oma* koji označava novotvorinu) (Taradi, 2010, Jiang i sur., 2015). Procjenjuje se da će svaki treći čovjek oboljeti od tumora, a svaki će peti od tumora i umrijeti. Tumori su nakon smanjenja smrtnosti od zaraznih bolesti i produljenja ljudskog života, drugi uzrok smrtnosti, odmah nakon srčanih bolesti (Taradi, 2010). Smatra se da su tumori najčešće monoklonskog (jednostaničnog) podrijetla, odnosno nastaju proliferacijom iz prve tumorske stanice nastale malignom transformacijom normalne stanice (Juretić, 2000).

Tumori se prema svom biološkom ponašanju dijele u tri glavne skupine:

1. **dobroćudni (benigni) tumori** - u pravilu oštro ograničeni na tkiva u kojima se razvijaju, rastu ekspanzivno i ne stvaraju metastaze.
2. **zloćudni (maligni) tumori** - u pravilu neoštro ograničeni, rastu infiltrativno i metastaziraju u okolna tkiva i organe šireći se krvlju, limfom ili šupljinama organa. Drugi naziv im je rak (grč. *karkinos*, *-u*, *m*.; lat. *cancer, -cri, -ceris, m*. - rak).
3. **granični (semimaligni/atipično proliferirajući) tumori** - imaju niski zloćudni potencijal i teško je koji puta razlikovati granični tumor od zloćudnog tumora niskog histološkog gradusa (diferencijacija) (Jukić i sur., 2002).

Svi tumori, bez obzira na njihovo biološko ponašanje, sastoje se od 2 osnovna dijela:

- parenhima građenog od pretvorenih ili neoplastičnih stanica po kojem tumor dobiva svoje ime i određuje se njegovo biološko ponašanje te
- potporne strome građene od vezivnog tkiva, krvnih žila i vjerojatno limfnih žila koje su presudne za rast i razvoj tumora (Slika 1) (Jukić i sur., 2002, Jiang i sur., 2015).



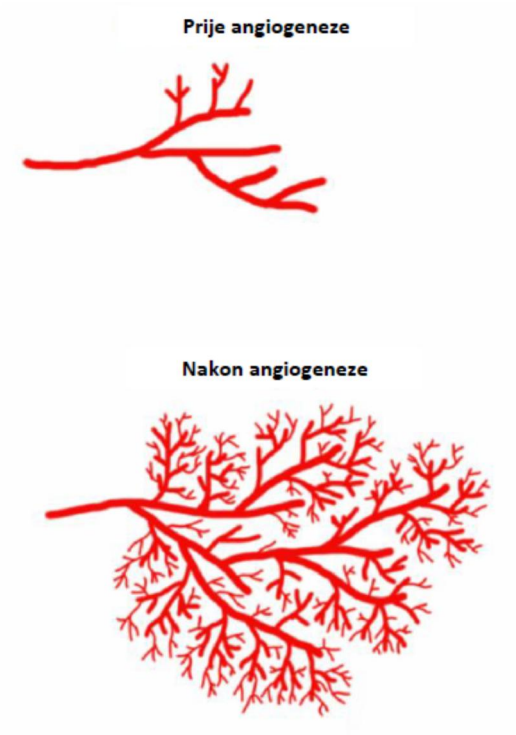
Slika 1. Struktura tumorskog tkiva (preuzeto i prilagođeno: https://news.uns.purdue.edu/images/2016/han-cancernanotech.jpg)

Diferencijacija parenhimskih stanica odnosi se na stupanj sličnosti sa stanicama iz kojih potječu, i u morfološkom i u funkcionalnom smislu. Dobro diferencirani tumori jesu oni koji su građeni od stanica koje u svemu nalikuju na zrele normalne stanice tkiva ili organa u kojima se tumor razvio što se općenito može reći za dobroćudne novotvorine, dok su slabo diferencirane ili nediferencirane (anaplastične) one novotvorine čije su stanice primitivnog izgleda i nespecijalizirane (Jukić i sur., 2002). Nediferencirani tumori u usporedbi s dobro diferenciranim tumorima u pravilu imaju veći broj mitoza, kao znak povećane proliferirajuće aktivnosti parenhimskih tumorskih stanica (Jukić i sur., 2002).

Nastanak tumorske stanice iz koje će se naposljetku razviti tumorski čvor rezultat je dugotrajnih i postupnih genetskih i epigenetskih promjena (mutacija) koje mogu biti stečene ili nasljedne, a koje su se nagomilale u samoj stanici čime ona poprima nove biološke osobine odnosno maligni fenotip (Jiang i sur., 2015). Prije svega riječ je o aktivaciji onkogenima, promjenama tumor supresor gena i gena koji su uključeni u udvostručenje, provjeru i popravak DNA lanaca. Onkogeni predstavljaju mutirane oblike normalnih gena zvane protoonkogenima čije mutacije dovode do stvaranja prekomjernih količina proteina koji potiču stanično dijeljenje i rast (Jiang i sur., 2015). S druge strane, tumor supresor geni u normalnim uvjetima obuzdavaju rast stanica, a njihove mutacije mogu dovesti do zloćudnosti (Taradi, 2010). Također važnu ulogu imaju i geni za provjeru i popravak DNA budući da vrše nadzor nad cjelokupnim genskim materijalom čija se ispravnost tijekom udvostručenja može narušiti pa se u tom slučaju pokreće "zaštitni mehanizam" zvan programirana smrt stanica (apoptoza). U slučaju njihovih promjena dolazi do izbjegavanja apoptoze stanica što u konačnici omogućuje nagomilavanje mutacija u DNA. Smatra se da je prosječno potrebno šest ili više mutacija gena koji nadziru rast stanice kako bi ona postala maligna (Taradi, 2010). Osim stvaranja i nagomilavanja mutacija gena koji određuju stupanj malignosti tumora važnu ulogu ima i odgovarajući mikrookoliš same zloćudne stanice kako bi se razvio tumorski čvor. Za tumorske stanice specifičan je poremećaj (deregulacija) staničnog ciklusa, njihova nesposobnost da zaustave ekspresiju pojedinih gena i stanični ciklus ili omoguće tok procesa programiranog odumiranja − apoptoze te na taj način zaustave umnažanje stanica i rast tumora (Tomek, 2000). Odlika tumorskog tkiva je i da zadržava ograničen broj matičnih stanica koje mogu obnoviti tumor, prekomjerna proliferacija stanica i stvaranje klonova potomaka, dok je s druge strane diferencijacija gotovo zaustavljena. Tumorska se masa zbog velikog broja proliferirajućih malignih stanica stoga eksponencijalno povećava, te kada dosegne veličinu od 10^8-10^9 stanica, promjera 1 cm, mase 1 gram postaje klinički vidljiva pri čemu je do tog doba već prošlo 30 dioba stanica (Ban i Osmak, 1996). Daljnji rast tumora nije više eksponencijalan jer se sve veći broj stanica tumora nalazi u fazi mirovanja (G0 fazi) ili odumre i definitivno izlazi iz diobe. U daljnjih 10 dioba tumor će dosegnuti broj od oko 10^{12} stanica i tumorsku masu od 1 kg što u većine bolesnika izaziva smrt (Ban i Osmak, 1996). Veća tumorska masa obično dovodi i do smetnji u funkciji organa u kojem je tumor smješten ili u funkciji susjednih organa na koje tumor vrši pritisak (Tomek, 2000).

Osobine promijenjenih stanica uključuju gubitak kontaktne inhibicije rasta, nagomilavanje stanica i tvorbe metastatskih fokusa, gubitak ovisnosti o prihvaćanju za podlogu i smanjenu potrebu za serumom (Ban i Osmak, 1996).

Da bi nakupina tumorskih stanica u tkivu, u obliku kuglice promjera 1 – 2 mm, mogla dalje rasti, nužno je da organizira vlastitu prokrvljenost (Taradi, 2010) točnije pokrene proces angiogeneze (Slika 2) koji je povezan sa zloćudnošću, jer bez pristupa krvnim žilama tumor ne bi mogao metastazirati (Jiang i sur., 2015). Ta nakupina tumorskih stanica obavlja izmjenu tvari s okolišem (normalnog tkiva) jednostavnom difuzijom, koja je dostatna samo za sloj stanica blizu površine kuglice koje se neprestano rađaju, "putuju" u unutrašnjost i umiru, dok one u središtu nekrotiziraju (Taradi, 2010). Proces angiogeneze započinje razgradnjom bazalne membrane oko endotelnih stanica (kapilara), zatim promjenom oblika endotelnih stanica u susjedstvu te bazalne membrane i njihovim prodorom u susjednu stromu. Endotelne stanice u fronti prodora proliferiraju čime se zapravo dubina prodora povećava. Stanice iza fronte prodora prestaju proliferirati, poprimaju uobičajeni oblik endotelnih stanica, započinju blisko prilijegati jedne uz druge s formiranjem lumena. Dolazi i do spajanja "fronti prodora" tako da nastaju "petlje" novih kapilara, što omogućuje cirkulaciju kroz novoprokrvljenu regiju (Juretić, 2000). U odraslih jedinki proces angiogeneze je relativno rijedak, odnosno javlja se, primjerice, u endometriju žena tijekom reproduktivnih ciklusa, zatim kod cijeljenja rana i kod rasta tumora (Juretić, 2000). Endotelne stanice pripadaju među najdulje živuće stanice budući da se u diobi nalazi samo jedna od 10 000 endotelnih stanica, izuzimajući regije s procesom angiogeneze te stoga njihova zamjena (obnova) unutar krvnih žila može trajati godinama, za razliku npr. od stanica crijevnog epitela gdje se proces obnove dogodi unutar desetak dana (Juretić, 2000).



Slika 2. Proces stvaranja angiogeneze (preuzeto: https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-hallmarks-of-cancer-5-sustained-angiogenesis/)

Smatra se da sve tumorske stanice imaju zajedničkog pretka, ipak su one genetski nestabilne i vrlo heterogene po svojim svojstvima, kao što su: veličina, oblik, brzina rasta, kariotip, antigeničnost, imunogeničnost, osjetljivost na vanjske utjecaje, osjetljivost na citotoksične lijekove, proizvodnja pigmenata i hormona, kakvoća i broj receptora na površini stanične opne, metastatski potencijal i dr. (Bašić i sur., 1996; Jiang i sur., 2015; Taradi, 2010). Upravo ta genska nestabilnost, koja traje tijekom čitavoga života tumora, predstavlja osnovni problem terapijskoga pristupa tumorima (Taradi, 2010). Kad neke tumorske stanice zadobiju svojstvo lučenja čimbenika tumorske angiogeneze (TAF, engl. *tumour angiogenesis factor*), poput VEGF ili VPF, FGF, TGF-β (engl. *transforming growth factor* β), TNF-α i drugih, on stimulira urastanje novih domaćinovih kapilara u tumor koje osiguravaju potrebne hranjive tvari i kisik što omogućava da tumor raste "agresivno", infiltrirajući i razarajući okolno zdravo tkivo (Jiang i sur., 2015; Taradi, 2010). Još uvijek je nepoznanica zašto neki tumori ostaju neaktivni (mirujući, latentni), dok drugi iniciraju angiogenezu i napredovanje prema malignom fenotipu. Nyberg i sur. (2005) navode da fiziološka ravnoteža između endogenih

inhibitora i stimulatora može predvidjeti predodređenost pojedinca za pokretanje patoloških stanja.

Angiogeni čimbenici združeni s tumorom mogu se razvrstati u dvije skupine:

a) one koje proizvode tumorske stanice i
b) one koji potječu od upalnih stanica (npr. makrofaga) koje infiltriraju tumore (Jiang i sur., 2015).

Stvoreni sustav krvnog i limfnog protoka ubrzava rast tumora, struje obaju tjelesnih tekućina omogućuju ili olakšavaju otkinutim djelićima tumorskog tkiva ili pak embolima tumorskih stanica odvod u sustavnu cirkulaciju i limfotok, vjeruje se najčešće (zbog tanke stijenke) u području venula i malih limfnih žila. Stoga se intenzitet angiogeneze (gustoća krvnih žila u tumoru) može upotrijebiti kao čimbenik prognoze u smislu procjene malignosti i metastazibilnosti tumora (Juretić, 2000).

2.1.1. Metastaziranje

Tumorsko napredovanje ili progresija je proces koji se javlja s vremenom kod mnogih tumora kako oni postaju agresivniji i stječu veću zloćudnu snagu. Pri tome se progresija tumora povezuje s aktivnim procesom invazije u izvanstanična tkiva (matriks) koji se može podijeliti u 3 koraka:

- pričvršćivanje tumorskih stanica za sastojke tkiva (bazalna membrana) pomoću receptora za laminin, fibronektin, kolagen i druge glikoproteine,
- lokalna razgradnja (liza) izvanstaničnog tkiva (2-8 sati nakon vezanja za receptor) odnosno bazalne membrane i intersticijskoga vezivnog tkiva proteolitičkim enzimima (kolagenaze tipa IV, plazminogen aktivator i elastaze) koje izlučuju same tumorske stanice ili normalne stanice pod utjecajem tumorskih stanica te omogućuju prolazak kroz kapilarnu stijenku,
- seoba (migracija) tumorskih stanica (Juretić, 2000, Jiang i sur., 2015).

Metastaziranje (grč. *metastasis, -eos, f.* -premještanje, promjena) je proces stvaranja sekundarnih presadnica (metastaza) koji nisu u dodiru s primarnim malignim tumorom budući da su se otkinule od njega, te otputovale na udaljeno mjesto gdje su nastavile dalje rasti.

Nastale presadnice ili metastaze koje su izbjegle obrambene mehanizme domaćina mogu biti regionalne (lokalne), udaljene, a ako su razasute po čitavu tijelu, govorimo o generaliziranim metastazama. Iako nije pronađen točno određeni gen koji bi bio odgovoran za metastaziranje smatra se da je sposobnost metastaziranja tumorskih stanica posljedica višestrukih mutacija zbog njihove genetske nestabilnosti koje su neovisno nakupljaju u subklonovima tumorskih stanica.

"Nespecifični" mehanizmi obrane, primjerice makrofagi i stanice ubojice (NK stanice), mogu biti snažni razarači heterogenih populacija tumorskih stanica; njihova je uloga vjerojatno najvažnija baš u uklanjanju i razaranju tumorskih stanica i u optoku i u uspostavljenim mikrometastazama (Bašić i sur., 1996).

Maligni tumori mogu se širiti (metastazirati) na 4 načina:

a) usađivanjem (implantacijom) unutar prirodnih tjelesnih šupljina ili površina,
b) limfogeno tj. preko limfnih žila koje je tipičnije za karcinome,
c) hematogeno tj. embolizacijom kroz krvne žile koje je češće za sarkome i
d) transplantacijom (presadbom) obično mehaničkim instrumentima ili rukavicama tijekom kirurškog zahvata, najčešće u rubove rane (Jukić i sur., 2002).

Gubitak međustaničnih veza te razdvajanje tumorskih stanica pojedinačno ili u skupinama koje zatim prianjanju uz bazalnu membranu i infiltriraju ju razlog je prodora tumorskih stanica kroz nju. Uzroci razdvajanja tumorskih stanica su labave kohezivne veze između malignih stanica, kao i prisustvo proteolitičkih enzima koji pokušavaju odvojiti nekrotične dijelove tumora od ostalog dijela te ameboidna sposobnost kretanja malignih stanica.

Stanice koje su prošle kroz bazalnu membranu prodiru i invadiraju međustanični matriks, gdje dopiru do stijenke krvnih žila. Invazija je aktivan proces kojem neposredno prethodi razaranje unutarstaničnog matriksa uz potporu proteolitičkih enzima iz tumorskih stanica, prije svega proteaza kao što su serin, cistein (katepsin D) i matriks metaloproteinaza u koju se ubraja kolagenaza za kolagen tipa IV koji je sastavni dio bazalne membrane čime se olakšava prodor odnosno migracija tumorskih stanica (Jukić i sur., 2002). Slijedi invazija stijenke krvne žile i prodor u krvotok tako što tumorska stanica dotakne perivaskularnu membranu, zakvači se za nju uz pomoć lamininskih receptora i počne lučiti kolagenazu tipa IV, koja je specifična za kolagen u bazalnoj membrani (Jukić i sur., 2002).

Krv nije osobito povoljan okoliš tumorskim stanicama jer je njihovo oštećenje u krvotoku jedan od čimbenika neuspješnosti metastatskog rasta. Tijek krvi u arterijama je brz i u njemu su mnoge pogibi za tumorske stanice, koje se pretežno očituju mehaničkim oštećenjem tumorskih stanica (Bašić i sur., 1996).

U krvnoj struji ili okolišu tumora samo neke tumorske stanice stvaraju embole nakupljanjem i pričvršćivanjem za leukocite (limfocite) ili trombocite u krvi, kao i međureakcijom s hemostatskim molekulama (depoziti fibrina) te na taj način budu donekle zaštićene od djelovanja protutumorskih stanica domaćina i imaju veću mogućnost preživljenja i stvaranja metastaza (Bašić i sur., 1996; Juretić, 2000; Taradi, 2010). Postoje također opažanja da tumorske stanice mogu biti i aktivne u smislu sinteze prokoagulantnih molekula što se klinički može izražavati u smislu povećane koagulabilnosti u bolesnika s tumorima (Juretić, 2000). Međutim, većina tumorskih stanica se u krvnoj struji nalazi pojedinačno i to prodorom kroz novonastale i nepotpune ili već postojeće krvne žile.

Budući da tumorima općenito nedostaje dobro razgranata mreža limfožilja, tumorske stanice mogu ulaziti u limfotok samo u izvanjskim dijelovima tumora, ali ne i u njegovoj unutrašnjosti. Tumorske stanice koje uđu u limfotok odlaze do područnih limfnih čvorova, gdje se 10-60 minuta zaustave u supkapsularnim sinusima odakle opet znatna količina stanica odlazi u eferentne (odvodne) limfne žile koje su povezane s venskim optokom krvi zahvaljujući mnoštvu limfno-krvožilnih spajanja (Bašić i sur., 1996). Izlaženje (ekstravazacija) slobodnih tumorskih stanica ili tumorskih embola iz krvne žile u izvanstanični matriks uključuje međusobno pričvršćivanje za endotel krvne žile, što ovisi djelomično o specifičnosti prianjanja tumorske i endotelnih stanica u različitim tkivima. Adhezija (vezanje za integrinske i neintegrinske receptore) i ekstravazacija tumorskih stanica može biti olakšana i postojanjem ili stvaranjem fibrinskih ugrušaka na mjestu njihove adherencije (Juretić, 2000). Nakon priljepljivanja na stanice endotela tumorske stanice pseudopodijima ulaze u prostore među endotelnim stanicama, izazivajući na taj način skupljanje endotelnih stanica, što oslobađa pristup tumorske stanice bazalnoj membrani, na koju se ova veže pomoću laminina (Bašić i sur., 1996) nakon čega slijedi izlazak kroz bazalnu membranu mehanizmima sličnim onima koji djeluju pri invaziji. Nakon udomljenja u intersticijskom prostoru tumorska se stanica može dijeliti, osnivajući tako koloniju stanica-metastaza koja ponovno može biti nositeljem novog procesa stvaranja metastaza, uvećavajući na taj način razinu rasapa malignih stanica (Tablica 1, Slika 3) (Bašić i sur., 1996).

Mjesto izlaska iz krvne žile, a prema tome i organ gdje nastaje metastaza, može se općenito predvidjeti na osnovi lokalizacije primarnog tumora i području otjecanja krvnog ili limfnog sustava. Međutim, u mnogim slučajevima prirodni putevi otjecanja ne objašnjavaju prikladno raspored metastaza. Na migraciju (kapacitet i smjer) utječu razni solubilni čimbenici (citokini) koje mogu lučiti same tumorske stanice (autokrina regulacija), dok drugi mogu potjecati od susjednih ili udaljenih normalnih stanica (Juretić, 2000). Metastaze obično imaju kraće vrijeme udvostručenja obujma nego primarni tumori od kojih potječu, a vrijeme udvostručenja metastaza također ovisi i o tipu tkiva na kojem nastaju (Tomek, 2000). U trenutku početka liječenja metastatske bolesti može se pretpostaviti da je broj zloćudnih stanica u organizmu 10^{10} do 10^{11}.

Sklonost stvaranja metastaza na organima može biti povezana sa sljedeća 3 mehanizma:

a) tumorske stanice koje se pričvršćuju za endotel mogu imati molekule za pričvršćenje čije molekule pokazuju posebnu sklonost za endotelne stanice ciljanog organa;

b) neki ciljani organi mogu oslobađati tvari (čimbenike rasta ili hormone) koje imaju sklonost kemijskog privlačenja tumorskih stanica na određeno mjesto;

c) u nekim slučajevima ciljano tkivo može biti neprimljivi okoliš za rast tumorskih stanica.

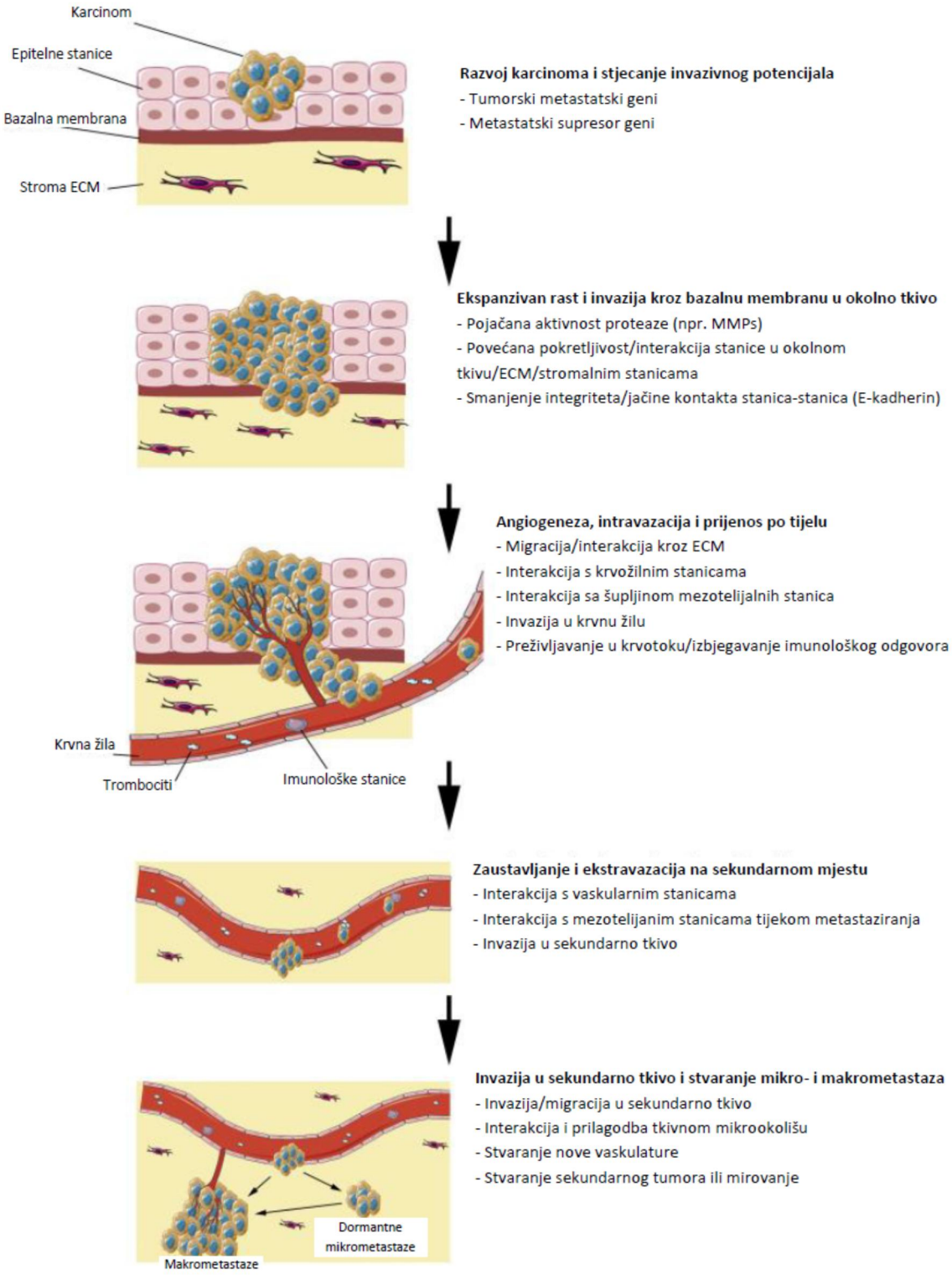
Dakle, organ u kojemu se utemeljuju metastaze jest specifičan za određeni tumor. Kod metastaziranja u prednosti su one tumorske stanice koje imunosni sustav ne prepoznaje kao strane (Juretić, 2000). Međutim, zaustavljanje žive metastatske stanice u nekom tkivu nije jamac nastanku metastaze (Bašić i sur., 1996). Pokusi su tako, primjerice, pokazali da manje od 0,01 % tumorskih stanica ubrizganih u cirkulaciju preživi, odnosno formira metastatske kolonije (Juretić, 2000).

Smatra se da su za to odgovorni turbulencija (vrtložno gibanje) krvi, relativno niska deformabilnost (preživljavanje u mikrocirkulaciji) tumorskih stanica i njihovo liziranje od strane endotelnih stanica (Juretić, 2000). Klinička i pokusna istraživanja otkrivaju da je povećana zloćudnost (npr. ubrzani rast, invazivnost i sposobnost stvaranja udaljenih metastaza) često stečena u napredujućem obliku. Poznato je da lokalizirano oštećenje tkiva, traumatizacijom, zračenjem ili citostaticima povećava metastaze u njemu, što je ujedno i potvrda da okoliš u organu utječe na rast metastaza tumora (Bašić i sur., 1996).

Tablica 1. Odnos tumora i domaćina tijekom metastatske kaskade*

ODJELJCI METASTATSKE KASKADE	MOGUĆI MEHANIZMI
1. INICIJACIJA TUMORA	Djelovanje kancerogena, aktivacija i/ili depresija onkogena, preraspodjela kromosoma
2. PROMOCIJA I RAST TUMORA	Kariotipska genetska i epigenetska nestabilnost; amplifikacija gena; pojava gena vezanih za promociju; utjecaj hormona
3. PROLIFERACIJA STANICA	Vlastiti čimbenici rasta i njihovi receptori, hormonski receptori
4. ANGIOGENEZA	Čimbenici angiogeneze, čimbenici rasta
5. INVAZIJA OKOLNIH TKIVA, KRVNE I LIMFNE ŽILE	Kemoatraktanti seruma, autokrini čimbenici pokretljivosti, receptori priljepljivanja, enzimi razaranja
6. ZAUSTAVLJANJE TUMORSKE STANICE I NJEZIN IZLAZAK IZ KRVNE ŽILE:	Homotipični ili heterotipični agregati (grudice)
a) Priljepljenje za endotel	Međureakcije tumorskih stanica s fibrinom, krvnim pločicama i čimbenicima zgrušavanja
b) Skupljanje endotela	Čimbenici krvnih pločica i tumorskih stanica
c) Priljepljenje za bazalnu membranu	Receptor za laminin i tromboplastin
d) Rastapanje bazalne membrane	Proteoliza, kolagenaza tipa IV, heparanaze, katepsini
e) Lokomocija	Autokrini čimbenici pokretljivosti
7. STVARANJE KOLONIJA TUMORSKIH STANICA U UDALJENOM TKIVU	Receptori za tkivne čimbenike rasta, čimbenike angiogeneze
8. IZBJEGAVANJE OBRANE DOMAĆINA I OTPORNOST NA LIJEČENJE	Otpornost na ubilačko djelovanje makrofaga, naravnoubilačkih stanica, aktivirane limfocite T, prikrivanje tumor specifičnih antigena i njihova blokada, amplifikacija gena otpornosti na lijekove

*Preuzeto: Bašić i sur., 1996



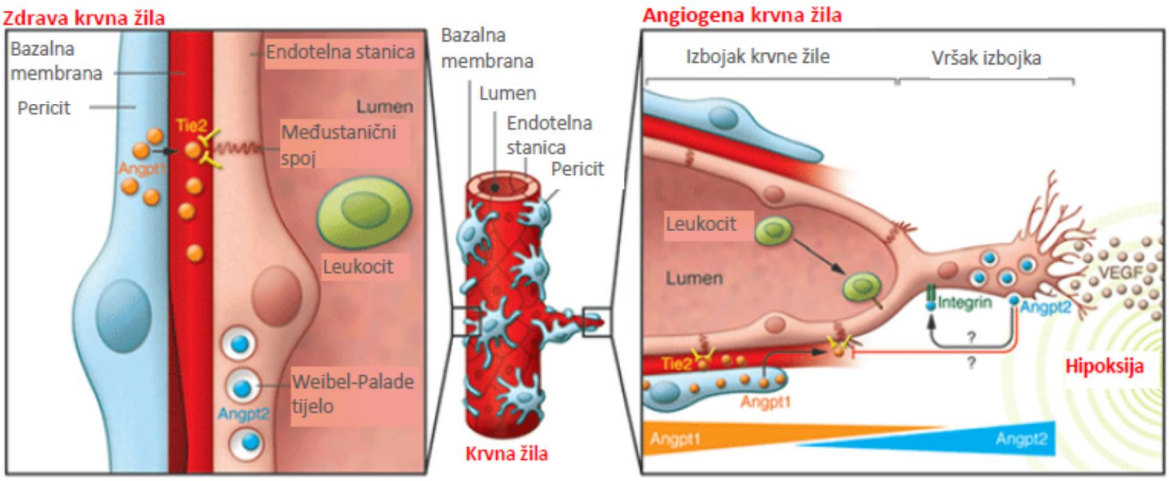
Slika 3. Kaskada procesa metastaziranja (preuzeto i prilagođeno: Jiang i sur., 2015)

2.1.2. Tumorska angiogeneza

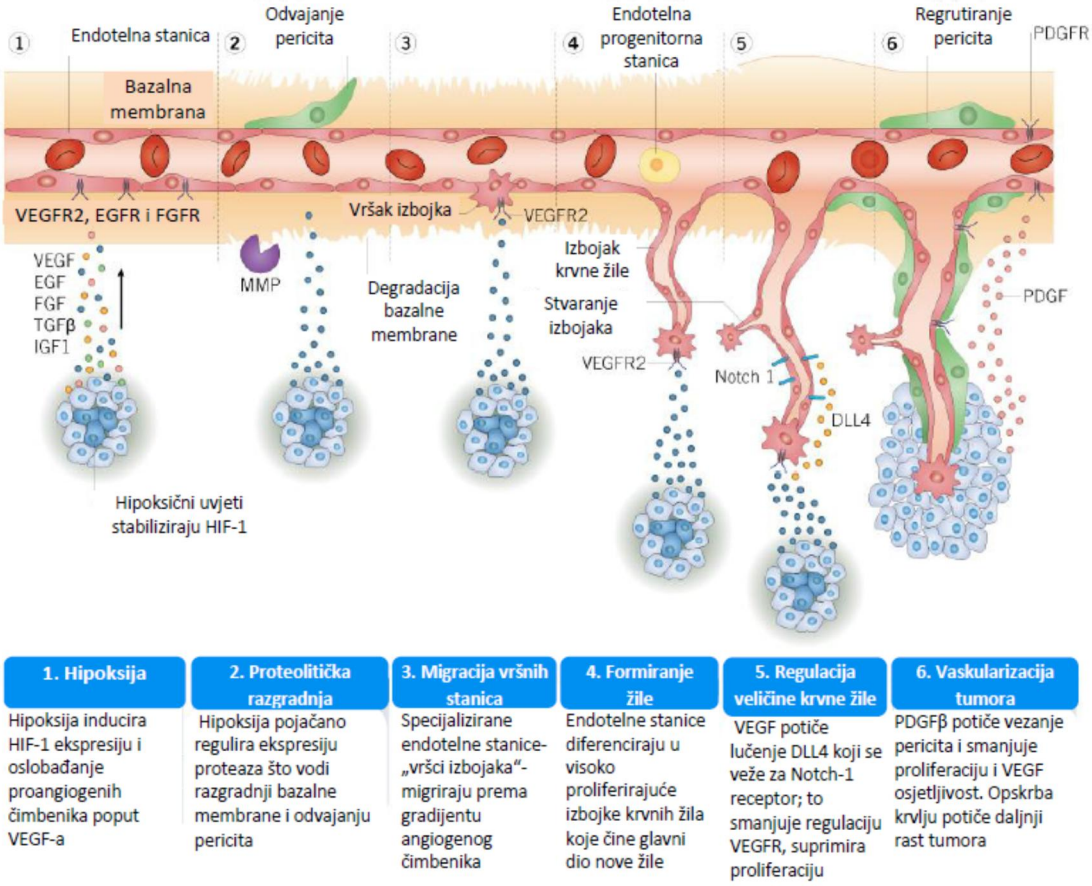
Krvožilna mreža opskrbljuje sve stanice u tijelu s kisikom i hranjivim tvarima te je stoga za preživljavanje stanica ključno da se nalaze dovoljno blizu krvne žile. Procjenjuje se da stanica ne bi smjela biti udaljena više od 100 -200 μm od najbliže krvne žile, što otprilike odgovara difuzijskom kapacitetu za kisik (Carmeliet i Jain, 2000; Folkman, 2001).

Očito je stoga da kisik posjeduje najznačajniju ulogu u regulaciji rasta solidnog tumora. Zbog nenormalnog rasta tumorskih stanica i kasnije neravnoteže u opskrbi i potražnji za kisikom, solidni tumori uzrokuju hipoksiju koja dovodi do fiziološkog procesa neoangiogeneze/neovaskularizacije odnosno razvoja i rasta novih kapilara u odraslih iz već postojećih krvnih žila kao odgovor na proangiogene čimbenike koje luče stanice raka radi dobivanja više kisika (Gaffney i sur., 2003; Jiang i sur., 2015; Triratanachat i sur., 2006), a koji igra ključnu ulogu u procesima rasta tumora i metastaziranja (Chi i sur., 2007; Lamszus i sur., 2005). U tom slučaju nove kapilare izrastaju iz malih venula bez mišićnog sloja. Međutim, istraživanja su pokazali da postoji i drugi način stvaranja angiogeneze tumora koji se odvija pomoću endotelnih prekursorskih stanica (EPCs, engl. *endothelial progenitor cells*) iz koštane srži odraslih ljudi koje su slične angioblastima-stanicama iz kojih procesom vaskulogeneze nastaju endotelne stanice i krvne žile u embriju.

Pravilan tijek ovog procesa važan je u mnogim fiziološkim stanjima poput embrionalnog razvoja, normalnom rastu tkiva, održavanja reproduktivne funkcije žene (ovulacija, obnova endometrija nakon menstruacije, stvaranje žutog tijela, placentacija tijekom trudnoće) te procesa zacjeljivanja rana. Regulacija intenziteta angiogeneze ovisi o ravnoteži angiogenih i angiostatskih (antiangiogenih) čimbenika (Tablica 2, Slike 4-5), a ukoliko dođe do gubitka te ravnoteže, angiogeneza postaje patološka te kao takva može doprinositi patogenezi mnogih bolesti (Dedić Plavetić i sur., 2003). U većini normalnih tkiva prevladavaju angiostatski čimbenici pa stanice izolirane iz tih tkiva *in vitro* ne stimuliraju angiogenezu (Demeron i sur., 1994). Različiti čimbenici poput hipoksije, acidoze, hipoglikemije ili povišenja unutartkivnog tlaka mogu stimulirati stvaranje novih krvnih žila povećanjem ekspresije angiogenih čimbenika (Carmeliet i Jain, 2000).



Slika 4. Usporedba građe zdrave i angiogene krvne žile (Saharinen i Alitalo, 2011)



Slika 5. Proces razvoja krvožilja tumora

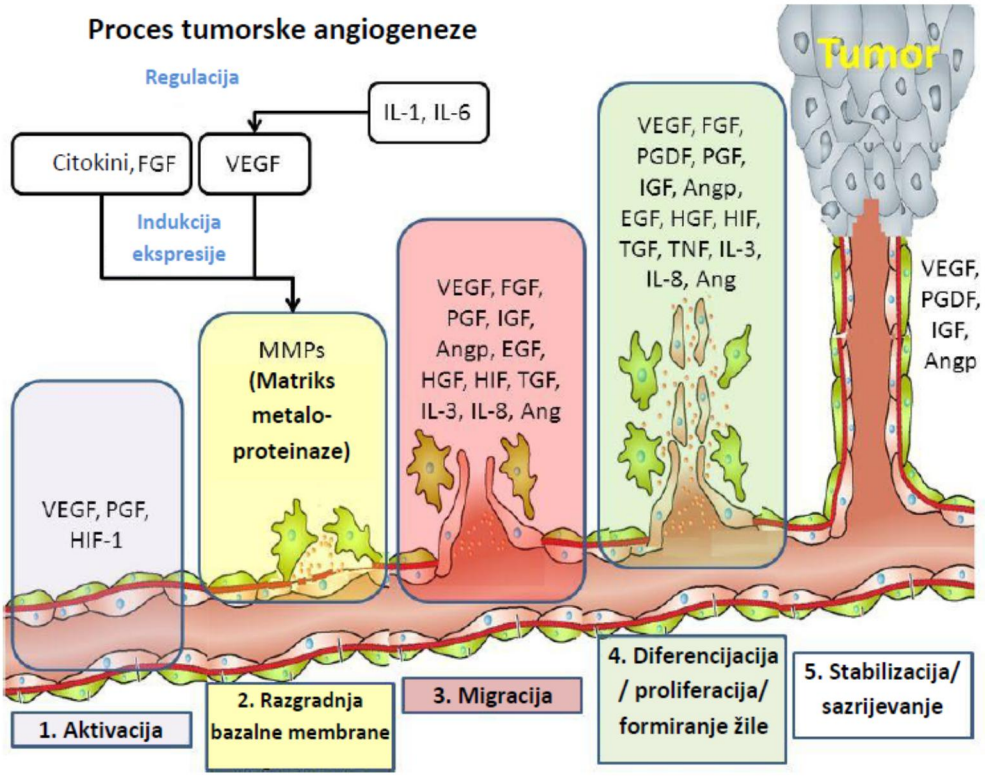
(preuzeto i prilagođeno: https://www.tocris.com/cell-biology/angiogenesi)

Tablica 2. Endogeni angiogeni i angistatski čimbenici

Angiogeni čimbenici		Angiostatski čimbenici	
Čimbenik	**Molekulska masa (kDa)**	**Čimbenik**	**Molekulska masa (kDa)**
Čimbenik rasta krvožilnog endotela (**VEGF/VPF**) (engl. *vascular endothelial growth factor*)	40-45	Angiostatin (engl. *angiostatin*)	38
Bazični čimbenik rasta fibroblasta (**bFGF**) (engl. *basic fibroblast growth factor*)	18	Endostatin (engl. *endostatin*)	20
Kiseli čimbenik rasta fibroblasta (**aFGF**) (engl. *acid fibroblast growth factor*)	16,4	Trombospondin 1-2 (**THBS 1-2, TSP 1-2**) (engl. *thrombospondin 1-2*)	140
Transformirajući čimbenik rasta α (**TGF-α**) (engl. *transforming growth factor α)*	5,5	Trombocitni čimbenik 4 (**PF4, CXCL4**) (engl. *platelet factor 4*)	27-29
Transformirajući čimbenik rasta β (**TGF-β**) (engl. *transforming growth factor* β)	25	Interferon α (**IFN-α**) (engl. *interferon α*)	19-26
Angiogenin (engl. *angiogenin)*	14,1	Interferon β (**IFN-β**) (engl. *interferon β*)	20; 23
Čimbenik rasta endotelnih stanica izoliran iz trombocita (**PD-ECGF**) (engl. *platelet derived endothelial cell growth factor)*	45	Interferon γ (**IFN-γ**) (engl. *interferon* γ)	50
Čimbenik rasta kolonija granulocita (**G-CSF**) (engl. *granulocyte colony stimulating factor*)	17	Antitrombin III (**AT III**) (engl. *antithrombin III)*	53-55
Čimbenik rasta kolonija granulocita i makrofaga (**GM-CSF**) (engl. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*)	14-35	Troponin I (**Tn I**) (engl. *troponin I*)	22
Angiopoetin 1 (**Ang-1**) (engl. *angiopoietin 1*)	70	Interleukin 1 (**IL-1**) (engl. *interleukin 1*)	17
Angiopoetin 2 (**Ang-2**) (engl. *angiopoietin 2*)	55	Interleukin 4 (**IL-4**) (engl. *interleukin 4*)	13
Interleukin 6 (**IL-6**) (engl. *interleukin 6*)	22-27	Interleukin 10 (**IL-10**) (engl. *interleukin 10*)	18
Interleukin 8 (**IL-8, CXCL8**) (engl. *interleukin 8*)	40	Interleukin 12 (**IL-12**) (engl. *interleukin 12*)	70-75
Čimbenik rasta hepatocita (**HGF**) (engl. *hepatocyte growth factor*)	92	Interleukin 18 (**IL-18**) (engl. *interleukin 18*)	18; 24
Čimbenik rasta posteljice (**PGF**) (engl. *placental growth factor*)	25	Vazostatin (engl. *vasostatin*)	21
Čimbenik tumorske nekroze α (**TNF-α**) (engl. *tumor necrosis factor α*)	17	Fragment prolaktina (**PRL**) (engl. *prolactin fragment*)	8; 16; 23
Čimbenik rasta trombocita (**PDGF**) (engl. *platelet derived growth factor*)	27-31	Kanstatin (engl. *canstatin*)	24
Čimbenik rasta trombocita BB (**PDGF-BB**) (engl. *platelet derived growth factor BB*)	24,3	Restin (engl. *restin*)	22

Angiogeni čimbenici		Angiostatski čimbenici	
Čimbenik	**Molekulska masa (kDa)**	**Čimbenik**	**Molekulska masa (kDa)**
Čimbenici rasta slični inzulinu (**IGF-I, II**) (engl. *insulin-like growth factors*)	7,5	Tkivni inhibitori MMP 1-4 (**TIMP1-4**) (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinase 1-4*)	28,5/21/24-25/22
Matriks metaloproteineza 2 (**MMP-2**) (engl. *matrix metalloproteinase 2*)	72	Tumstatin (engl. *tumstatin*)	28
Matriks metaloproteineza 9 (**MMP-9**) (engl. *matrix metalloproteinase 9*)	92	Topljivi oblik VEGF receptora 2 (engl. *soluble form of VEGF receptor 2*)	75
Proliferin (**PLF**) (engl. *proliferin*)	21	Fibronektin (engl. *fibronectin*)	29 i 40
Leptin (**LEP**) (engl. *leptin*)	16	Čimbenik tumorske nekroze α (**TNF-α**) (engl. *tumor necrosis factor α*)	17 ili 26
Vaskularna stanična adhezijska molekula-1 (**VCAM-1**) (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*)	100-110	Inhibitor aktivatora plazminogena (engl. *plasminogen activator inhibitor*)	45
Vazoaktivni intestinalni peptid (**VIP**) (engl. *vasoactive intestinal peptide*)	18,3	Aresten (**ARR**) (engl. *arresten)*	26
Monocitni kemoatraktant protein (**MCP-1**) (*engl. monocyte chemoattractant protein-1*)	13	Maspin (engl. *maspin*)	42
Kalikrein (**KLK**) (engl. *kallikrein)*	30	Matriks metaloproteineza 12 (**MMP-12**) (engl. *matrix metalloproteinase 12*)	54
Inhibitor aktivatora plazminogena (**IAP**) (engl. *plasminogen activator inhibitor*)	45	Neostatin (engl. *neostatin*)	50
Folistatin (**FST**) (engl. *follistatin*)	37,8	Neostatin 7 (engl. *neostatin 7*)	28
Pleiotrofin (**PTN**) (engl. *pleiotrophin*)	18	Neostatin 14 (engl. *neostatin 14*)	23
Angiotropin (engl. *angiotropin*)	4,5	Protrombin (engl. *prothrombin*)	22
Epidermalni čimbenik rasta (**EGF**) (engl. *epidermal growth factor*)	6	C-terminalni nekatalitički fragment MMP-2 (**PEX**) (engl. *C-terminal non-catalytic fragment of MMP-2*)	29-32
Čimbenik 1α stromalnih stanica (**SDF-1α**) (engl. *stromal cell-derived factor-1α*)	8	Endotelni polipeptid II koji aktivira monocite (**EMAP-II, AIMP1, SCYE1**) (engl. *endothelial monocyte-activating polypeptide II*)	20 (34 pro-oblik)
Delta protein 4 (**DLL4**) *(delta-like ligand 4)*	55,1	Protein β za regulaciju rasta **(Gro-β, CXCL2)** (engl. *growth regulated protein β*)	8

Angiogeni čimbenici		Angiostatski čimbenici	
Čimbenik	**Molekulska masa (kDa)**	**Čimbenik**	**Molekulska masa (kDa)**
Efrini (engl. *ephrins*)	25-50	Interferon inducibilni protein 10 **(IP-10, CXCL10)** (engl. *interferon-inducible protein-10)*	8,6
Neutrofilni aktivirajući protein-2 (**NAP-2, CXCL7**) (engl. *neutrophil activating protein-2*)	7,6	2-metoksiestradiol (engl. *2-methoxyestradiol*)	0,3
Rast reguliran s onkogenom *α* (**GRO α, CXCL1, NAP-3**) (engl. *growth regulated protein α*)	8-10	Monokin induciran interefonom *γ* **(MIG, CXCL9)** (engl. *monokine induced by interferon γ*)	11,7
Rast reguliran s onkogenom *β* (**GRO β, CXCL2, MIP-2a**) (engl. *growth regulated protein β*)	8	Čimbenik pigmentnog epitela, serpin F1 **(PEDF, SERPINF1)** (engl. *pigment epithelium-derived factor, serpin F1*)	50
Rast reguliran s onkogenom γ (**GRO γ, CXCL3, MIP-2b**) (*engl. growth regulated protein γ*)	8-10	Protamin (engl. *protamine*)	4,3
Epitelni peptid-78 koji aktivira neutrofile (**ENA-78, CXCL5**) (engl. *epithelial neutrophil activating peptide-78*)	8	Transformirajući čimbenik rasta β (**TGF-β**) (engl. *transforming growth factor* β)	25
Granulocitni kemotaktični protein-2 (**GCP-2, CXCL6**) (engl. *granulocyte chemotactic protein-2*)	6-8	Heparinaza (engl. *heparinase*)	42
Midkin (engl. *midkine*)	16	Humani korionski gonadotropin (**HCG**) (engl. *human chorionic gonadotropin*)	25,7
		Minociklin (engl. *minocycline*)	0,457
		Angioinhibini (engl. *angioinhibins*)	< 1



Slika 6. Proces rasta krvožilja unutar tumora reguliran proangiogenim čimbenicima (preuzeto i prilagođeno: http://slideplayer.com/slide/9011892/)

Danas se uvelike istražuje doprinos angiogeneze tumorskoj bolesti, reumatoidnom artritisu (Liu i sur., 2013), psorijazi (Liu i sur., 2015; Elshabrawy i sur., 2015), proliferativnoj dijabetičkoj retinopatiji (Zhang i sur., 2017) te u razvitku kolateralne cirkulacije u ishemičnim organima (npr. hipoksičnom srcu) i ekstremitetima (Shweiki i sur., 1992). U patogenezi malignih bolesti angiogeneza ima ulogu u rastu primarnog tumora te nastanku i rastu metastaza gdje čini se da ima i pozitivan i negativan učinak. Osim pojma angiogeneze u literaturi se često susreće i pojam vaskulogeneza koja predstavlja proces u kojem dolazi do stvaranja potpuno novih krvnih žila, ali ne iz već postojećih, nego iz stanica endotelnih prekursora (Dedić Plavetić i sur., 2003). Smatra se da vaskulogeneza nema toliko važnu ulogu u razvitku tumora kao angiogeneza (Carmeliet i Jain, 2000). Humani tumori u početku svog rasta uglavnom nisu angiogenog fenotipa. Međutim, pojedini stadiji u razvitku tumora poput prekanceroze, lokalno ograničenog tumora (karcinoma *in situ*) pa sve do invazivnog karcinoma pokazuju progresivno povećanje broja krvnih žila (Sharma i sur., 2001). S druge strane, *in situ* karcinomi mogu mjesecima preživjeti bez stvaranja vlastite krvne opskrbe, ali je

time njihov volumen ograničen na nekoliko mm^3 (Dedić Plavetić i sur., 2003) budući da samom difuzijom mogu zadovoljiti vlastite potrebe za hranjivim tvarima, dok daljnji rast ovisi o stvaranju primjerene krvne opskrbe novostvorenim žilama (Folkman i sur., 1989) koje putem perfuzijskog i parakrinog učinka pospješuju tumorski rast. Perfuzijski učinak odnosi se na dopremu hranjivih tvari i kisika, dok se parakrini učinak odnosi na proizvodnju čimbenika rasta, koji potiču rast tumora, iz novonastalih endotelnih stanica (Folkman, 1995). Endotelne stanice proizvode niz čimbenika koji moduliraju rast i ponašanje tumorskih stanica poput inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 i 2, (IGF1 i 2, engl. *insulin like growth factor*); čimbenika rasta izoliranog iz trombocita (PDGF, engl. *platelet derived growth factor*), kemotaktičkog peptida za makrofage (MCP, engl. *macrophage chemotactic peptide*) i drugih (Slika 6) (Rak i sur., 1996). Parakrina međureakcija endotelnih i tumorskih stanica je uzajamna, jer i tumorske stanice luče čimbenike koji utječu na proliferaciju i migraciju endotelnih stanica (Dedić Plavetić i sur., 2003).

Stvaranju novih krvnih žila u tumorima ne pridonosi samo povećanje sinteze angiogenih čimbenika već i potiskivanje sinteze angiostatskih čimbenika čime tumorske promjene poprimaju takozvani »angiogeni fenotip« (Rastinejad i sur., 1989).

Angiogeni čimbenici potrebni za neovaskularizaciju tumora stvaraju se iz najmanje tri izvora: a) sintezom u tumorskim stanicama b) sekrecijom iz makrofaga koji infiltriraju tumor te c) enzimatskom degradacijom međustaničnog matriksa od strane makrofaga i/ili tumorskih stanica pri čemu neki tumori rabe kombinaciju navedenih mehanizama dok drugi, poput melanoma samostalno proizvode više različitih angiogenih čimbenika (Dedić Plavetić i sur., 2003).

Najčešće spominjani i najbolje karakterizirani angiogeni čimbenik jest čimbenik rasta endotela krvnih žila, VEGF, a njegova je angiogena djelotvornost dokazana u brojnim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima. VEGF inducira angiogenezu i proliferaciju endotelnih stanica i igra važnu ulogu u regulaciji vaskulogeneze (Ferrara, 1999; Jiang i sur., 2015). Osim mitogenog učinka, VEGF povećava permeabilnost (propusnost) krvnih žila i u tom procesu je 50 000 puta djelotvorniji od histamina, kao klasične molekule koja povećava propustljivost krvnih žila (Ellis i sur., 2001) pa je stoga poznat i kao čimbenik vaskularne permeabilnosti (Dvorak i sur., 1999).

Uz VEGF, bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF) dobro je poznat angiogeni čimbenik, koji je svoju angiogenu djelotvornost pokazao u istraživanjima cijeljenja peptičkog

ulkusa želuca, gdje se dokazao kao milijun puta potentniji od H2-antagonista (Carmeliet i Jain, 2000). Također, ne manje važni čimbenici su kiseli čimbenik rasta fibroblasta (aFGF), transformirajući čimbenik rasta alfa (TGF-α), čimbenika rasta izoliranog iz trombocita (PDGF, engl. *platelet derived growth factor*), čimbenik rasta endotelnih stanica podrijetla trombocita (PD-ECGF, engl. *platelet derived endothelial cell growth factor*), interleukin 8 (IL-8) i mnogi drugi (Folkman, 1995). Pored navedenih čimbenika koji imaju učinak na endotelne stanice, postoje i čimbenici koji su važni za preživljavanje samih endotelnih stanica među koje ubrajamo integrine kao adhezijske molekule na površini endotelnih stanica koje omogućuju endotelnoj stanici prianjanje uz izvanstanični matriks, a bez čega dolazi do apoptoze endotelnih stanica (Dedić Plavetić i sur., 2003). Sličnu ulogu imaju i angiopoetini u čijoj porodici nalazimo 4 molekule od kojih neke imaju inhibicijski (angiopoetin 2), a neke poticajni učinak (angiopoetin 1) na endotelne stanice. Preživljenje tumorskih stanica pospješuju i periendotelne stanice (periciti), koje mogu takav učinak imati čak i u odsutnosti drugih angiogenih čimbenika (Ellis i sur., 2001).

Za razumijevanje patogeneze procesa stvaranja novih krvnih žila, kao i za potencijalne terapijske zahvate važno je poznavanje i molekula koje su nadređene ovim angiogenim čimbenicima kao što je primjerice inducibilni čimbenik hipoksije 1α (HIF-1α, engl. *hypoxia inducible factor* 1α) čija je ekspresija povećana u uvjetima hipoksije, a funkcija mu je poticanje transkripcije brojnih angiogenih čimbenika (VEGF, PDGF, angiopoetin) (Carmeliet i Jain, 2000; Ellis i sur., 2001). Angiogeni čimbenici mogu djelovati i posredno putem drugih medijatora kao što je primjerice dušikov(II) oksid (NO) koji posreduje mitogeni učinak VEGF-a na endotelne stanice. Dodatak VEGF-a endotelnim stanicama *in vitro* potiče pojačanu sintezu NO-a, a inhibicija enzima sintaze dušikovog monoksida s pomoću L-NAME (N-nitro-L-arginin metilni ester) dokida mitogeni učinak VEGF-a (Papapetropoulos i sur., 1997; Ziche i sur., 1997). Tako je primjerice u tumorima glave i vrata nađena povišena produkcija NO-a, kao i povezanost između angiogene sposobnosti i razine NO sintaze u uzorcima tumora (Gallo i sur., 1998).

Primjena antiangiogenih (angiostatskih) agenasa u terapiji tumora može poboljšati rezultate konvencionalnih protutumorskih obrada zbog povećane specifičnosti tumora i smanjenja razvoja rezistencije tumorskih stanica (Kim i sur., 1993; Millauer i sur., 1994).
Trombospondin je prvi angiostatski čimbenik pronađen u normalnim stanicama, a vrlo često je mutacijama inaktiviran u tumorskim stanicama (Demeron i sur., 1994) gdje razina njegove

sinteze može tada iznositi svega 4–6 % od osnovne. Ovaj se endogeni čimbenik u humanim stanicama nalazi pod kontrolom p53 tumor supresor gena (Demeron i sur., 1994) za koji je poznato da je mutiran u velikom broju tumora (Dedić Plavelić i sur., 2003). Angiostatin je specifični inhibitor proliferacije endotelnih stanica otkriven 1994. godine u plazmi i urinu miševa s Lewisovim plućnim karcinomom, a koji se u cirkulaciji pojavljuje isključivo u prisutnosti primarnog tumora (O'Relly i sur., 1994). Za razliku od trombospondina kojeg proizvode tumorske stanice *per se*, angiostatin nastaje enzimatskim cijepanjem plazminogena bilo metaloelastazama iz makrofaga u stromi tumora, (Dong i sur., 1997) bilo serinskim proteazama koje luče same tumorske stanice (Gately i sur., 1996). U plazmi se može otkriti do 5 dana nakon uklanjanja primarnog tumora (vrijeme poluraspada je 2,5 dana) (Ellis i sur., 2001). Endogeni inhibitor angiogeneze, endostatin je C-terminalni fragment kolagena XVIII iz kojeg se oslobađa djelovanjem enzima elastaze, a pri tom ne interferira s procesom cijeljenja rane (Dedić Plavelić i sur., 2003). Poznato je još nekoliko endogenih inhibitora angiogeneze kao što su trombocitni čimbenik 4 (PF4) (Maione i sur., 1990) interferon α (IFN-γ), N-terminalni fragment prolaktina (PRL) (Clapp i sur., 1993), ali nisu svi povezani s prisutnošću tumora. Neki od njih poput interferona α upotrebljavani su već u kliničkim istraživanjima i to s dosta uspjeha u terapiji životno opasnih hemangioma dječje dobi (Folkman, 1995). Uloga angiogeneze u procesu metastaziranja značajna je zbog barem dva patogenetska događaja. Prvo, novostvorene krvne žile svojom propusnošću, mjestimice nedostatkom bazalne membrane i slabijim međustaničnim pobočnim svezama, omogućavaju tumorskim stanicama ulazak u cirkulaciju (Dvorak i sur., 1995). Drugo, nakon dospijeća u ciljne organe metastatske tumorske stanice moraju razviti vlastitu žilnu mrežu da bi narasle do klinički zamjetljive veličine. Utjecaj angiogeneze na klinički ishod bolesti potvrđen je u nekoliko vrsta tumora (dojka, pluća), gdje je pokazano da gustoća krvnih žila u tumoru korelira s brojem metastaza, a time i preživljenjem bolesnika (Weidner, 1995).

Početkom prošlog stoljeća kirurzi su zamijetili da nakon uklanjanja primarnog tumora dolazi do brzog rasta visceralnih metastaza (Marie i Clunet, 1910). Za objašnjenje ovog fenomena trenutno najveću pozornost privlači hipoteza o kontroli rasta metastaza angiostatskim čimbenicima iz primarnog tumora (O'Reilly i sur., 1993). Primarni tumor raste zahvaljujući novonastalom žilju kao posljedica prevlasti angiogenih nad angiostatskim čimbenicima u njemu samome. Angiostatski čimbenici zahvaljujući svom duljem poluvijeku života, dospijevaju krvotokom do mikrometastaza čije stanice još ne stvaraju dovoljne

količine angiogenih čimbenika. Kao rezultat nastaje inhibicija rasta metastaze na onoj veličini koja ne zahtijeva novostvorene krvne žile, tj. u obliku mikrometastaza. U takvim avaskularnim mikrometastazama velik broj stanica umire apoptotskom smrću (Holmgren i sur., 1995). Upravo ovaj učinak angiostatskih čimbenika želi se iskoristiti u terapijske svrhe čime bi se tumorska bolest dugotrajnim davanjem ovih inhibitora održavala u remisiji. Pokusima na životinjama postignuta je dugotrajna remisija i dobro opće stanje usprkos prisutnosti mikrometastaza u plućima (Weidner, 1995). Poznato je da dosadašnja primjena protutumorske terapije koja je usmjerena protiv tumorskih stanica ima nažalost i brojne neželjene učinke na ostale zdrave stanice koje brzo proliferiraju. Osim toga, ograničavajući čimbenik takve kemoterapije je razvitak stečene otpornosti na kemoterapeutike, kao rezultat genomske nestabilnosti tumorskih stanica uzrokovane kromosomskim delecijama, amplifikacijama gena, translokacijama kromosoma, točkastim mutacijama čime je ostvarena učinkovita selekcija i proliferacija tumorskih stanica (Dedić Plavetić i sur., 2003). Nažalost, takva pojava susreće se u 30 % svih bolesnika podvrgnutih kemoterapiji (Dedić Plavetić i sur., 2003).

Stromu solidnih tumora čine između ostalog i genski stabilne, diploidne stanice kao što su endotelne stanice, periendotelne potporne stanice (periciti), upalne stanice te fibroblasti, od kojih se ne očekuje razvoj stečene otpornosti na terapiju (Dedić Plavetić i sur., 2003). Upravo su endotelne stanice ciljna točka novog pristupa u terapiji tumorske bolesti. Inhibitori angiogeneze su svojim djelovanjem usmjereni na kapilarne endotelne stanice koje u procesu angiogeneze proliferiraju jednako brzo kao matične stanice koštane srži koje se prosječno dijele svakih 5 dana (Folkman, 1995). Time se izbjegavaju neželjeni učinci na ostale endotelne stanice u tijelu koje spadaju među najmirnije stanice sa životnim vijekom oko 1000 dana (Denekamp, 1993). U odrasle osobe tjelesne mase 70 kg endotelne stanice pokrivaju površinu od približno 1000 m^2 (Dedić Plavetić i sur., 2003).

Tijekom cikličke primjene endostatina, kod eksperimentalnih tumora miševa, nije došlo do nastanka stečene otpornosti na terapiju, što se objašnjava činjenicom da endotelne stanice nisu genomski nestabilne, što bi im omogućilo selektivnu prednost rezistentnih klonova (Boehm i sur., 1997). Prednost inhibitora angiogeneze pred klasičnom kemoterapijom u potencijalnom liječenju tumora mozga ili moždanih metastaza jest u činjenici da ne bi morali prelaziti krvnomoždanu barijeru jer su im djelatna točka same endotelne stanice (Dedić Plavetić i sur., 2003).

Smatra se da antiangiogena terapija počiva na 4 principa (Ellis, 2002). Prvi terapijski pristup jest blokada učinaka specifičnih angiogenih čimbenika, odnosno onih čimbenika koji imaju mitogeni učinak na endotelne stanice. Sljedeći pristup jest smanjenje učinka bilo čimbenika, bilo stanica, koje pospješuju preživljenje endotelnih stanica. Upravo iz takvog razmišljanja proizašao je razvoj integrinskih antagonista koji onemogućuju vezanje endotelne stanice za izvanstanični matriks te na taj način dovode do njezine apoptotske smrti (Ellis, 2002). Poznavanje angiostatskih čimbenika kao što su endostatin i angiostatin dovelo je do njihove primjene u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima gdje su dokazali svoj antiangiogeni potencijal uz minimalnu toksičnost što predstavlja treći pristup. Posljednji način liječenja odnosi se na blokiranje nekih putova koji mogu voditi pojačanju angiogenih učinaka. Tako je primjerice poznato da prijenos signala putem HER2/neu receptora dovodi do pojačanja angiogeneze (Ellis, 2002), dok uspješnom blokadom toga puta trastuzumabom dolazi do indirektnog blokiranja angiogeneze.

Sličnim mehanizmom djeluju i inhibitori ciklooksigenaze s obzirom na to da jedan od produkata djelovanja tog enzima prostaglandin E2 dovodi do porasta ekspresije angiogenih čimbenika. Upravo se tim mehanizmom tumači smanjena pojavnost nekih tumora (primjerice kolorektalni karcinom) u osoba koje su uzimale COX-2 (ciklooksigenaza 2) inhibitore te se njihova primjena čini klinički opravdanom (Sharma i sur., 2001).

Nakon početnih pretkliničkih ispitivanja koja su dala vrlo obećavajuće rezultate, klinički pokusi nažalost nisu potvrdili velika očekivanja. Ipak, danas prevladava mišljenje da bi terapija antiangiogenim čimbenicima mogla imati primjenu u kombinaciji s konvencionalnim kemoterapijskim protokolima pojačavajući njihov učinak (Dedić Plavetić i sur., 2003).

Stoga otkrivanje inhibitora angiogeneze može biti jedna od protutumorskih pristupa (Griffioen i Molema, 2000; Kiselev i sur., 2003).

2.1.2.1. Čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF)

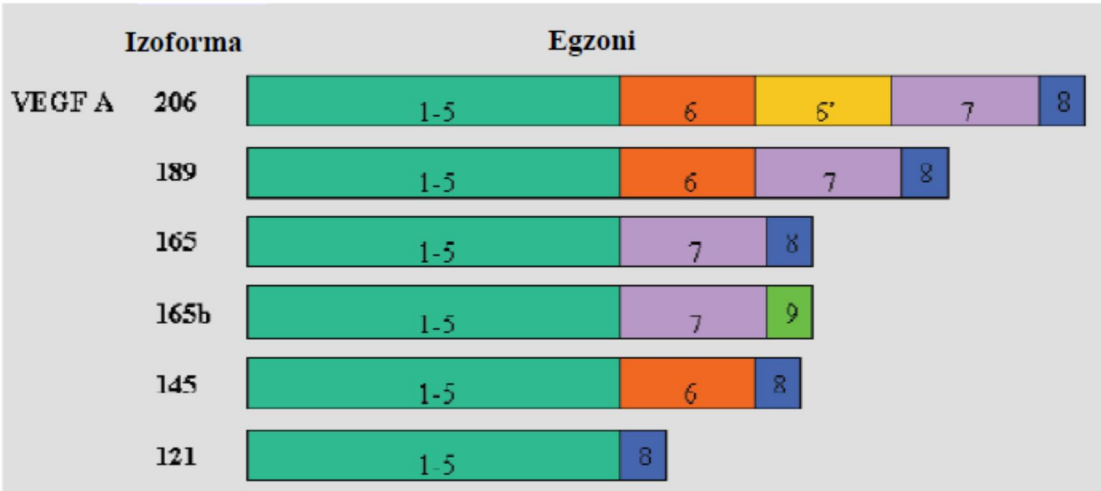
Čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF ili VEGF-A) prvotno je opisan kao homodimerni protein (34-45 kDa) koji povećava krvožilnu propusnost u koži (Byrne i sur., 2005), a pronađen je djelomičnim pročišćavanjem ascitesne tekućine i supernatanta stanične linije hepatokarcinoma zamoraca te je stoga nazvan čimbenikom krvožilne permeabilnosti (VPF). VPF bio je poznat kao najmoćniji čimbenik i vazodilatator koji povećava mikrovaskularnu propusnost (oko 50 000 puta jače od histamina) i koji je odgovoran za krvožilnu hiperpermeabilnost i nakupljanje tekućine bogate plazma proteinima u solidnim i ascitesnim tumorima (Byrne i sur., 2005). Ferrara i Henzel su 1989. godine pronašli čimbenik rasta endotelnih stanica u kondicioniranom mediju za folikularne stanice hipofize goveda i nazvali ga VEGF-om (Byrne i sur., 2005) za koji se je kasnije sekvencioniranjem utvrdilo da je identičan VPF čimbeniku (Byrne i sur., 2005; Shibuya, 2014). VEGF potreban je za rast i diferencijaciju endotelnih stanica, ali i kemotaktički djeluje na stanice monocita, privlačeći ih na mjesta upale i tumora (Byrne i sur., 2005).

VEGF je važan posrednik u procesu angiogeneze/limfoangiogeneze (odnosno stvaranja krvnih žila iz već postojećeg krvožilnog sustava) i vaskulogeneze (*de novo* stvaranje krvnih žila u embrionalnom razvoju) kako kod fetusa tako i kod odraslih ljudi (Byrne i sur., 2005; Shibuya, 2011; Shibuya, 2014). VEGF je heparin vezujući glikoprotein koji se izlučuje kao homodimer molekulske mase od 45 kDa. Pripada u skupinu čimbenika rasta zvanu PDGF koju karakterizira prisutnost 8 konzerviranih ostataka cisteina u strukturi čvora cistina te stvaranje antiparalelnih disulfidno vezanih dimera (Robinson i Stringer, 2001). Ovaj signalni protein dio je sustava koji ponovno inducira opskrbu kisikom u stanicama i tkivima kada je neadekvatna cirkulacija krvlju kao što je slučaj u hipoksičnim uvjetima (Palmer i Clegg, 2014). Kada stanica ne prima dovoljno kisika, proizvodi se transkripcijski čimbenik HIF-1 koji stimulira oslobađanje VEGF-A koji se zatim veže na VEGF receptore na endotelnim stanicama (Shibuya, 2014) pokrećući put tirozin kinaze koji dovodi do angiogeneze. Ekspresija angiopoetina 2 u odsutnosti VEGF-a dovodi do smrti endotelnih stanica i vaskularne regresije (Harmey, 2004). VEGF također uzrokuje vazodilataciju, djelomično kroz stimulaciju dušik oksid sintaze u endotelnim stanicama (Yang i sur., 1996) te može stimulirati migraciju stanica i inhibirati apoptozu (Alon i sur., 1995).

Obitelj VEGF-a u sisavaca sadrži pet članova izoformi koje su nastale kao rezultat alternativnog cijepanja (engl. *splicing*) od jednog VEGF gena: VEGF-A, čimbenik rasta

placente (PlGF, engl. *placenta growth factor*) koji je usko povezan s VEGF-A, zatim VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D (Carmeliet i Collen, 1999; Fontanella i sur., 2014; Shibuya, 2011; 2014), od kojih su zadnji otkriveni kasnije od VEGF-A, pa je i prije njihova otkrića VEGF-A nazivan samo VEGF. Te izoforme međusobno se razlikuju po molekulskoj masi i biološkim svojstvima kao što je njihova sposobnost vezanja za heparin sulfat proteoglikane na površini stanice.

Ljudski VEGF-A gen sastoji se od 8 egzona i egzona nastalog alternativnim cijepanjem što rezultira barem 5 različitih izoformi peptida, a uobičajene izoforme peptida sastoje se od 121, 145, 165, 189 i 206 aminokiselina (nazvanih $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{189}$, $VEGF_{206}$) (Byrne i sur., 2005; Shibuya, 2011) (Slika 7). Izoforme alternativnog cijepanja 165, 189 i 206 aminokiselina sadrže heparin vezujuće domene koje im pomažu da se učvrste u izvanstaničnom matriksu i sudjeluju u vezanju na heparin sulfat i predstavljanju VEGF receptorima što predstavlja ključni čimbenik za VEGF aktivnost; heparin vezujući oblici su aktivniji. Ostale izoforme sastoje se od 148, 162 i 183 aminokiselina (nazvane $VEGF_{148}$, $VEGF_{162}$ i $VEGF_{183}$) (Jingjing i sur., 1999), a nedavno je pronađena i varijanta $VEGF_{165}$ koja je imenovana $VEGF_{165b}$.



Slika 7. Izoforme VEGF-A (preuzeto i prilagođeno: Byrne i sur., 2005)

Izoforme nastale alternativnim cijepanjem proteinske strukture razlikuju se prema sposobnosti vezanja heparina i heparin sulfata. Aminokiseline koje su kodirane egzonima 1-5 konzervirane su u svim izoformama, a alternativno cijepanje može se pojaviti u egzonima 6 i 7 koji kodiraju 2 heparin-vezujuće domene koje utječu na vezanje i topivost receptora.

Izoforme koje kodiraju taj egzon 6 nalaze se čvrsto vezane na površini stanice ($VEGF_{145}$, $VEGF_{189}$ i $VEGF_{206}$), a one izoforme kojima nedostaje egzon 6 su difuzibilne. $VEGF_{165}$ kojemu nedostaje samo egzon 6 je umjereno difuzibilan, dok je $VEGF_{121}$ koji nema egzona 6 i 7 vrlo difuzibilan (Byrne i sur., 2005). $VEGF_{165}$ je najdominantnija proteinska izoforma i također najmoćniji u smislu stimuliranja angiogeneze, ali transkripti VEGF-a mogu biti i obilniji (Relf i sur., 1997). Izoforma $VEGF_{165}$ može se vezati i s heparinom i s izvanstaničnim matriksom. Nedavno otkrivena izoforma alternativnoj cijepanja $VEGF_{165b}$ ima jednak broj aminokiselina kao i $VEGF_{165}$, ali u COOH terminalnoj regiji ima 6 različitih aminokiselina koje su inače kodirane od strane egzona 8, a sada predstavljaju egzon 9 (Byrne i sur., 2005). Terminalni COOH dio $VEGF_{165}$ neophodan je za određivanje mitogene signalizacije, stoga će promjene u toj regiji vjerojatno utjecati na tu funkciju.

Za razliku od ostalih VEGF izoformi koje stimuliraju angiogenezu, $VEGF_{165b}$ je endogeni inhibitorni oblik VEGF-a koji smanjuje VEGF-om induciranu proliferaciju i migraciju endotelnih stanica. Iako se može vezati na receptor VEGF-R2 (Flk-1 / KDR), to vezivanje $VEGF_{165b}$ ne dovodi do fosforilacije receptora ili aktiviranje nizvodnih signalnih puteva (Byrne i sur., 2005). VEGF se inače rijetko eksprimira i otkriven je samo u fetalnoj jetri.

Malo je poznato o funkciji i regulaciji VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D, no čini se da nisu regulirani glavnim putevima koji reguliraju VEGF-A (Tablica 3, Slika 8).

VEGF-B je vrlo bazičan heparin vezujući čimbenik rasta koji je strukturno sličan VEGF-A i PlGF, a obiluje u tkivima kao što su srce, poprečnoprugasti mišići i gušterača te može parakrino djelovati na reguliranje funkcije endotelnih stanica (Byrne i sur., 2005; Shibuya, 2014).

Ekspresija VEGF-B pronađena je u astrocitomu (Byrne i sur., 2005) i skvamoznom oralnom karcinomu (Byrne i sur., 2005). Visoke razine VEGF-B i VEGF-C povezane su s metastazama limfnog čvora kolorektalnog raka (Byrne i sur., 2005), ali njihova funkcionalna uloga u tumorima još nije u potpunosti istražena.

VEGF-C je izoliran iz kondicioniranog medija PC3 tumorskih stanica prostate i identificiran kao specifični aktivator VEGF receptora 3 (VEGF-R3). VEGF-C veže se na VEGFR-3 i inducira tirozin fosforilaciju VEGF receptora 2 (VEGF-R2) i receptora 3 (VEGF-R3) (Byrne i sur., 2005). VEGF-D je također ligand za VEGFR-2 i VEGFR-3. Dok je VEGF-A uglavnom uključen u angiogenezu i krvožilnu permeabilnost, VEGF-C i VEGF-D su uključeni u limfoangiogenezu (Shibuya, 2011; 2014). Naime, VEGF-C i D su mitogeni

limfnih endotelnih stanica i potiču njihovo preživljavanje putem VEGF-R3 (Byrne i sur., 2005), a ujedno sudjeluju i u regulaciji angiogeneze u ranoj fazi embriogeneze (Shibuya, 2011). VEGF-C također inducira hiperplaziju već postojećih limfnih žila (Byrne i sur., 2005). Također je otkriveno niz srodnih VEGF proteina (varijanti) koji su kodirani virusima (VEGF-E) i otrovom nekih zmija (VEGF-F) (Shibuya, 2011; 2014). Primjerice, VEGF-E je virusni VEGF homolog kojeg kodira Orf virus koji je strukturno sličan VEGF-A, a veže se i aktivira VEGF-R2, ali ne i VEGF-R1 te predstavlja snažni stimulator angiogeneze (Byrne i sur., 2005; Shibuya, 2014).

Postoje tri različita receptora u VEGF obitelji receptora (Shibuya i sur., 1999) koji posjeduju zajednička svojstva višestrukih IgG-sličnih izvanstaničnih domena i aktivnosti tirozin kinaze, a koji su prvotno pronađeni na endotelnim stanicama. Enzimske domene VEGF receptora 1 od 180 kDa (VEGF-R1, također poznat kao Flt-1), VEGF-R2 od 230 kDa (također poznat kao KDR ili Flk-1) i VEGF-R3 od 170 kDa (također poznat kao Flt-4) razlikuju se prema umetnutom slijedu (Fontanella i sur., 2014).

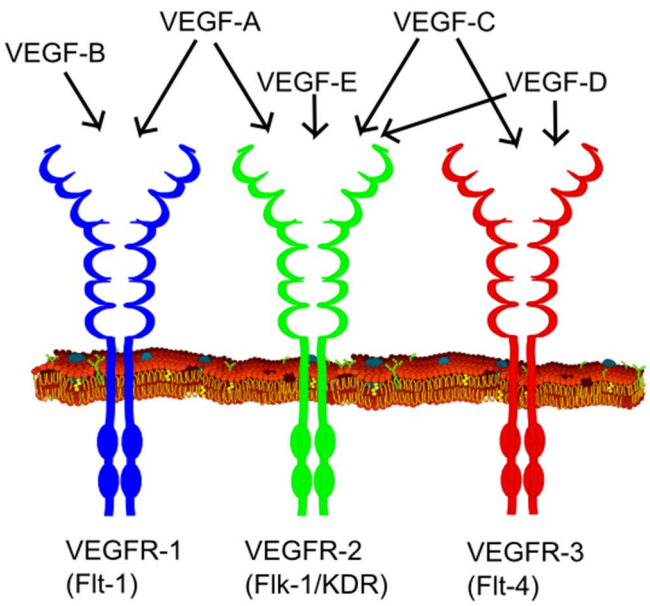
Tablica 3. Podjela i uloge VEGF-a

VEGF obitelj	
TIP VEGF-a	**ULOGA**

VEGF-A	• **Angiogeneza**
	  • ↑ migracija endotelnih stanica
	  • ↑ mitoza endotelnih stanica
	  • ↑ aktivnosti MMP
	  • ↑ $\alpha_v\beta_3$ integrin aktivnosti
	  • stvaranje lumena krvnih žila
	  • stvaranje fenestracije
	• **kemotaktički za makrofage i granulocite**
	• **vazodilatacija (indirektno pomoću otpuštanja NO)**

VEGF-B	• embrionska angiogeneza (tkivo miokarda)
VEGF-C	• limfoangiogeneza
VEGF-D	• potreban za razvoj limfnih krvnih žila koje okružuju plućne bronhiole
PlGF	• važan za vaskulogenezu • potreban u angiogenezi tijekom ishemije, upale, zacjeljivanju rana i tumora

Endotelne stanice također eksprimiraju dodatne VEGF koreceptore, neuropilin 1 (NRP-1) i neuropilin 2 (NRP-2) koji se selektivno vežu za aminokiselinski oblik $VEGF_{165}$, a njihova ekspresija se podudara s tumorskom agresivnošću i lošom prognozom (Fontanella i sur., 2014). VEGF-A veže se na tirozin kinazne receptore VEGF-R1 i VEGF-R2 koje se eksprimiraju gotovo isključivo na endotelnim stanicama te na neenzimske koreceptore neuropilin 1 (NRP-1) i neuropilin 2 (NRP-2) (Neufeld i sur., 1999; Shibuya, 2011; 2014). PlGF i VEGF-B vežu se na VEGF-R1 i neuropilin 1 (Neufeld i sur., 1999; Shibuya, 2014), a VEGF-C i VEGF-D vežu se na VEGF-R2 i VEGF-R3 (Shibuya, 2011; 2014) (Tablica 4, Slika 8). VEGF receptori međusobno su u međureakciji kako bi poboljšali signalizaciju. Koreceptorima neuropilinima nedostaje tirozin kinazna aktivnost te stoga moraju biti u međureakciji s drugim receptorima radi prijenosa signala. Pokazalo se je da NRP-1 stvara međureakcije s VEGF-R1 i VEGF-R2, dok NRP-2 stvara kompleks s VEGF-R1 (Byrne i sur., 2005). NRP-1 također može djelovati kao čimbenik preživljenja za tumorske stanice koje ne izražavaju druge klasične VEGF receptore (Byrne i sur., 2005).



Slika 8. Vrste VEGF-a i njihovi receptori (preuzeto: https://en.wikipedia.org/wiki/Vascular_endothelial_growth_factor#cite_note-15)

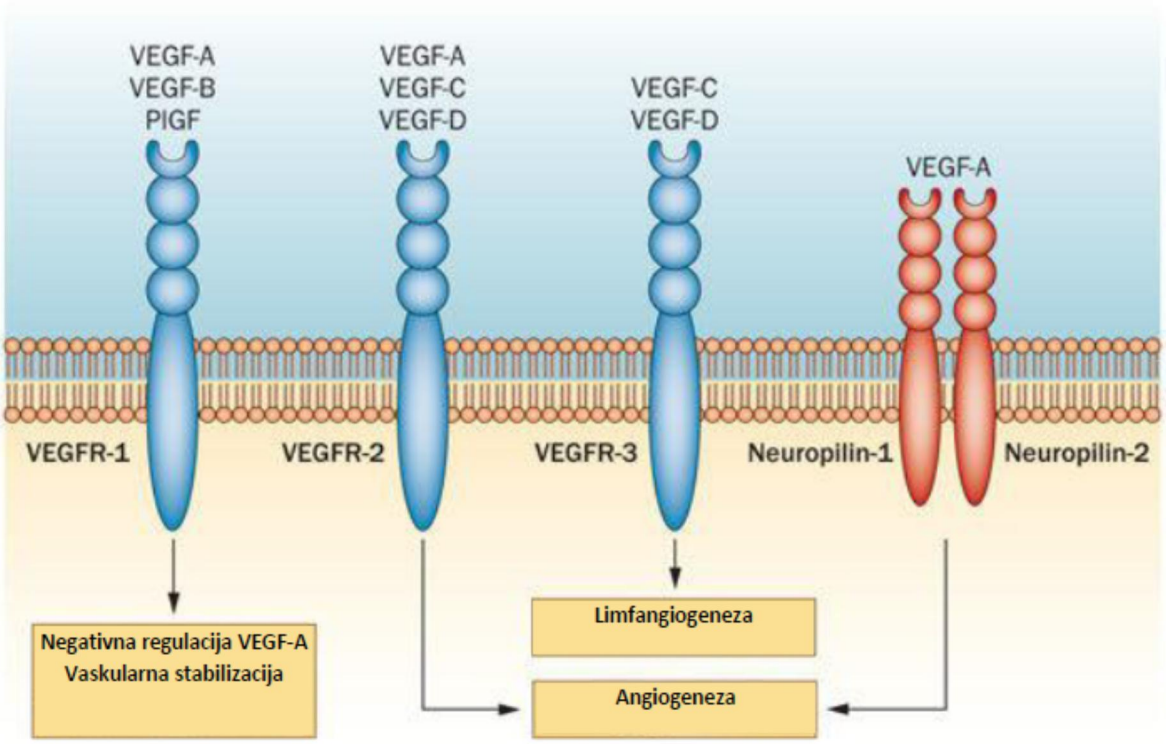
Tablica 4. Međureakcije pojedinih vrsta VEGF-a i pripadajućih receptora

RECEPTORI	LIGANDI				
	PIGF	VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D
sFlt-1	✓	✓			
VEGF R1/Flt-1	✓	✓	✓		
VEGF R2/ KDR/Flk-1		✓		✓	✓
VEGF R3/Flt-4				✓	✓
Neuropilin 1	✓	✓	✓		
Neuropilin 2		✓			

VEGF-C/VEGF -R3 signalni put važan je za limfnu proliferaciju, limfoangiogenezu, ali i metastaziranje tumora u limfnim čvorovima (Byrne i sur., 2005; Shibuya, 2014) budući da je VEGF-R3 specifično eksprimiran na limfnom endotelu (Shibuya, 2014).

Topljiv oblik Flt-1 receptora (sFlt-1, sVEGF-R1) može se otkriti u perifernoj krvi i ligand je za VEGF s visokim afinitetom (Aiello i sur., 1995) koji se može upotrijebiti za antagoniziranje VEGF funkcije. Receptori VEGF-R1 i VEGF-R2 su jače izraženi na tumoru i

proliferirajućem endotelu, dijelom zbog hipoksije, ali također i kao odgovor na sam VEGF-A. VEGF-R1 i VEGF-R2 mogu stupiti u međureakciju s višestrukim nizvodnim signalnim putevima preko proteina kao što su PLC-γ, Ras, Shc, Nck, PKC i PI3-kinaza (Rousseau i sur., 1997; Shibuya, 2011). Receptor VEGF-R1 ima veći afinitet od VEGF-R2 i posreduje u pokretljivosti i krvožilnoj propusnosti, dok je VEGF-R2 neophodan za proliferaciju i posjeduje jaču kinaznu aktivnost (Slika 9).



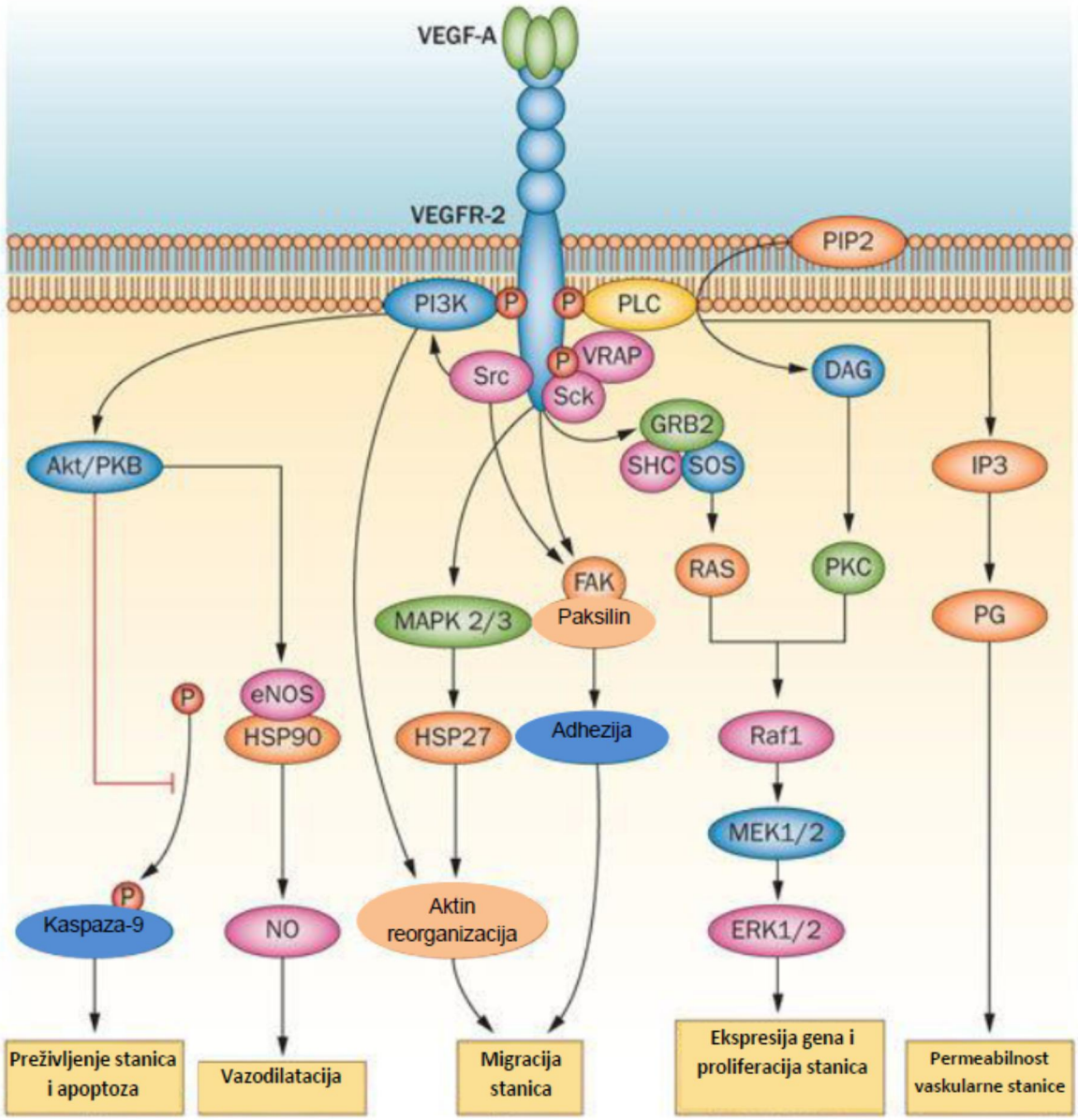
Slika 9. Uloge VEGF receptora (preuzeto i prilagođeno: Taimeh i sur., 2013)
Neovaskularizacija je stimulirana VEGF-R2 aktivacijom, procesom koji je pojačan VEGF aktivacijom neuropilina-1 i neuropilina-2. Aktivacija VEGF-R1 inducira negativni mehanizam povratne sprege mijenjajući aktivnosti VEGF-A, sa sekundarnom ulogom u stabilizaciji novostvorenih krvnih žila. VEGF-R3 aktivacija dovodi do limfangiogeneze. **Kratice:** PIGF-čimbenik rasta placente; R-receptor; VEGF-čimbenik rasta krvožilnog endotela.

2.1.2.2. Mehanizam djelovanja VEGF-a

Glavne funkcije VEGF-a su promicanje preživljenja, induciranje proliferacije i povećanje migracije i invazije endotelnih stanica, što sveukupno doprinosi angiogenezi, a regulacija tih funkcija odvija se međureakcijom s receptorima tirozin kinaze i slanjem signala kroz različite nizvodne proteine.

VEGF stimulira DNA sintezu i proliferaciju putem VEGFR-2 i izvanstanične regulirane kinaze-1/2 (ERK 1/2). Aktivacija ERK 1/2 posredovana je Ras-Raf-MEK-ERK putem (Slika 10) (Byrne i sur., 2005). Mitogen aktiviran protein kinazni (MAPK) signalni put također je uključen u proliferaciju stanica kao odgovor na VEGF. Dokazi upućuju da receptor VEGFR-2 posreduje u tome, pri čemu VEGF može aktivirati MAPK u endotelnim stanicama pankreasne aorte izražavajući VEGFR-2 dok stanice koje izražavaju VEGFR-1 nisu sposobne aktivirati MAPK (Byrne i sur., 2005). U stresnim uvjetima, kao što je trošenje seruma, VEGF se veže za VEGFR-2, koji aktivira signalni put fosfatidil inozitol kinaze (PI3-kinaza) i fosforilaciju Akt/protein kinaze B (PKB). Akt je serin kinaza uključena u antiapoptotičku signalizaciju i dovoljna je za promicanje preživljenja serumski izgladnjelih HUVEC stanica. Upotreba PI3-K inhibitora, vortmanina, poništava aktivaciju Akt i u potpunosti sprječava preživljenje posredovano VEGF-om. Vezanje VEGF-a za VEGFR-1 ne aktivira ovaj put i nije uključeno u VEGF-om posredovano preživljenje stanica (Byrne i sur., 2005). Integrini/stanični adhezijski receptori kao što je endotelna specifična adhezijska molekula $\alpha v\beta 3$ također imaju ulogu u prijenosu signala VEGF-a. Činjenica da VEGF djeluje kao kemoatraktant na endotelne stanice sugerira da ima važnu ulogu u migraciji i invaziji. VEGF također stimulira migraciju krvožilnih glatkih mišićnih stanica, monocita, mononuklearnih fagocita i polimorfonuklearnih stanica (Byrne i sur., 2005) te migraciju i invaziju nekih tumorskih stanica kao što su tumorske stanice dojke i leukemija. VEGF receptori VEGFR-1 i VEGFR-2 kao i NRP-ovi su uključeni u VEGF-posredovanu staničnu migraciju i invaziju (Byrne i sur., 2005; Dias i sur., 2000). U tumorima, povećanje migracije i invazije tumorskih stanica olakšava širenje tumorskih stanica na sekundarne organe odnosno metastaziranje. VEGF inducira staničnu migraciju aktiviranjem čimbenika kao što je fokalna adhezijska kinaza (FAK, engl. *focal adhesion kinase*) i paksilin, ali i pomoću PI3 kinaze/Akt signalnog puta (Slika 10). Aktivaciji FAK-u posreduje c-terminalna regija VEGF-R2 (Byrne i sur., 2005). Aktivacija p38/MAPK stresnog signalnog puta pomoću VEGF-a također dovodi do migracije stanica i p38 inhibitori smanjuju migraciju stanica (Rousseau i sur., 1997). Upotrebom VEGF

mutanata utvrđeno je da samo VEGFR-2, a ne i VEGFR-1 dovodi do p38 fosforilacije što ukazuje da je VEGFR-2 glavni posrednik stanične migracije endotelnih stanica (HUVEC) (Byrne i sur., 2005). S druge strane, aktivacija VEGFR-1 nije utjecala na migraciju endotelnih stanica goveđe aorte (Byrne i sur., 2005).



Slika 10. Mehanizam djelovanja VEGF-a (preuzeto i prilagođeno: Taimeh i sur., 2013) Apoptoza je inhibirana fosforilacijom kaspaze-9. Vazodilacija se promiče putem eNOS aktivacije i proizvodnje NO. Aktiviranje MAPK i ERK potiče staničnu proliferaciju, adheziju i migraciju. **Kratice:** Akt / PKB, protein kinaza B; DAG, diacilglicerol; eNOS, dušik oksid sintaza; ERK, izvanstanična signalom regulirana kinaza; FAK, fokalna adhezijska kinaza;

GRB2, receptor čimbenik rasta vezan za protein 2; HSP, protein toplinskog šoka; IP3, inozitol trifosfat; MAPK, mitogen-aktivirana protein kinaza; NO, dušikov oksid; P, fosforilacija; PG, prostaglandin; PI3K, fosfatidilinozitid 3-kinaza; PIP2, fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat; PKC, protein kinaza C; PLC, fosfolipaza C; RAS, sarkom štakora; VEGF, čimbenika rasta krvožilnog endotela; VRAP, protein povezan s VEGF receptorom.

Transkripcija i ekspresija VEGF-A potaknuta je kao odgovor na hipoksiju, niski pH, aktiviranje onkogena (npr. RAS, SRC, EGFR, HER2), alternativno cijepanje specifičnih tumor supresor gena (npr. PTEN, p53, VHL), različite upalne citokine i čimbenike rasta te hormone poput estrogena (Fontanella i sur., 2014; Shibuya, 2014). Transkripcijski čimbenici HIF-1α i HIF-1β stalno se proizvode, ali se HIF-1α u uvjetima normoksije (aerobni uvjeti) razgrađuje proteosomima; pri visokoj koncentraciji kisika je labilan, dok je u uvjetima hipoksije stabiliziran (Kallio i sur., 1999), a ovaj put ovisi o Von Hippel-Lindau produktu gena (Maxwell i sur., 1999). HIF-1α i HIF-2α heterodimeriziraju s arilnim ugljikovodičnim nuklearnim translokatorom (HIF-1β ili 2β) u jezgri pri čemu nastaje kompleks HIF-1 α/β koji se veže za regiju VEGF promotora/pojačivača čime se potiče oslobađanje VEGF-a i njegov izražaj u većini tipova stanica. Indukcija hipoksije, posebno je karakteristična za VEGF-A u odnosu na ostale članove VEGF obitelji i druge angiogene čimbenike. Transkripcija VEGF u uvjetima normoksije aktivirana je od strane mnogih onkogena uključujući H-ras i nekoliko transmembranskih tirozin kinaza kao što su receptor epidermalnog čimbenika rasta i ErbB2 (Okada i sur., 1998). Ovi putevi zajedno dovode do značajno pojačane regulacije VEGF-A u tumorima u odnosu na normalna tkiva i često su od prognostičke važnosti (Gaspirini i sur., 1997).

VEGF je izražen u različitim stanicama i tkivima, kao što su: poprečnoprugasti i srčani mišići (Richardson i sur., 1997; Sugishita i sur., 2000), hepatociti (Yamane i sur., 1994), osteoblasti (Goad i sur., 1996), neutrofili (Gaudry i sur., 1997), makrofagi (McLaren i sur., 1996), keratinociti (Diaz i sur., 2000), smeđe adipozno tkivo (Asano i sur., 1997), $CD34^+$ matične stanice (Bautz i sur., 2000), endotelne stanice (Namiki i sur., 1995), fibroblasti i glatke mišićne stanice (Nauck i sur., 1997). Hipoksija i citokini poput IL-1, IL-6, IL-8, onkostatina M i TNF-α (Angelo i Kurzrock, 2007; Byrne i sur., 2005; Robinson i Stringer, 2001) potiču ekspresiju VEGF-a.

Kod bolesnika, VEGF se može otkriti u uzorcima plazme i seruma, s time da se u serumu nalazi u mnogo višim razinama (Banks i sur., 1998). Trombociti ispuštaju VEGF nakon agregacije što može biti jedan od glavnih izvora isporuke VEGF-a tumoru (Pinedo i sur., 1998). Nekoliko istraživanja pokazala su da se veza između visoke razine VEGF-a u serumu i loše prognoze bolesnika oboljelih od raka može povezati s povišenim brojem trombocita. Mnogi tumori oslobađaju citokine koji mogu stimulirati proizvodnju megakariocita u koštanoj srži i povećati broj trombocita što u konačnici može rezultirati neizravnim povećanjem isporuke VEGF tumorima (Salgado i sur., 1999).

VEGF je najpoznatiji po svojoj ulozi u procesu formiranja krvožilja. Tijekom embriogeneze, VEGF regulira proliferaciju, migraciju i preživljenje endotelnih stanica i razvoj embrija (Byrne i sur., 2005; Robinson i Stringer, 2001) čime se regulira gustoća i veličina krvnih žila, ali pritom nema nikakvu ulogu u određivanju uzorka vaskularizacije. Osim toga, VEGF potiče stvaranje kosti regrutiranjem osteoblasta i hondroblasta te je također kemoatraktant monocita (Breier, 2000; Dai i Rabie, 2007). U postnatalnom razdoblju, VEGF održava cjelovitost endotelnih stanica te je snažan mitogen za mikro- i makrovaskularne endotelne stanice. Nadalje, VEGF ima ulogu i u zacjeljivanju rana kod odraslih stvaranjem novih krvnih žila (vaskularno remodeliranje), vazomotornom odgovoru, energetskom metabolizmu, u upalnim procesima zatim kod stvaranja novih krvnih žila koje su dio kolateralne cirkulacije radi zaobilaženja blokiranih krvnih žila (ateroskleroza), dijabetičkoj retinopatiji, reumatoidnom artritisu te u reproduktivnom ciklusu (ovulacija) i trudnoći žena (Byrne i sur., 2005), dok u bolesnom tkivu VEGF pospješuje propusnost krvnih žila. Kod zacjeljivanja rana, aktivirani trombociti oslobađaju nekoliko citokina uključujući VEGF nakon ozljede koji zatim privlači cirkulirajuće neutrofile i monocite na mjesto ozljede kao dio normalnog upalnog odgovora. Osim toga, VEGF ima važnu ulogu u vaskulogenezi regrutacijom endotelnih progenitornih stanica (angioblasta) iz koštane srži, hematopoetskih matičnih stanica radi stvaranja endotelnih žila (Byrne i sur., 2005), ali isto tako VEGF potiče pericite da oblažu i stabiliziraju vaskulaturu (Byrne i sur., 2005).

U *in vivo* i *in vitro* uvjetima, VEGF potiče permeabilnost, mitogenezu i rast endotelnih stanica te staničnu migraciju (Jakeman i sur., 1992). Utvrđeno je da povećana ekspresija VEGF-a može doprinijeti patogenezi raznih bolesti poput reumatoidnog artritisa, psorijaze (Koch i sur., 1994), dijabetičke retinopatije, rastu tumora, njegovoj invaziji i metastaziranju. Tako je primjerice dijabetička retinopatija povezana s visokim intraokularnim razinama VEGF-a. S

druge strane, inhibicija funkcije VEGF-a može dovesti do neplodnosti blokiranjem funkcije korpus luteuma (Ferrara i sur., 1998).

Solidni tumori ne mogu dalje rasti nakon što dosegnu određenu veličinu bez odgovarajuće opskrbe krvlju; stoga tumori koji izražavaju VEGF imaju sposobnost nesmetanog rasta i metastaziranja potičući ekstravazaciju i angiogenezu (Thurston, 2002; Weis i Cheresh, 2005). VEGF je od kritične važnosti u tumorskoj angiogenezi zbog: važne uloge u stimulaciji staničnog preživljenja, proliferacije, mitogeneze, migracije, diferencijacije endotelnih progenitornih stanica, krvožilne propusnosti, mobilizacije endotelnih progenitornih stanica u perifernu cirkulaciju, inhibicije maturacije i imunomodulacije.

Genetske promjene i tumorski mikrookoliš (hipoksija, acidoza, prisutnost slobodnih radikala i citokina) jasno je vezan uz brojne abnormalnosti u ekspresiji i signalizaciji VEGF-a i njegovih receptora. Osim parakinog djelovanja VEGF-a kojeg luče tumorske stanice radi privlačenja i stimuliranja proliferacije endotelnih stanica, pokazalo se je da VEGF može također djelovati autokrino imajući učinak preživljenja/zaštite na brojne vrste stanice uključujući endotelne stanice, embrionalne matične stanice i hematopoetske matične stanice (Byrne i sur., 2005), ali i na same tumorske stanice (Byrne i sur., 2005). Dias i sur. (2001) pokazali su da inhibicija i parakrinog i autokrinog VEGF signalizacijskog puta je potrebna za postizanje potpune remisije humanog ksenopresatka leukemije. Pokazalo se je da tumorske stanice luče povišene razine VEGF-a u stresnim uvjetima kao što su hipoksija, zračenje, kemoterapija i izgladnjivanje nedostatkom seruma (*in vitro*) (Byrne i sur., 2005). Stoga zračenje ili kemoterapija mogu doprinjeti većem preživljenju tumorskih stanica zbog povišenog VEGF-a i učiniti ih manje osjetljivima na konvencionalnu kemoterapiju i zračenje (Byrne i sur., 2005).

Različiti terapijski pristupi koriste se kako bi se antagoniziralo djelovanje angiogeneze tumora posredovane VEGF-om (Fontanella i sur., 2014; Grothey i Galanis, 2009; Shibuya, 2014). VEGF predstavlja glavni angiogeni čimbenik koji sudjeluje u stimulaciji i aktivaciji MMPs, kao i u aktivaciji antiapoptotičkog gena Bcl-2 (Lamoreaux i sur., 1998).

Utvrđeno je da su cirkulirajuće razine VEGF-a u korelaciji s napredovanjem bolesti u autoimunim bolestima poput reumatoidnog artritisa, multiple skleroze i sistemskog eritemskog lupusa (Carvalho i sur., 2007).

Nadalje, cirkulirajući VEGF-A povišen je kod karcinoma dojke, pluća i probavnog sustava (Byrne i sur., 2005), ali i kod karcinoma mozga, gušterače, jajnika, mokraćnog mjehura, bubrega (Podar i Anderson, 2005) i multiplog mijeloma (Podar i sur., 2001). Također je pronađeno da je VEGF prisutan i u ascitesnoj tekućini kod transplantiranih tumora miša i to 2 ili 5 dana nakon iniciranja 10^6 tumorskih stanica, pa se smatra da je lučenje VEGF-a od strane tumorskih stanica odgovorno za iniciranje i održavanje ascitesnog oblika rasta tumora (Nagy i sur., 1995).

VEGF ima važnu ulogu i u hematopoezi gdje utječe na diferencijaciju raznih staničnih linija. Brojna istraživanja pokazuju smanjenje ukupnog broja preživljenja i preživljenja bez bolesti kod onih tumora koji prekomjerno eksprimiraju VEGF. Prekomjerna ekspresija VEGF-A može biti početni korak u procesu stvaranja metastaza. Iako je VEGF-A povezan s lošim preživljenjem, njegov točan mehanizam djelovanja u progresiji tumora ostaje još uvijek nejasan.

Povećana VEGF proizvodnja u tumorima povezana je s povećanjem krvožilja tumora, metastaza, kemorezistencije i lošijom prognozom u odnosu na VEGF-negativne tumore. Krvožilje tumora je slučajno, neorganizirano i sastoji se od propustljivih krvnih žila s prekomjernim grananjem. Takvo krvožilje je strukturno i funkcionalno abnormalno što dovodi do slabe isporuke lijeka i stvaranja hipoksičnih područja unutar tumora. Intersticijski tlak tekućina je povišen u tumoru zbog hiperpermeabilnih žila koje također smanjuju dostavu lijeka (Byrne i sur., 2005). Ciljanje krvožilja tumora lišava tumorske stanice hranjivih tvari i kisika potrebnog za rast što bi u konačnici trebalo inhibirati i metastaze. Nažalost, ne postoje specifični antiangiogeni spojevi za tumore tako da do danas liječenje samo antiangiogenim pristupom nije u stanju uzrokovati regresiju tumora. Međutim, ti će se spojevi vjerojatno pokazati korisnima u stabilizaciji same bolesti. Povećanje doze takvih spojeva može imati štetan učinak na normalno krvožilje pa se time ograničava njihova upotreba. U kombinaciji s konvencionalnom kemoterapijom, antiangiogeni pristup ima sinergistički učinak (Fontanella i sur., 2014).

Postoje različiti pristupi u razvoju lijekova koji blokiraju angiogenezu, a uključuju antagoniste VEGF-a ili njegovih receptora, selektivne inhibitore tirozin-kinaze, ciljane lijekove i toksine za VEGF receptore (Fontanella i sur., 2014; Saleh i sur., 1996) i gensku terapiju reguliranu istim putem hipoksije koji kontrolira proizvodnju VEGF-a (Dachs i sur., 1997).

Od lijekova koji inhibiraju djelovanje VEGF-a, u kliničkim pokusima najširu upotrebu ima specifično monoklonalno protutijelo za VEGF receptor nazvano bevacizumab (tvornički naziv Avastin, Genentech) koje se nalazi u različitim fazama kliničkog ispitivanja u terapiji dijabetičke retinopatije, kolorektalnog karcinoma, karcinoma pluća ne-malih stanica, karcinoma dojke, bubrega, glioblastoma i drugih kliničkih stanja (Dedić Plavetić i sur., 2003; Fontanella i sur., 2014). Također testirani su i topljivi analozi VEGF receptora kao što je VEGF TRAP, male molekule VEGF inhibitora kao što su SU5416, SU11248, PTK787/ZK222584 te ribozimi kao što je angiozim (Byrne i sur., 2005). Ciljanje novog VEGF receptora NRP-1 s peptidima također je polučilo neke obećavajuće pretkliničke rezultate (Barr i sur., 2005). Stoga ciljanje VEGF signalnog puta može biti od velike terapijske važnost za mnoge bolesti.

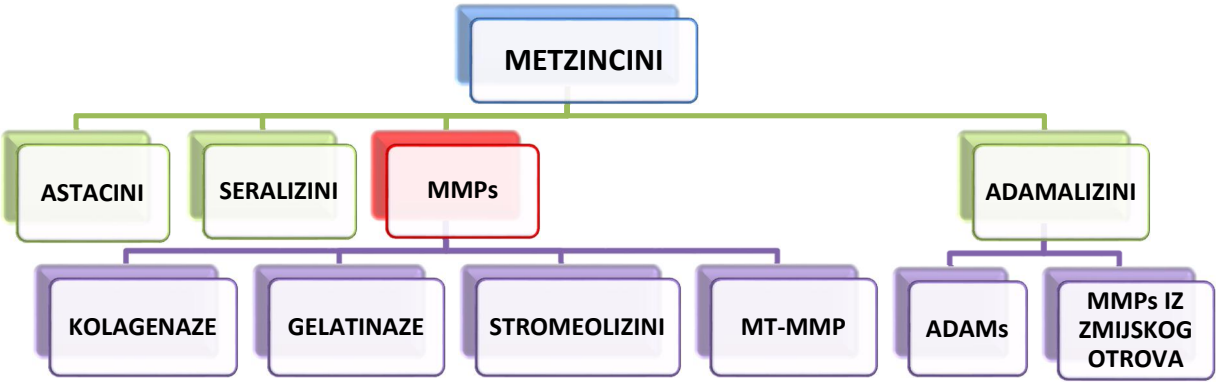
2.1.2.3. Matriks metaloproteinaze (MMPs)

Matriks metaloproteinaze (MMPs, engl. *matrix metalloproteinases*) poznate i pod imenom matriksini čine porodicu s više od 28 strukturno sličnih endopeptidaza koje sadrže cink (Zn^{2+}) ovisan o kalciju (Ca^{2+}), a koje razgrađuju bazalnu membranu i različite komponente proteina izvanstaničnog matriksa (ECM, engl. *extracellular matrix*) (Pittayapruek i sur., 2016). Osim ECM, postoje i drugi supstrati MMPs poput prekursora i receptora čimbenika rasta, adhezijskih receptora, citokina i njihovih receptora. Obitelj humanih MMPs sastoji se od sekretornih i membranski vezanih MMPs (MT-MMPs). Otkrivene su 60-tih godina prošlog stoljeća kod punoglavaca, a označavaju se brojevima prema redoslijedu otkrivanja. Od 28 MMPs opisanih u kralježnjaka, 23 MMPs su nađene kod ljudi. Izlučuju ih keratinociti i dermalni fibroblasti kao odgovor na višestruke podražaje poput oksidacijskog stresa, UV zračenja i citokina (Pittayapruek i sur., 2016). Proteolitička aktivnost MMPs utječe na ključne stanične procese kao što su proliferacija, migracija i adhezija stanica, morfogeneza, ali i na mnoge temeljne fiziološke događaje koji uključuju remodeliranje tkiva kao što su angiogeneza, rast i razvoj kostiju, zacjeljivanje rana, embrionalni razvoj, razvoj i diferencijacija gotovo svih organa, reprodukcija, involucija maternice i dojke (Page-McCaw i sur., 2007; Pittayapruek i sur., 2016). Međutim, sve veća važnost ovih proteaza proizlazi iz velikog broja patoloških stanja u koja su uključeni ovi enzimi poput karcinogeneze, kardiovaskularnih bolesti (ateroskleroza, aneurizma aorte,

moždani udar, intracerebralno krvarenje-hemoragija), neurodegenerativnih bolesti, multiple skleroze, parodontalnih bolesti, preranog starenja kože, različitih oblika upalnih patoloških bolesti (artritis), alergija, autoimunih bolesti i dr. (Sorsa i sur., 2006). Stoga se javlja potreba za preciznom prostornom i vremenskom regulacijom MMPs radi održavanja odgovarajuće homeostaze izvanstaničnog okruženja.

MMPs pripadaju metzincin superobitelji metaloproteinaza koje posjeduju katalitički atom Zn u svom aktivnom mjestu i konzervirani ostatak metionina (Slika 11) (Gomis-Rüth, 2009). Široko su zastupljene u svim carstvima živih bića, a vjerojatno su se razvili iz proteina s jednom domenom koji je podvrgnut uzastopnim ciklusima umnažanja, genskoj fuziji i miješanju egzona radi dobivanja višedomenske strukture i funkcionalne raznolikosti (Fanjul-Fernández i sur., 2010).

Bazalna membrana i intersticijalna stroma kao dio ECM-a izgrađene su od različitih proteina kao što su fibrilarni kolagen, elastin, laminin, fibronektin, ali i od brojnih proteoglikana i glikozaminoglikana (Nagase i Woessner, 1999).



Slika 11. Podjela metzincina

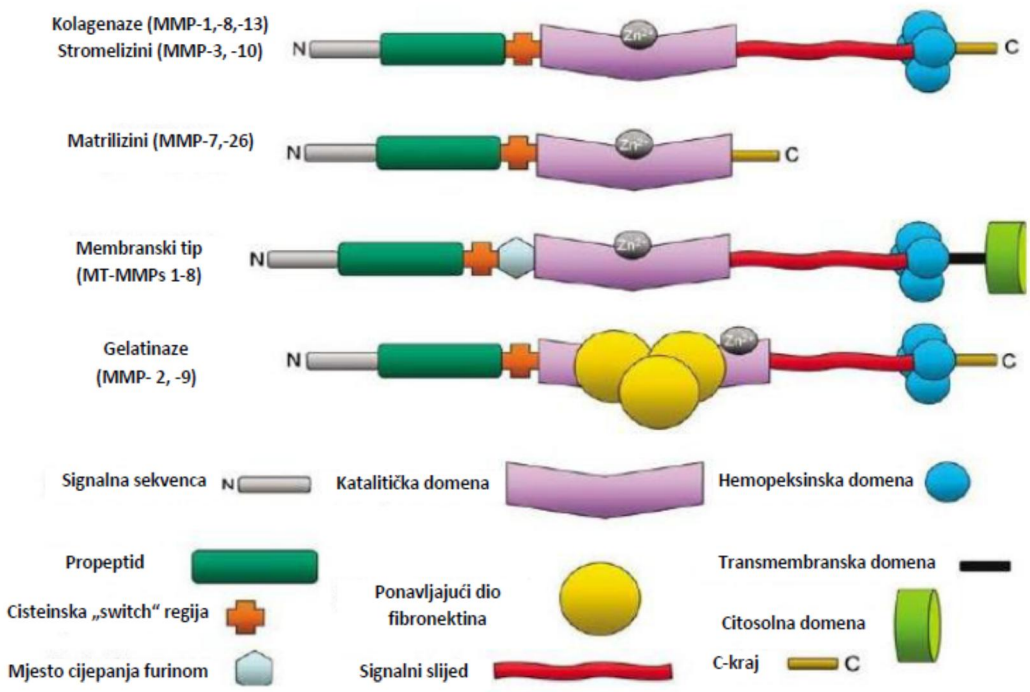
Različite vrste stanica izlučuju ih u neaktivnom (latentnom) obliku kao topljive proenzime (zimogeni ili pro-MMPs) uskladištene u zimogenim zrncima koji se aktiviraju zahvaljujući Zn^{2+} ionu smještenom u središtu molekule i prisustvu Ca^{2+} iona te proteolitičkom uklanjanju NH_2-terminalnog propeptida (Radenković i sur., 2010). Enzimska aktivnost metaloproteinaza strogo je kontrolirana na više nivoa i disregulacija ove aktivnosti dovodi do nekontrolirane razgradnje ECM-a koja je u osnovi procesa remodeliranja krvnih žila (Radenković i sur., 2010). Izuzetak su MMP-9 i neutrofilne kolagenaze koje su smještene u

sekundarnim i tercijarnim granulama kako bi se mogle što lakše osloboditi. U normalnim okolnostima konstitutivna ekspresija MMPs je niska i ne dolazi do njihovog nakupljanja u tkivima, ali u određenim fiziološkim i patološkim uvjetima koji podrazumijevaju remodeliranje matriksa, njihova ekspresija se povećava (Radenković i sur., 2010). Njihova aktivnost regulirana je skupinom endogenih prirodnih tkivnih inhibitora MMP (TIMP, engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Pittayapruek i sur., 2016), heparinom, RECK inhibitorom, α2-makroglobulinom koji se s visokim afinitetom vežu na katalitičko mjesto, ali i samom autorazgradnjom i endocitozom.

Do sada su kod čovjeka otkrivena 4 homologna TIMP-a (TIMP1-TIMP4) s molekulskom masom od 22-29 kDa, a stvaraju ih različite stanice poput polimorfonuklearnih leukocita, makrofaga i fibroblasta. TIMP-1 i TIMP-3 su glikoproteini, a TIMP-2 i TIMP-4 ne sadrže ugljikohidrate. Sva 4 TIMPs imaju različitu ekspresiju i raspodjelu u tkivu te mogu biti odgovorni za regulaciju aktivnosti velikog broja obitelji proteaza *in vivo*, uključujući metaloproteinaze obitelji disintegrina i ADAMs.

Osim, TIMPs, ekspresija i aktivnost MMPS-a regulirana je i drugim čimbenicima poput različitih hormona, citokina, kemokina, čimbenika rasta (IL-1, IL-4, IL-6), receptora čimbenika rasta (EGF, VEGF, TGF-β), TNF-α, izvanstaničnih MMP pokretača (EMMPRINs), ECM-a, fizikalnog stresa, kemijskih tvari, pro- i antiapoptotičkih molekula (Konstantinopoulos i sur., 2008), ali i regulatornim mehanizmima kao što su transkripcija gena (c-fos/c-jun protoonkogeni), aktivacija proenzima i endogena inhibicija koji djeluju koordinirano u ograničavanju raznih proteolitičkih aktivnosti MMPs. Post-transkripcijska regulacija MMPs odvija se kroz stabilizaciju mRNA kao i kroz njihovu kontrolu lučenja. Također postoje i sintetski MMP inhibitori, od kojih su neki trenutno i u kliničkim ispitivanjima za liječenje raka, ali imaju neželjene nuspojave (Coussens i sur., 2002). Narušavanje ravnoteže između MMPs i TIMP vodi nekontroliranoj razgradnji ECM-a te razaranju ili abnormalnoj reparaciji tkiva koja je u osnovi različitih patoloških stanja (Nagase i Woessner, 1999).

Općenito, MMPs se sastoje od propeptidne domene (oko 80 aminokiselina), katalitičke metaloproteinazne domene (oko 170 aminokiselina), vezujućeg peptida varijabilnih duljina (također poznat kao "zglobna regija") i hemopeksinske domene (oko 200 aminokiselina) (Murphy i Nagase, 2008). Međutim, nisu sve domene bitne za MMPs; nekima nedostaje vezujući peptid i hemopeksinska domena (Slika 12).



Slika 12. Struktura MMPs (preuzeto i prilagođeno: https://www.slideshare.net/dduberkar/matrixmetalloproteinase)

MMPs mogu biti uključene u kontrolu stanične smrti, upalu, infekcije i angiogenezu kroz oslobađanje različitih bioaktivnih molekula (TNF-α, IL-6, L-selektin) s površina stanica, ali i cijepati proteine koji nisu dio ECM-a (Pittayapruek i sur., 2016). MMPs se na temelju specifičnosti svojih supstrata i funkcije dijele na: **a) gelatinaze** (MMP-2, MMP-9), **b) kolagenaze** (MMP-1, MMP-8, MMP-13), **c) stromelizine** (MMP-3, MMP-10, MMP-11), **d) membranske (MT) vrste MMP** (MT1-MMP ili MMP-14, MT2-MMP ili MMP-15, MT3-MMP ili MMP-16, MT4-MMP ili MMP-17, MT5-MMP ili MMP-24, MT6-MMP ili MMP-25), **e) matrilizine** (MMP-7, MMP-26) te **e) ostale** kao što su metaloelastaza (MMP-12), RASI-1 (MMP-19), enamelizin (MMP-20), epilizin (MMP-28) i dr. (Tablica 5) (Pittayapruek i sur., 2016).

Tablica 5. Članovi MMPs obitelji

KLASA	MMP	NAZIV	SUPSTRAT
KOLAGENAZE	MMP-1	kolagenaza-1	kolagen I, II, III, VII, VIII, X, gelatin, fibronektin
	MMP-8	kolagenaza-2	kolagen I, II, III, V, VII, VIII, X, agrekan, gelatin
	MMP-13	kolagenaza-3	kolagen I, II, III, IV, V, VII, IX, X, XIV, gelatin
	MMP-18	kolagenaza-4	kolagen I, gelatin
GELATINAZE	MMP-2	gelatinaza A	gelatin, kolagen I, II, III, IV, V, VII, X, elastin
	MMP-9	gelatinaza B	gelatin, kolagen III, IV, V, VII, X, XI, elastin
STROMELIZINI	MMP-3	stromelizin-1	kolagen II, III, IV, V, VII, IX, X, XI, gelatin
	MMP-10	stromelizin-2	kolagen IV, laminin, fibronektin, elastin, gelatin
	MMP-11	stromelizin-3	kolagen IV, fibronektin, laminin, agrekan, gelatin
MATRILIZINI	MMP-7	matrilizin-1	fibronektin, laminin, kolagen IV, gelatin, elastin
	MMP-26	matrilizin-2	fibrinogen, fibronektin, kolagen IV, gelatin
MT-MMP	MMP-14	MT1-MMP	kolagen I, II, III, gelatin, fibronektin, laminin
	MMP-15	MT2-MMP	gelatin, fibronektin, laminin, proMMP-2
	MMP-16	MT3-MMP	gelatin, fibronektin, laminin, proMMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	fibrinogen, fibrin, proMMP-2
	MMP-24	MT5-MMP	gelatin, fibronektin, laminin, proMMP-2
	MMP-25	MT6-MMP	gelatin
OSTALE	MMP-12	metaloelastaza	elastin, fibronektin, kolagen IV, gelatin
	MMP-19	RASI-1	agrekan, elastin, fibrilin, kolagen IV, gelatin
	MMP-20	enamelizin	agrekan
	MMP-21	X-MMP	agrekan, gelatin
	MMP-23	drugi enzimi	gelatin, kazein, fibronektin
	MMP-27	C-MMP, MMP-22	gelatin
	MMP-28	epilizin	kazein
	MMP-29	drugi enzimi	nepoznat

(preuzeto i prilagođeno: Snoek-van Beurden i Von den Hoff, 2005)

MMPs su kategorizirane prema organizaciji njihovih peptidnih domena, specifičnosti supstrata te njihovoj sličnosti aminokiselinskog slijeda (8, 12, 17, 22-24, 85-87). MMP-metaloproteinaze; MT-MMP-membranske metaloproteinaze (engl. *membrane-type matrix metalloproteinase*).

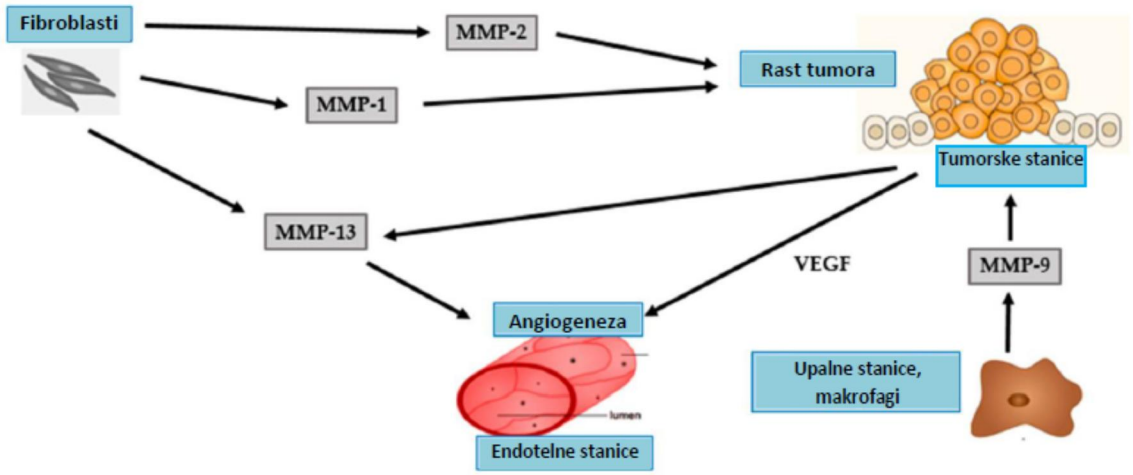
Kolagenaze (MMP-1, MMP-8 i MMP-13) prepoznaju supstrat kroz hemopeksinsku domenu i mogu razgraditi fibrilni kolagen (Pittayapruek i sur., 2016). Gelatinaze (MMP-2 i MMP-9) su sposobne razgraditi niz ECM komponenti kao što su kolagen tipa I i IV (Pittayapruek i sur., 2016). Stromelizini (MMP-3, MMP-10 i MMP-11) imaju domene

uređene slično kolagenazama; međutim, ne cijepaju fibrilni kolagen tipa I (Pittayapruek i sur., 2016). Matrilizini (MMP-7 i MMP-26) nemaju domenu sličnu hemopeksinu i razaraju kolagen tip IV, ali ne i kolagen tip I (Pittayapruek i sur., 2016). MT-MMPs (MMP-14, MMP-15 i MMP-16) imaju dodatnu C-terminalnu transmembransku domenu s kratkim citoplazmatskim dijelom. I MMP-14 i MMP-16 razaraju fibrilni kolagen tipa I (Pittayapruek i sur., 2016).

Invazija tumora i metastaziranje je proces koji se odvija u više stupnjeva, a uključuje proteolitičku razgradnju ECM-a, promjenu u međureakciji stanica-stanica i stanica-ECM te migraciju tumorskih stanica kroz bazalnu membranu. MMPs reguliraju urođenu imunost, pokazuju antiapoptotička svojstva te potiču progresiju tumora kroz poticanje rasta tumorskih stanica, njihove migracije, invazije, angiogeneze i metastaziranja kako na primarnom mjestu tako i kod udaljenih metastaza. Tijekom ovih procesa proteolitički enzimi djeluju na različitim razinama: razlažu bazalnu membranu dopuštajući invaziju tumorskih stanica i izlaganje skrivenih mjesta unutar matriksa molekule, povećavaju bioraspoloživost čimbenika rasta i citokina (Bergers i sur., 2000) i reguliraju funkciju bioaktivnih molekula proteolitičkom obradom (Pozzi i sur., 2000). U prilog tomu govori činjenica da stanice raka jajnika izražavaju MMP-2 i MMP-9, a njihova povećana ekspresija povezana je s njihovim invazivnim i metastatskim potencijalom (Stack i sur., 1998). Osim toga, MMP-2 i MMP-9 izražavaju se u ascitesu i plazmi osoba s rakom jajnika (Manenti i sur., 2003). Također, utvrđeno je da stromalna MMP-9 doprinosi malignom ponašanju karcinoma jajnika poticanjem na stvaranje novih krvnih žila i rast tumora (Huang i sur., 2002). Prekomjerna ekspresija MMPs na animalnim modelima inducira staničnu hiperproliferaciju i povećava osjetljivost na tumorigenezu nakon aktivacije onkogena ili izlaganja kemijskim kancerogenima. S druge strane istraživanja su pokazala da kod životinja koje imaju ksenopresadak karcinoma jajnika u peritonealnoj šupljini nakon obrade s MMP inhibitorima dolazi do stvaranja manjeg volumena ascitesa i produženja životnog vijeka (Giavazzi i sur., 1998).

Utvrđeno je da je proces razgradnje ECM pomoću MMPs uključen u patogenezu širokog spektra kardiovaskularnih bolesti uključujući i aterosklerozu, restenozu, kardiomiopatiju, kongestivni zastoj srca, infarkt miokarda i aneurizmu aorte (Radenković i sur., 2010).

Gelatinaze (kolagenaze tipa IV) MMP-2 i MMP-9 kao što im i samo ime govori imaju sposobnost razgradnje elastina i kolagena tipa IV koji su sastavni dijelovi strukture bazalne membrane jer posjeduju supstrat koji je specifičan za kolagen tipa IV. Na taj način MMP-2 i MMP-9 mogu utjecati na rano remodeliranje tkiva nakon oštećenja parenhima. U katalitičkoj domeni gelatinaze osim iona cinka sadrže i dodatnu domenu s tri ponavljajuća kaskadna spoja slična fibronektinu tipa II preko kojih stupaju u međureakciju s kolagenima i gelatinima, uzrokuju njihovo cijepanje i razgradnju (Gomis-Rüth, 2009), što nam govori da ti enzimi imaju također ključnu ulogu u remodeliranju kolagenskog ECM-a, ali i u samoj invaziji tumora (Pittayapruek i sur., 2016). Dakle, gelatinaze razaraju širok spektar ECM molekula kao što su kolagen tipa I, IV, V, VII, IX, elastin, fibronektin, agrekan, vitronektin, laminin (Overall, 2002), ali također i mnoge druge molekule koje nisu ECM karaktera kao što je pro-TNF-α, TGF-β (Yu i Stamenkovic, 2000), pro-IL-1β, pro-IL-8 i monocitni kemoatraktant proteina 3 (MCP-3) (McQuibban i sur., 2002). Također, ovi enzimi sposobni su stvoriti ili otpuštati nekoliko čimbenika s pro- ili antiangiogenim svojstvima (Egeblad i Werb, 2002). MMPs reguliraju sintezu i izlučivanje brojnih citokina, čimbenika rasta, hormonskih receptora i staničnih adhezijskih molekula kojima utječu na imunosni odgovor i angiogenezu što dovodi do proliferacije i održavanja primarnih i metastatskih tumora (Pittayapruek i sur., 2016).



Slika 13. Uloga MMPs kod karcinoma bazalnih stanica i rasta tumora (preuzeto i prilagođeno: Pittayapruek i sur., 2016)

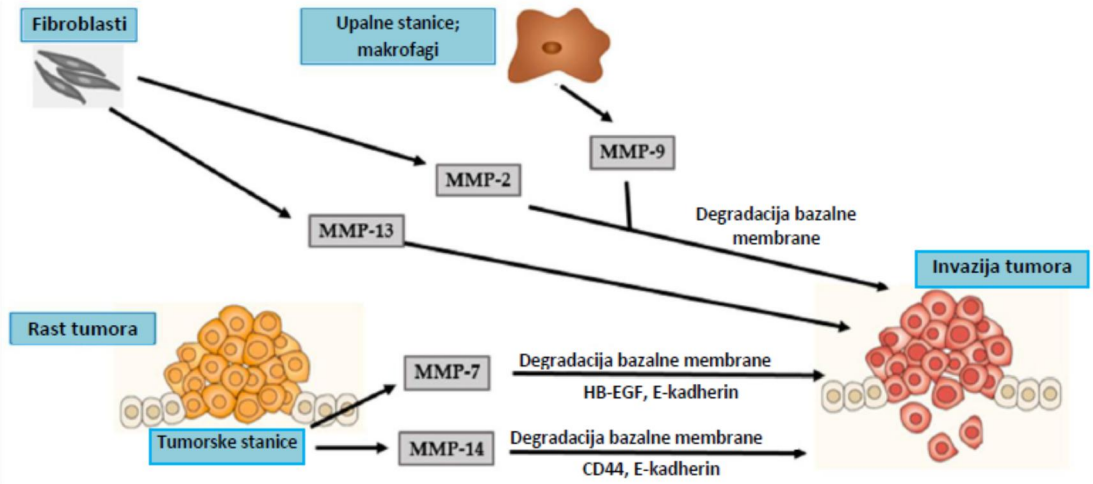
Matriks metaloproteinaza 2 (MMP 2) (72 kDa) je također poznata i pod imenom gelatinaza A ili kolagenaza tipa IV. Radi se o metaloproteinazi koja specifično cijepa kolagen tipa IV, glavnu strukturnu komponentu temelja membrane (Nagase i sur., 1992). MMP-2 je vjerojatno efektorska molekula menstrualnog oštećenja endometrija budući da ima ulogu u menstrualnom oštećenju endometrija, regulaciji vaskularizacije i upalnom odgovoru (Irwin i sur., 1996). Otkriveno je da je potaknuta ekspresija MMP-2 nakon vezanja kancerogenih stanica jajnika (OvCa) za mezotelium. Glavni izvor MMP-2 su fibroblasti, keratinociti, epitelne stanice, hondrociti i monociti.

MMP-2 je najzastupljenija MMPs (Murphy i Crabbe, 1995) i njezina ekspresija podudara se s invazivnim fenotipom: MMP-2 je visoko izražena u stromalnim stanicama u blizini invazivnog metastaziranog tumora (Pyke i sur., 1992), a lokalizirana je na površini angiogenih endotelnih stanica (Brooks i sur., 1996). Većina MMPs izlučuje se kao neaktivni zimogeni (proMMPs) koji zahtijevaju proteolitičku aktivnost serinskih proteaza kao što su plazmin i tripsin (Nagase i sur., 1991). Međutim, MMP-2 nedostaje motiv za prepoznavanje serinske proteaze (Okada i sur., 1990) i aktivira se na površini invazivnih stanica pomoću multimernog receptora/aktivacijskog kompleksa koji se sastoji od tkivnog inhibitora metaloproteinaze 2 (TIMP-2), MMP membranskog tipa 1 (MT1-MMP) i integrina αvβ3. Pretpostavlja se da se povezivanje MMP-2 za taj receptor/aktivacijski kompleks odvija u 2 koraka: C-terminalan domena MMP-2 veže se za TIMP-2 koji se povezuje s membranski vezanim MT1-MMP (Zucker i sur., 1998). MMP-2 igra važnu ulogu u stvaranju prikladnog mikrookruženja za proliferaciju tumorskih stanica i pridonosi epitelno-mezenhimalnoj tranziciji (EMT, engl. *epithelial–mesenchymal transition*) (Pittayapruek i sur., 2016). Tranzicija ovisi o uklanjanju adhezijskih molekula, kao što su kadherini i integrini, te o značajnoj reorganizaciji citoskeleta, pri čemu oba procesa olakšavaju odvajanje malignih stanica od primarnog tkiva (Pittayapruek i sur., 2016).

Matriks metaloproteinaza 9 (MMP-9) (92 kDa), također je poznata i kao kolagenaza tipa IV ili gelatinaza B (GELB). MMP-9 stvaraju uglavnom upalne stanice kao što su makrofagi, normalni alveolarni makrofazi, polimorfonuklearni leukociti (neutrofili), mastociti, osteoklasti, epitelne stanice i fibroblasti, a u manjoj mjeri tumorske stanice. Makrofagi koji se nalaze unutar tumorskog okoliša zovu se tumoru pridruženi makrofagi (TAMs) te predstavljaju tip M2 makrofaga koji podržavaju rast tumora (Pittayapruek i sur.,

2016). Osim izlučivanja proteaza, TAMs mogu aktivirati COX-2 u tumorskim stanicama, a prekomjerna ekspresija COX-2 inducira lučenje angiogenih čimbenika kao što je VEGF i bFGF (Pittayapruek i sur., 2016).

Sundstrom i sur. (2004) predložili su da bi razina MMP-9 u plazmi mogla biti pokazatelj razgradnje srčanog izvanstaničnog matriksa, procesa koji je uključen u remodeliranje lijeve klijetke. Povišene vrijednosti gelatinaza, točnije MMP-2 i MMP-9 uočene su kod nekih bolesti, kao što su rak, bolesti kostiju, upalni poremećaji i vaskularne bolesti poput akutne koronarne bolesti, angine pectoris, ateroskleroze, aneurizme aorte, infarkta miokarda, arteriovenske malforamacije mozga (Hu i sur., 2007) iako je sam mehanizam nastanka još nepoznat (Slika 13, 14).



Slika 14. Uloga MMPs u invaziji tumorskih stanica kod karcinoma bazalnih stanica (preuzeto i prilagođeno: Pittayapruek i sur., 2016)

U prošlosti su testirani neki snažni inhibitori MMPs (MMPI) širokog spektra protiv tumorskog djelovanja, pri čemu su neki ušli u klinička ispitivanja, ali nijedan nije odobren za ljudsku upotrebu. Razlog tome bio je u planu izvedbe kliničkih ispitivanja budući da su MMPI bili učinkoviti na životinjskim modelima ranog stadija bolesti, a ispitivanja su provedena na ljudima u kasnoj fazi razvoja bolesti (Overall i López-Otín, 2002). Brojna istraživanja pokazala su da se inhibicija ekspresije MMPs i/ili inhibicija aktivnosti enzima MMPs može koristiti kao početna meta u sprječavanju metastaziranja tumora (Chien i sur., 2012).

Iako se velika pozornost posvećuje razvoju i djelovanju spojeva ili lijekova koji bi suprimirali njihovu ekspresiju i/ili aktivnost i time zaustavili migraciju i invaziju tumorskih stanica, još uvijek nedostaju protumetastatski spojevi.

Nekoliko istraživanja pokazala su da bi količina inhibitora NF-κB (IκB) mogla kontrolirati jezgrinu translokaciju NF-κB i time utjecati na ekspresiju MMP-2 kod nekolika vrsta ljudskih stanica (Park i sur., 2007). Ho i sur. (2013) pokazali su da galna kiselina inhibira metastaziranje tumorskih stanica želudca i invazivan rast kroz povećanje ekspresije RhoB, smanjenje regulacije AKT/malih GTPaza signala i inhibicije NF-κB aktivnosti te bi stoga galna kiselina mogla predstavljati snažno sredstvo u liječenju raka želudca.

Osim toga, lokalna primjena galne kiseline pokazala je da inhibira rak kože induciran s dimetilbenz[a] antracenom (DMBA)/krotonovim uljem kod Swiss albino miševa kroz povećanje antioksidativne obrane (GST, GSH, SOD, CAT, GPx), smanjenjem aktivnosti i ekspresije MMP-2 i MMP-9, sadržaja kolagena i LDH izoenzima (Subramanian i sur., 2014).

2.1.2.4. Učinak ROS-a na angiogenezu

Oksidacijski stres koji se definira kao neravnoteža između prooksidansa i antioksidativnog sustava, može biti i uzrok i posljedica mnogih vaskularnih komplikacija te služi kao jedan od biomarkera za takva stanja. Poznato je da se pomoću jednog elektrona u isto vrijeme kisik može reducirati na 4 komponente: superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikal i molekulu kisika (Turrens, 2003) pri čemu tijekom ove redukcijsko-oksidacijske (redoks) reakcije dolazi do stvaranja ROS-a kao intermedijera *in vivo*. Superoksidni anion najviše doprinosi stvaranju ROS-a i ključni je posrednik lančanih reakcija prijenosa elektrona u mitohondrijima. U pravilu se superoksidni anion brzo uklanja dismutacijom bilo spontano ili pomoću superoksid dismutaze (SOD) do vodikovog peroksida (Fukai i Ushio-Fukai, 2011; Turrens, 2003). Mijeloperoksidaze koje izlučuju neutrofili pretvaraju zatim vodikov peroksid i klorid u vrlo reaktivni hipoklorit. Za krvožilne stanice, osobito su važni superoksidni anion i vodikov peroksid budući da mogu aktivirati različite putove koji induciraju novi krvožilni rast ili dovode do njegove disfunkcije i razaranja (Bir i sur., 2012). U svim vrstama krvožilnih stanica može doći do stvaranja ROS-a uključujući endotelne stanice, glatke mišićne stanice, stanice povezivnog tkiva (lat. *tunica adventitia*), fibroblaste i perivaskularne adipocite (Touyz i Briones, 2011).

Unatoč štetnom djelovanju ROS-a pri visokim koncentracijama na većinu tkiva, naknadno je utvrđeno da oksidacijski stres ima i pozitivnu ulogu kod angiogeneze pri niskim ili prolaznim razinama ROS-a čime se aktiviraju signalni putevi koji potiču regeneraciju i rast (Maulik i Das, 2002; Yun i sur., 2009). Naime, pokretač fiziološki uravnotežene ili patološki prekomjerne ili nedostatne angiogeneze je manjak kisika i hranjivih tvari koji su potrebni tkivu što rezultira ciklusom hipoksije/reoksigenacije, koji potiče stvaranje reaktivnih vrsta kisika (ROS). U krvožilju, ROS može nastati bilo endogeno putem lančanih reakcija prijenosa elektrona u mitohondriju i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazom (Takac i sur., 2012; Touyz i Briones, 2011; Ushio-Fukai i Alexander, 2004) bilo egzogeno kao posljedica izlaganja štetnim spojevima u okolišu poput UV ili ionizirajućeg zračenja. U mitohondrijima, stanice troše više od 95 % kisika za dobivanje molekule vode u redoks reakcijama. U kompleksima I i III u transportnom lancu dolazi do prebrzog prijenosa elektrona do kisika što dovodi do redukcije kisika u superoksidni anion u manje od 4 %, stvarajući oksidacijski stres (Bir i sur., 2012; Turrens, 2003). NADPH oksidaza, enzim koji stvara superoksidni anion prenoseći elektrone s NADPH na kisik, poznat je kao glavni izvor ROS-a u mnogim vrstama stanica, uključujući endotelne stanice i glatke mišićne stanice (Bir i sur., 2012; Coso i sur., 2012; Takac i sur., 2012).

U mnogim uvjetima ROS potiče angiogenezu izravno ili neizravno kroz stvaranje aktivnih produkata oksidacije kao što su peroksidirani lipidi. Naime, jedna od glavnih posljedica prisutnosti ROS-a je peroksidacija proteina i lipida, što rezultira njihovim funkcionalnim modifikacijama (Guéraud i sur., 2010; Negre-Salvayre i sur., 2010). U uvjetima *in vivo*, peroksidacija lipida utječe na lipidne stanične membrane, uključujući dijelove višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acid*), fosfolipida koji su posebice skloni oksidaciji, stvarajući pritom niz novih sekundarnih biološki aktivnih spojeva (Guéraud i sur., 2010) koji mogu biti još razorniji od samog ROS-a (Negre-Salvayre i sur., 2010). Stoga, oksidacijski stres ne podrazumijeva samo proizvodnju i nakupljanje ROS-a već i oksidacijskim stresom inducirane metaboličke produkte koji su nastali peroksidacijom lipida i proteina.

U sustavnom procesu angiogeneze koji je iniciran proangiogenim čimbenicima (poput VEGF-a, PGF-a, PDGF-B, TGF-β, ANG-1, itd.) sudjeluje više različitih vrsta stanica kao što su endotelne, potporne, upalne i krvne stanice (Noonan i sur., 2008) koje su uključene u staničnu adheziju, migraciju, proliferaciju i diferencijaciju. U većini slučajeva, ako ne i kod svih,

angiogeneza je usko povezana s procesom mobilizacije upalnih stanica (Costa i sur., 2007) koji je kod fiziološke angiogeneze prolazan, dok kod patološke angiogeneze uključuje kontinuirano novačenje upalnih stanica poput neutrofila i monocita koje predstavljaju značajan izvor ROS-a (Schreml i sur., 2010) nastao putem oksidacijskog praska koji ima važnu ulogu tijekom različitih faza napredovanja tumora, od stadija inicijacije do vaskularizacije i metastaziranja. Štoviše, u većini patoloških procesa, oksidacijski stres djeluje kao dio mehanizma povratne sprege što mu daje još veće značenje u procesima (Reuter i sur., 2010). Smatra se da je tumorska angiogeneza potaknuta vodikovim peroksidom kojeg u velikim količinama stvaraju tumorske stanice (Yasuda i sur., 1999). Glavni mehanizam oksidacijskim stresom izazvane angiogeneze uključuje HIF-VEGF/VEGFR-2 signalni put u kojem egzogeni ROS stimulira indukciju ekspresije VEGF-a u različitim vrstama stanica, kao što su endotelne stanice, stanice glatkih mišića i makrofaga, dok sam VEGF čimbenik potiče migraciju i proliferaciju endotelnih stanica kroz povećanje unutarstanične razine ROS-a (Chua i sur., 1998; Wang i sur., 2011). Tako primjerice, vodikov peroksid inducira VEGF ekspresiju u stanicama glatkih mišića krvožilja kao i u endotelnim stanicama čime se potiče stvaranje angiogenog odgovora (Chua i sur., 1998). Istovremeno, VEGF dodatno potiče stvaranje ROS-a (točnije superoksidnog aniona) kroz aktivaciju NADPH oksidaze u endotelnim stanicama (Ushio-Fukai i Alexander, 2004). ROS također utječe na VEGF stimuliranu dimerizaciju i autofosforilaciju receptora VEGF-a (VEGFR-2) koja je potrebna za VEGFR-2 aktivaciju i angiogenezu (Colavitti i sur., 2002). Osim VEGF-ovisnog mehanizma nastajanja angiogeneze, izazvane oksidacijom postoji i VEGF-neovisan mehanizam stvaranja angiogeneze koji uključuje stvaranje produkata lipidne oksidacije i uključuje aktivaciju TLR2 receptora (engl. *Toll-like receptor 2*) što dovodi do aktivacije Rac1 komponente NADPH oksidaze koja potiče staničnu migraciju i angiogenezu (West i sur., 2010). Osim toga, utvrđeno je da peroksidirane nezasićene masne kiseline potiču signalizaciju TLR4 u endotelnim stanicama što dovodi do aktivacije čimbenika NFκB (Mutoh i Ueda, 2013). Također, pokazalo se je da TLR signalizacija utječe na HIF/VEGF signalni put angiogeneze budući da TLR2 modulira HIF-1α ekspresiju koja aktivira promotorsku regiju VEGF-a kao odgovor na hipoksiju (Spirig i sur., 2010).

2.2. UPALNI PROCESI

Upala je nespecifična obrambena reakcija organizma na ozljedu tkiva prouzročena mikroorganizmima ili nekim drugim štetnim biološkim (imunosna reakcija kao posljedica hipersenzitivnosti, mrtve stanice), kemijskim (toksini, kemijske tvari, alkohol, ionizirajuće zračenje) ili fizičkim (opekline, ozebline, fizička ozljeda, trauma, strana tijela) podražajima s ciljem uklanjanja ili uništavanja štetnog podražaja/patogenog mikroorganizma i/ili regeneriranja oštećenog tkiva. Radi se o strogo reguliranom procesu u kojem su uključeni specifični i nespecifični mehanizmi obrane koji su neophodni za održavanje cjelokupne homeostaze organizma. Karakterizira ju 5 općih simptoma: a) crvenilo (lat. *rubor*), b) toplina (lat. *calor*), c) bol (lat. dolor), d) oteklina (lat. tumor) i e) poremećaj funkcije (lat. functio laesa). Prema tijeku i duljini trajanja upalne reakcije mogu biti akutne ili kronične. Akutna upala je prva linija obrane od ozljeda koja se temelji na povećanju protoka krvi kroz napadnuto područje čime se povećava doprema leukocita i raznih topljivih molekula u to područje, povećanju permeabilnosti kapilara koje omogućavaju povećanu eksudaciju (izlučivanje) plazme i njezinih sastojaka (protutijela, čimbenici zgrušavanja krvi i kininskog sustava, komponente komplementa) u međustanični prostor (edem) te povećanju migracija leukocita, uglavnom neutrofila i makrofaga u to područje. U akutnoj fazi na mjesto upale obično prvi stižu granulociti i trombociti koji nastoje neutralizirati sam uzrok upale. Ukoliko u tome ne uspiju, upala prelazi u kroničnu fazu tijekom koje se na mjesto upale nakupljaju mononuklearni fagociti i limfociti. Stanice akutne upale su mastociti, granulociti i trombociti, pri čemu stanice mastocita i bazofila sadrže brojne citoplazmatske granule s biološkim aktivnim tvarima čijim oslobađanjem postaju posrednici (medijatori) upale odgovorni za većinu krvožilnih obilježja akutne upale. Oslobođeni medijatori upale kao što su histamin, serotonin, bradikinin i prostaglandin E2 uzrokuju vazodilataciju kapilara i povećanje njihove permeabilnosti, dok neki od njih poput leukotriena B4 djeluju kemotaksijski privlačeći prvotno neutrofile i eozinofile, a zatim i monocite i limfocite na mjesto upale kroz stijenku krvnih žila. To novačenje aktiviranih fagocita reguliraju inducirane adhezijske molekule (ICAM-1, VACM-1, E-selektini) koje se nalaze na endotelnim stanicama. Monociti , koji se izlaskom iz kapilara preobražavaju u makrofage, također potpomažu upalu (Taradi, 2010).
Neki od oslobođenih medijatora upale poput bradikina povećavaju osjetljivost na bol. Gubitak funkcije tkiva vjerojatno je rezultat neurološkog refleksa kao odgovor na bol.

Pored medijatora upale koji se oslobađaju iz stanice (histamin, granule lizosoma, IFN-γ, IL-8, leukotrien B4, prostaglandini, NO, IL-1, TNF-α, triptaze itd.) postoje i nekoliko nestaničnih biokemijskih kaskadnih sustava koji se sastoje od plazma proteina, a koji su također uključeni u iniciranje i širenje upalnog odgovora. To uključuje sustav komplementa koji aktiviraju bakterije, sustav koagulacije i fibrinolize koji su aktivirani nekrozom, kininski sustav (npr. bradikinin) i proteine akutne faze u jetri (C-reaktivni protein-CRP; manoza-vezujući proteini-MBP, fibrinogen, ceruloplazmin, antitripsin i drugi) koji su aktivirani monokinima poput IL-1, IL-6 i TNF-α. Aktivirani sustav komplementa stvara niz kaskadnih kemijskih reakcija koje potiču kemotaksiju fagocitnih stanica, aglutinaciju, opsonizaciju ciljanih čestica što pospješuje njihovu fagocitozu i stvaranje terminalnog kompleksa komplementa (TCC, engl. *terminal complement complex*) na membrani ciljane stanice koji uzrokuje lizu i smrt patogene bakterijske stanice. Kininski sustav uz pomoć tkivnog i plazmatskog enzima kalikreina cijepa velike proteinske molekule kininogene u manje peptide zvane kinini (poput bradikinina) koji pospješuju vazodilataciju i povećavaju permeabilnost krvnih žila. Sustav koagulacije stvara ugrušak pomoću trombina i zaustavlja krvarenje formiranjem zaštitne proteinske mreže na mjestu ozljede. S druge strane, sustav fibrinolize djeluje suprotno koagulacijskom sustavu na način da uklanja nastali fibrinski ugrušak fibrinolizom uz pomoć enzima plazmina te ponovno uspostavlja protok krvi kroz oštećeno područje. Proteini akutne faze obavljaju različite uloge od sakupljanja slobodnih radikala, do potpomaganja sinteze imunoglobulina i obnavljanja tkiva, a njihova se koncentracija u akutnoj upali može povećati i do 1000 puta.

Neutrofili su najbrojniji stanični posrednici akutne upale koji su na mjesto upale privučeni brojnim kemotaksijskim molekulama poput komponenti komplementa, a njihova je zadaća uništavanje mikroorganizama proždiranjem (fagocitozom), razgradnjom lizosomskim enzimima, ali i izvanstaničnim oslobađanjem granula. Oslobađanjem brojnih medijatora upale poput kemokina i makrofagnih upalnih proteina (MIP-1a i MIP-1b) (engl. *macrophage inflammatory protein*), neutrofili pospješuju proces upale i privlače makrofage na mjesto upale. Makrofagi se aktiviraju razgradnim produktima fagocitnih napadača (npr. bakterijski endotoksin lipopolisaharid, LPS) (Andreis i Lukinović-Škudar, 2010). Aktivirani makrofagi imaju veliku sposobnost fagocitoze i probave oštećenih dijelova stanica, tkiva i mikroorganizama pomoću snažnih lizosomskih enzima čime pripremaju tkivo za okončanje upalnog procesa. Također, pri tome oslobađaju različite citokine i kemokine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i TNF-α) koji privlače i aktiviraju leukocite, povećavaju propusnost kapilara, aktiviraju

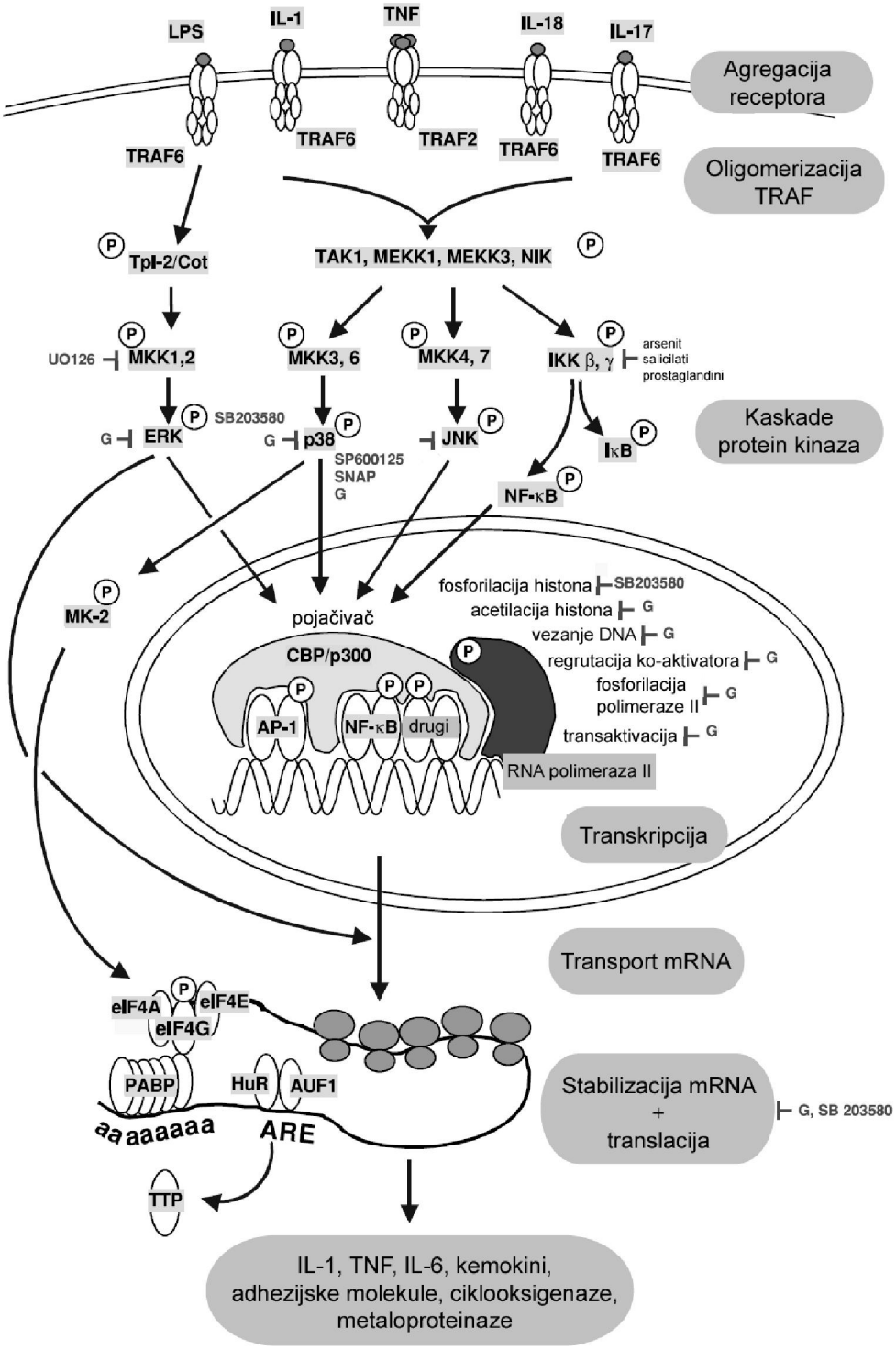
krvožilni endotel i potiču NK stanice čime utječu na lokalne i sustavne promjene u akutnom upalnom odgovoru (Andreis i Lukinović-Škudar, 2010). Nažalost, svi navedeni obrambeni mehanizmi mogu oštetiti i vlastito zdravo tkivo. U slučaju da izostane uklanjanje uzroka upale i pokretanje procesa zacjeljivanja rana, javlja se kronična upala. Za razliku od akutne upale koju obilježava nakupljanje polimorfonuklearnih granulocita, kroničnu upalu čini nakupljanje mononuklearnih stanica (limfocita T, makrofaga, plazma stanica) pri čemu su makrofagi vodeće stanice kronične upale. Osim stanica, u kroničnoj upali posreduju i brojni citokini poput IL-1, IL-2, IFN-γ, TNF-β, TGF-β koji djeluju autokrino ili parakrino.

Osim izlučivanja različitih citokina, kemokina i ostalih medijatora upale koji privlače leukocite, važnu ulogu ima i indukcija enzima poput ciklooksigenaze 2 (COX-2), lipooksigenaza (LOX) i inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS ili NOS2) čiji produkti (prostaglandini, leukotrieni i NO) potiču lokalni protok krvi. Veći broj citokina od kojih su najpoznatiji IL-1, IL-2, INF-γ i TNF kao i lipopolisaharid koji je jedan od sastavnih dijelova gram-negativnih bakterija kontroliraju transkripciju gena za iNOS. Leukotrieni i prostaglandini lipidni su medijatori koji nastaju iz arahidonske kiseline. Arahidonska kiselina je višestruko nezasićena masna kiselina koja nastaje kao produkt razgradnje membranskih fosfolipida uz djelovanje enzima fosfolipaze A2 (PLA_2) Za stvaranje leukotriena (SRS-A) koji povećavaju propusnost krvnih žila i uzrokuju dugotrajnu bronhokonstrikciju nužno je djelovanje lipooksigenaze, dok je za nastanak prostaglandina koji uzrokuju vazodilataciju, agregaciju trombocita i bronhokonstrikciju potrebna je ciklooksigenaza (COX-2) (Andreis i Lukinović-Škudar, 2010). Vezanjem navedenih molekula za različite receptore na membrani stanice aktiviraju se četiri osnovna unutarstanična signalna puta kojima se kontrolira ekspresija gena uključenih u upalni odgovor na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini (Saklatvala i Clark, 2003). To su:

1) signalni put protein kinaza kojim se aktivira transkripcijski čimbenik NF-κB (engl. *nuclear factor kappa B*),
2) signalni putevi protein kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*):
    a) signalni put kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (ERK, engl. *extracellular-signal-regulated kinase*),

b) signalni put c-Jun N-terminalne kinaze (JNK, engl. *c-Jun-N-terminal kinase*), odnosno protein kinaze aktivirane stresom (SAPK, engl. *stress-activated-protein-kinase*) i
c) signalni put kinaze p38 (Slika 15).

Nuklearni čimbenik kappa B (NF-κB) je transkripcijski čimbenik koji regulira ekspresiju različitih gena, uključujući citokine, iNOS i COX-2 za koje se je pokazalo da imaju ključne uloge u procesima upale, apoptoze, tumorigeneze i različitim autoimunim bolestima (Jiang i sur., 2015). Aktivacija redoks osjetljivog čimbenika NF-κB može inducirati prekomjernu ekspresiju proupalnih molekula koje mogu dovesti do razvoja akutnih ili kroničnih upalnih bolesti kao što su ateroskleroza, upalne bolesti crijeva i reumatoidni artritis. Smatra se da signalni put kinaze p38 ima i dodatnu važnu ulogu u post-transkripcijskoj regulaciji jer utječe na stabilnost mRNA gena koji sudjeluju u upalnom odgovoru (Kracht i Saklatvala, 2002).
Budući da se signalni putevi međusobno isprepliću, velika je vjerojatnost da je jedna molekula istovremeno uključena u regulaciju više različitih signalnih puteva i obrnuto.



Slika 15. Shematski prikaz signalnih puteva i mehanizama regulacije gena uključenih u upalni odgovor. Citokini (IL-1, IL-17, IL-18, TNF) ili mikrobni produkti (LPS) potiču nakupljanje receptora i oligomerizaciju TRAF, što je ključni događaj za aktivaciju kinaze IκB te signalnih puteva ERK, JNK i p38. Te kinaze fosforiliraju ili IκB i NF-κB ili transaktivacijske domene AP-1, aktivirajući na taj način NF-κB i AP-1. Za jaku transkripciju

potrebna je, uz aktivaciju NF-κB, aktivacija barem još jednog signalnog puta MAPK. Ona uzrokuje acetilaciju i fosforilaciju histona, koju prati stvaranje višeproteinskih kompleksa – pojačivača transkripcije. Unutar tih pojačivača NF-κB i AP-1 intereagiraju s DNA, drugim transkripcijskim čimbenicima, koaktivatorima (npr. CBP/p300) i holoenzimom RNA polimerazom II. Posljedica varijacije u strukturi pojačivača je aktivacija specifičnih gena. Novosintetizirana mRNA je stabilizirana signalnim putem p38-MK-2. Inhibicija ključnih koraka prijenosa signala može se postići primjenom glukokortikoida (G), inhibitora protein-kinaza (UO126, SP600125, SB203580), donora NO (SNAP; S-nitro-N-acetil-*D*L-penicilamin), salicilata i arsenita (kratice: AP-1–transkripcijski faktor AP-1, ARE – elementi bogati slijedom AU, AUF1 – čimbenik vezanja AU 1, CREB – protein koji veže CBP, eIF – čimbenik inicijacije elongacije, ERK – kinaza regulirana izvanstaničnim signalima, IκB – inhibitor NF-κB, IKK – kinaza IκB, JNK – c-Jun N-terminalna kinaza, MAPK – protein kinaze aktivirane mitogenima, MEKK – ERK kinaza aktivirana mitogenima, MKK – kinaza MAPK, PABP – protein koji veže poliA-rep, P – fosforilacija, TTP – tristetraprolin, TAK1 – protein kinaza 1 aktivirana čimbenikom rasta tumora, TNF – čimbenik nekroze tumora, TRAF – čimbenik vezanja receptora TNF) (preuzeto i prilagođeno: Kracht i Saklatvala, 2002).

2.2.1. Ciklooksigenaze (COX)

Ciklooksigenaze (COX) su membranski enzimi odgovorni za stvaranje važnih bioloških medijatora upale zvanih prostanoidi koji izazivaju upalne reakcije, a u koje ubrajamo prostaglandin, prostaciklin i tromboksan. Navedeni enzim još se naziva i prostaglandin-endoperoksid sintaza (PTGS ili PES) budući da katalizira sintezu prostaglandina (PGG_2) iz arahidonske kiseline koja nastaje kao produkt razgradnje membranskih fosfolipida te redukciju prostaglandina G_2 (PGG_2) do prostaglandina H_2 (PGH_2). Stoga inhibicija COX-a može dovesti do olakšavanja simptoma upale, groznice i boli, a ostvaruje se primjenom nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) koji su neselektivni inhibitori za oba oblika ciklooksigenaza (COX-1 i COX-2).

Dokazano je da se COX pojavljuje u dva različita izomerna oblika kod ljudi: COX-1 ili PTGS1 (70 kDa) koji se konstitutivno izražava u većini tkiva te inducirani oblik, COX-2 ili PTGS2 (72 kDa). Osim slične molekulske mase, oba izomerna oblika pokazuju 65 % homolognosti aminokiselinskog slijeda te imaju gotovo jednaka katalitična mjesta pa su njihove trodimenzionalne strukture gotovo preklopive. Ljudski COX-1 i COX-2 enzimi su homodimerne građe koji sadrže 576 i 581 aminokiselina. Oba enzima sadrže 3 oligosaharida manoze, dok je četvrti oligosaharid prisutan samo kod COX-2 enzima i regulira njegovu razgradnju. Svaka podjedinica dimera sadrži tri domene: domenu epidermalnog čimbenika rasta, domenu vezanja za membranu i katalitičku domenu koja uključuje veći dio proteina koji sadrži ciklooksigenazno i peroksidazno aktivno mjesto s obje strane hem prostetičke skupine (Mbonye i sur., 2008).

Smatra se da je COX-1 odgovoran za proizvodnju prostaglandina koji djeluju kao homeostatički regulatori i kontroliraju normalne fiziološke funkcije kao što su zaštita sluznice želudca i krvožilne hemostaze, agregacija trombocita, diferencijacija makrofaga, indukcija porođaja, regulacija prokrvljenosti bubrega i održavanje funkcije glomerula (Tablica 6).

Tablica 6. Uloge COX-1 i COX-2 enzima

COX-1	**COX-2**	
Homeostaza	***Patofiziologija***	***Prilagodba***
Zaštita sluznice	Upala, bol	Bubreg: lučenje renina
Agregacija trombocita	Groznica	Zacjeljivanje rana/čireva
Prokrvljenost bubrega	Ishemija (CNS)	Uloga u reproduktivnom sustavu žena
	Alzheimerova bolest	Metabolizam kostiju
	Rak	Krvožilna zaštita

Inhibicija COX-1 ostvaruje se primjenom nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) kao što su aspirin. Prostaglandin tromboksan A2 koji je glavni produkt djelovanja COX-1 u trombocitima, inducira agregaciju trombocita (Weitz, 2008). Stoga je mala količina aspirina učinkovita u reduciranju kardioloških bolesti kako bi se inhibiralo djelovanje COX-1 enzima i time spriječio nastanak srčanog i moždanog udara. Također, utvrđeno je da inhibicija

COX-1 smanjuje bazalnu proizvodnju citoprotektivnih prostaglandina PGE_2 i PGI_2 u želudcu, što može pridonijeti ulceraciji želudca.

S druge strane COX-2 nije konstitutivno izražen u većini stanica u normalnim uvjetima, već se inducira različitim upalnim i/ili mitogenim stimulansima kao što su forbol esteri, lipopolisaharidi, endotoksini, proupalni citokini (IL-1, TNF-α), čimbenici rasta, promotori tumora te je stoga on važniji u protuupalnoj terapiji i tumorigenezi (Tablica 6) (Jiang i sur., 2015). COX-2 je neposredni produkt gena ranog upalnog odgovora i izvor je prostanoida koji posreduju tijekom upale, boli, groznice, ishemije (CNS), u kardiovaskularnim bolestima i tumorima. Međutim, pronađeno je da se COX-2 konstitutivno eksprimira u mozgu, bubrezima i reproduktivnom sustavu žena te da osim uloge u patofiziološkim procesima, posreduje i u fiziološkim procesima kao što su izlučivanje renina iz bubrega, zacjeljivanje rana i čireva, metabolizam kostiju i vaskularna zaštita. Brojna istraživanja ukazuju na vezu između COX-2 ekspresije i karcinogeneze te je utvrđeno da je pojačana regulacija COX-2 u neovaskulaturi malignih tumora. Već je tijekom kasnih 1980-ih godina utvrđena sposobnost NSAID lijekova (poput aspirina i sulindaka) u smanjenju smrtnosti od raka debelog crijeva. Nedavna istraživanja pokazuju da specifični COX-2 inhibitori posjeduju snažnu kemoprevencijsku aktivnost protiv karcinogeneze debelog crijeva kod štakora, inhibirajući pri tom tumore u većem stupnju od konvencionalnih NSAID lijekova (Kawamori i sur., 1998). S obzirom na COX-2 djelovanje, Tsujii i sur. (1998) ustanovili su da COX-2 izvedeni prostaglandini mogu modulirati proizvodnju angiogenih čimbenika od strane tumorskih stanica debelog crijeva, čime se potiču novonastale krvne žile da održavaju vijabilnost i rast tumorskih stanica. Štoviše, pokazalo se je da prekomjerna COX-2 ekspresija u epitelnim stanicama uzrokuje rezistenciju na apoptozu, što za posljedicu ima poremećaj u rastu i normalnoj staničnoj smrti (Tsujii i sur., 1998). U istom istraživanju, pokazalo se je da COX-1 aktivnost u endotelnim stanicama ima važnu ulogu u modulaciji angiogeneze (Tsujii i sur., 1998). Prostaglandini koje proizvodi COX-1 u endotelnim stanicama mogu biti važni u regulaciji gena potrebnih za stvaranje endotelnog izbojka te mogu predstavljati važnu metu u prevenciji raka ili liječenju tumora koji su bez COX-2 ekspresije. NSAID lijekovi kao takvi mogu inhibirati angiogenezu inhibicijom COX-2 aktivnosti u stanicama karcinoma debelog crijeva te smanjiti regulaciju proizvodnje angiogenih čimbenika indukcijom apoptoze i inhibicijom COX-1 aktivnosti u endotelnim stanicama. Nedavna istraživanja pokazala su da prekomjerna COX-2 ekspresija nije nužno jedinstvena za rak debelog crijeva, ali može biti

zajednička odlika drugih epitelnih stanica. Povećane razine COX-2 enzima utvrđene su gotovo kod svih premalignih i malignih bolesti (Jiang i sur., 2015) uključujući raka glave i vrata, pluća, dojke, jednjaka, želudca, debelog crijeva, jetre, prostate, mokraćnog mjehura, kože te adenokarcinoma gušterače (Aggarwal i Shishodia, 2006) kao odgovor na različite mitogene, tumorske promotore, citokine, čimbenike rasta i izloženosti sunčevom UV zračenju. Na temelju tih podataka, razumljivo je da se specifični COX-2 inhibitori mogu koristiti kao adjuvansi u liječenju tumora, kao i u samoj prevenciji raka.

Liječenje s COX-2 selektivnim inhibitorima u *in vivo* uvjetima dovela su do smanjenja rasta tumora jezika, jednjaka, crijeva, dojke, kože, pluća i mokraćnog mjehura u pokusnim životinjama. U novije vrijeme sve se više spominje uloga COX-2 u razvoju neurodegenerativnih bolesti (Pasinetti, 2001). Naime, kod Alzheimerove bolesti utvrđena je povećana COX-2 regulacija u područjima mozga koji su odgovorni za pamćenje (hipokampus, korteks) pri čemu količina COX-2 korelira s odlaganjem β-amiloidnog proteina u neuritskim plakovima. Za razliku od inhibicije COX-1 enzima putem NSAID lijekova, inhibicija COX-2 je puno sporija i često ireverzibilna. Također je otkriveno da glukokortikoidi, IL-4, IL-13, protuupalni citokin IL-10 (Niiro i sur., 1997, Onoe i sur., 1996) te različiti flavonoidi inhibiraju ekspresiju COX-2 enzima (O'Leary i sur. 2004).

Nedavno je otkriven i treći oblik ciklooksigenaze nazvan COX-3 koji je kodiran istim genom kao i COX-1 enzim, s time da COX-3 zadržava intron koji nije prisutan kod COX-1 enzima (Botting, 2003). Također, COX-3 enzim funkcionalno nije prisutan kod ljudi, a najzastupljeniji je u središnjem živčanom sustavu pasa. Selektivno se inhibira djelovanjem nekih lijekova poput paracetamola.

Svi prirodni produkti COX enzima brzo se metaboliziraju u neaktivne oblike hidriranjem ili oksidacijom15-hidroksilne skupine u odgovarajući keton djelovanjem prostaglandin 15-OH-dehidrogenaze.

2.3. HIPOKSIJA

Hipoksija je stanje smanjene količine kisika u stanicama i tkivima koje dovodi do disfunkcije stanica, organa i organskih sustava. Javlja se kod krvožilnih i plućnih bolesti kao što su dijabetička retinopatija, makularna degeneracija, reumatoidni artritis, psorijaza i hemangiom ili prilikom poticanja rasta kancerogenog tkiva (Carmeliet i Jain, 2000; Folkman, 2001).

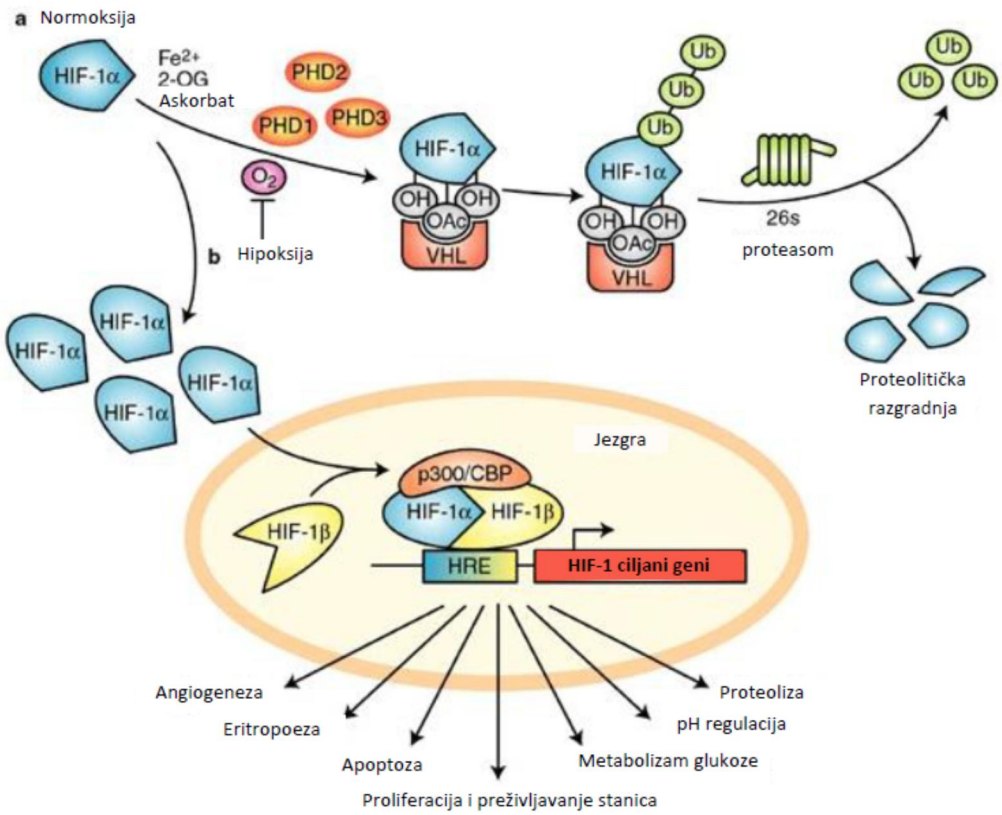
Postoje 3 vrste hipoksije: kronična hipoksija, akutna hipoksija i hipoksija s reperfuzijom. Kronična hipoksija (koncentracija kisika 2–3 %) posebice uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanica zbog ograničene difuzije kisika (Harris, 2002). S druge strane, akutna hipoksija, a osobito hipoksija s reperfuzijom, uzrokuje stvaranje krvožilja tumora iz nepravilnih krvnih žila (Harris, 2002). Ovo stanje u tkivu također je poznato kao "reoksigenacijska ozljeda", jer povećani protok krvi osigurava prekomjernu količinu kisika što rezultira povećanjem koncentracije slobodnih radikala, oštećenjem tkiva i istodobnom aktivacijom gena odgovornih za stres (Prabhakar, 2001). Sve vrste stanica, uključujući i tumorske stanice trebaju kisik za proizvodnju energije i funkcioniranje tkiva. Nedostatak odgovarajuće opskrbe krvlju i povećanje udaljenosti postojećih krvnih žila dovodi do izgladnjivanja tumorskih stanica kisikom što u konačnici rezultira stvaranjem hipoksije u tom području ili čak anoksije u tumoru. Normalne stanice i tkiva ne mogu preživjeti u kroničnoj hipoksiji zbog relativno dugog trajanja hipoksičnog stanja. Međutim, tumorske stanice sposobne su proliferirati i preživjeti u hipoksičnom mikrookolišu kao rezultat genetičkih i adaptivnih promjena koje aktiviraju onkogene i/ili inaktiviraju tumor supresor gene, što dovodi do razvoja otpornosti na hipoksiju. U uvjetima hipoksije javljaju se i upalni procesi te dolazi do stvaranja i izlučivanja brojnih angiogenih čimbenika od strane pojedinih podvrsta leukocita kao što su VEGF, PDGF, bFGF, angiopoetin 2/angiopoetin 1 (ANGPT2/ANGPT1), TEK ili Tie2 (engl. *tunica interna endothelial cell kinase*), različiti interleukini kao što su TGF-β1 i monocitni kemoatraktant proteina 1 (MCP-1) te proteinaze koji reguliraju proces angiogeneze.

Paradoksalno, ali mnogi tumori s intratumorskom hipoksijom i nekrozom su veoma angiogeni čime se ističe činjenica da je krvožilje u mnogim tumorima strukturno i funkcionalno abnormalno, što rezultira prostornom i vremenskom heterogenošću u opskrbi kisikom (Jain, 2003). Osnovni i glavni pokretač tumorske angiogeneze je transkripcijski čimbenik HIF-1

koji je pronađen u stanicama sisavaca sa smanjenom koncentracijom kisika i ima ključnu ulogu u staničnom odgovoru na hipoksiju.

Transkripcijski čimbenik HIF-1 je heterodimer koji se sastoji od 2 podjedinice: HIF-1α (oko 120 kDa) koji se inducira hipoksijom i konstitutivno izražen HIF-1β (91-94 kDa). HIF-1α je citoplazmatski protein osjetljiv na razinu kisika, dok je HIF-1β jezgreni protein koji se izražava neovisno o kisiku. Podjedinica HIF-1β poznata je također i kao arilni ugljikovodični receptor nuklearnog translokatora (ARNT). Obje podjedinice imaju nekoliko izoformi koje su kodirane različitim genskim lokusima i dio su PER-ARNT-SIM obitelji (akronim PAS) transkripcijskih čimbenika. U uvjetima normoksije, HIF-1α brzo se razgrađuje. S druge strane, kao odgovor na hipoksiju, podjedinica HIF-1α nakuplja se u citoplazmi i stabilizira nakon čega se premješta u jezgru gdje heterodimerizira s HIF-1β podjedinicom i povezuje s koaktivatorima (CBP/p300) pri čemu nastaje aktivni HIF-1 protein. Ovaj protein se zatim veže za specifične elemente odgovora na hipoksiju (HREs, engl. *hypoxia response elements*) unutar promotora gena koji induciraju hipoksiju i aktiviraju transkripciju gena koji su uključeni u angiogenezu, homeostazu glukoze i eritropoezu (Vaupel, 2004) (Slika 16). Drugi protein koji je uključen u VEGF ekspresiju induciranu hipoksijom je HuR koji se veže i stabilizira VEGF mRNA i potiče prijenos u citoplazmi (Levy i sur., 1998). Prisutnost hipoksije u tumorima odražava lošiju prognozu s većim neuspjehom liječenja i smanjenjem ukupnog preživljenja, dok bi s druge strane prevladavanje hipoksije u tumorskom okruženju trebalo dovesti do boljeg ishoda. Unutar HIF-1α podjedinice postoje 2 odvojene transaktivacijske domene (TAD) poznate i kao kisik-ovisne hidroksilaze koje djeluju kao senzori za kisik. Jedna je prolil hidroksilazna domena (PHD) koja se aktivira u prisutnosti kisika i može hidroksilirati ostatke prolina (Pro402 i Pro564) uz pomoć prolil hidroksilaza (PHD1, PHD2 ili PHD3) u ODD (engl. *oxygen-dependent degradation domain*) domeni HIF-1α stvarajući signal za vezanje za von Hippel-Lindau tumor supresor proteinom (pVHL). Von Hippel-Lindau protein je prepoznatljiva komponenta E3 ubikvitin-proteina ligaze koja se sastoji od elongina B, elongina C, kulina 2, RBX1 i E2 ubikvitin konjugirajućeg enzima koji cilja HIF-lα za ubikvitinaciju i proteasomsku razgradnju u uvjetima normoksije (Salceda i Caro, 1997). S druge strane, odsutnost kisika ne uzrokuje nikakvu enzimsku aktivnost, nema modifikacije prolina unutar HIF-1α, niti pVHL/HIF vezanja, što rezultira stabilizacijom i akumulacijom HIF-lα u stanici. Druga hidroksilacijska domena sadrži ostatak asparagila na C-terminalnom kraju TAD domene (Asn803 kod HIF-1α

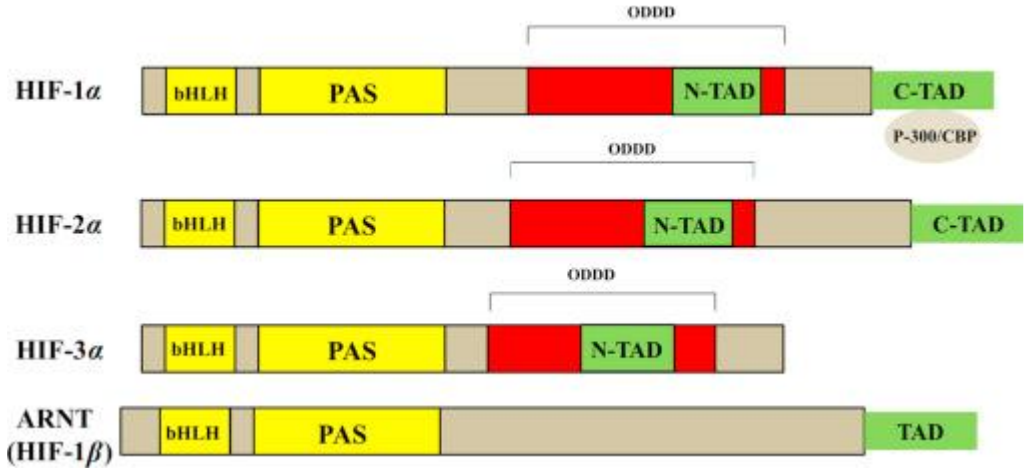
i Asn851 kod HIF-2α) (Lando i sur., 2002), a njezina hidroksilacija uz pomoć enzima asparagil hidroksilaze (nazvane i FIH-1 odnosno čimbenikom inhibicije HIF-1) ne dovodi do HIF-1α razgradnje, već uzrokuje steričku inhibiciju međureakcije između HIF-1α i koaktivatora CBP/p300 (Freedman i sur., 2002), ometajući njegovo vezanje koje je ključno za aktivaciju HIF-1α. Asparagil hidroksilaza (FIH-1) uglavnom se nalazi u citoplazmi, ali neke frakcije vjerojatno postoje i u jezgri (Metzen i sur., 2003). Transkripcija FIH-1 je neovisna o koncentraciji kisika i ne utječe na stabilnost HIF-1α (Metzen i sur., 2003). Prolil hidroksilaze i asparagil hidroksilaza (FIH-1) su Fe(II) i 2-oksoglutarat (2-OG) ovisne dioksigenaze koje djeluju kao senzori na kisik pri čemu koriste Fe^{2+} ione kao kofaktore kako bi katalizirale redukciju molekularnog kisika. ROS može inaktivirati djelovanje prolil hidroksilaza (PHD) na način da uzrokuje oksidaciju Fe^{2+} iona u Fe^{3+} ione ili oksidaciju aktivnih mjesta ostataka. Također, NO može inhibirati PHD aktivnost, kelirajući Fe(II), kao i prisutnost iona teških metala poput nikla, kobalta i mangana koji se zamijene s Fe^{2+} ionom koji je slabim vezama vezan za sam enzim. S druge strane, bioreducensi poput askorbata (vitamin C) ili glutationa pojačavaju PHD aktivnost u *in vitro* uvjetima vjerojatno olakšavajući redukciju i ponovni povratak Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ione.



Slika 16. Regulacija HIF-1α tijekom normoksije i hipoksije (preuzeto i prilagođeno: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_06/S1462399405009117sup010.gif)

Pronađena su 3 homologa HIF-α podjedinice: HIF-1α, HIF-2α i HIF-3α (Gu i sur., 1998) (Slika 17) koji predstavljaju glavne senzore hipoksije budući da su regulirani razgradnjom proteina, što osigurava brzi odgovor kod smanjenja kisika u roku od 2 minute (Jewell i sur., 2001) za razliku od transkripcijske regulacije koja daje odgođeni odgovor zbog obrade RNA i translacije u citoplazmu. HIF-2α pokazuje veliku strukturnu i funkcionalnu sličnost s HIF-1α (48 % sličnosti aminokiselinskog slijeda), a utvrđene su i jedinstvene i zajedničke funkcije kao što je zajednička sposobnost heterodimeriziranja s HIF-β i međureakcije s HRE radi poboljšanja transkripcijskog djelovanja. Za razliku od HIF-1α koji je prisutan svugdje, HIF-2α se prvenstveno izražava u plućima, karotidnom tijelu i endotelu (Tian i sur., 1998). Malo se zna o HIF-3α u usporedbi s drugim HIF-α homolozima, ali poznato je da je izražen u različitim tkivima i da dimerizira s HIF-1β te se veže na HRE (Gu i sur., 1998) što doprinosi složenosti regulacije inducibilnih gena hipoksije od strane HIF obitelji transkripcijski čimbenika. Povećana ekspresija HIF-1α utvrđena je kod mnogih vrsta tumora kao što je karcinom gušterače, glave i vrata, dojke, bubrega, jajnika, mokraćnog

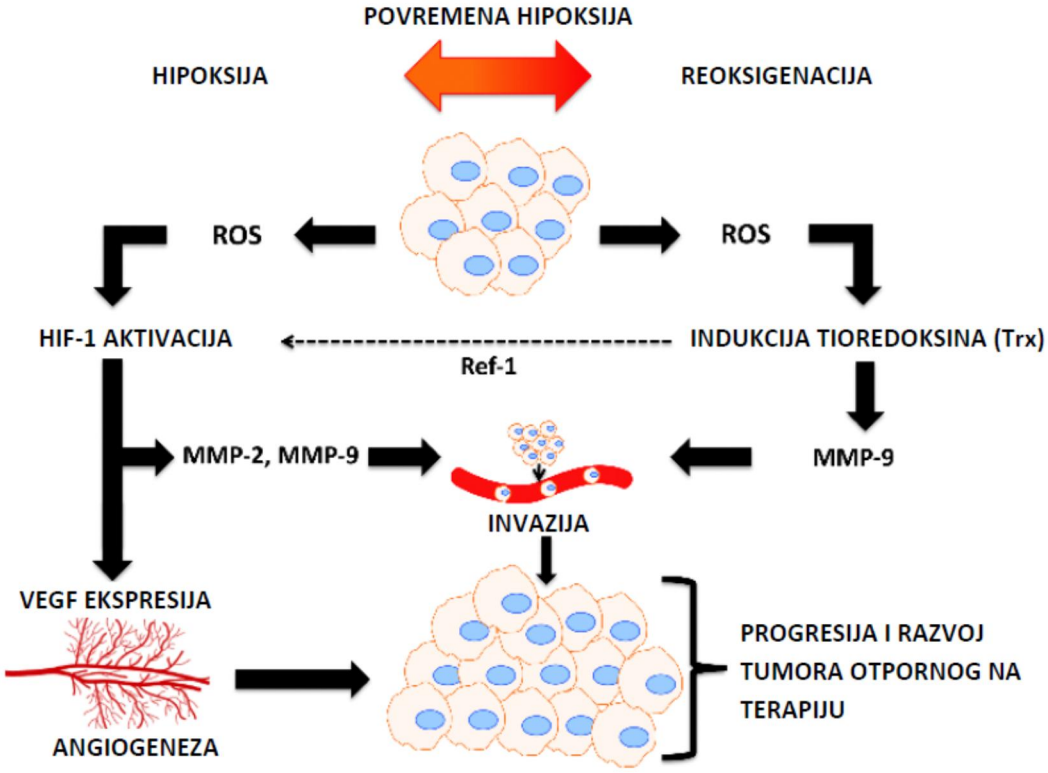
mjehura, mozga, prostate i debelog crijeva što se podudara s povećanjem angiogeneze i metastaziranja (Poon i sur., 2009).



Slika 17. Homolozi HIF-α i HIF-β podjedinica (preuzeto i prilagođeno: Masoud i Li, 2015)

Kod tumora hipoksija može dovesti do maligne progresije induciranjem adaptivnih promjena u tumorskim stanicama koje bi omogućile preživljavanje u nepoželjnom okolišu. To uključuje promjene u ekspresiji gena, inaktivacije tumor supresor gena, aktivacije onkogena, genomsku nestabilnost i klonsku selekciju (Byrne i sur., 2005). Promijenjeni okoliš vrši snažan selektivni pritisak na tumorske stanice te odabire najmalignije stanice sposobne za preživljavanje u negativnom mikrookolišu. Stanice prilagođene hipoksiji proliferiraju i preživljavaju bolje od onih koje nisu adaptirane i postaju dominantna populacija u tumoru što dovodi do razvoja agresivnijeg fenotipa. Smanjena regulacija adhezijskih molekula kao odgovor na hipoksiju povećava odvajanje tumorskih stanica i time metastaziranje (Giaccia, 1996). Ostali problemi koji se javljaju kod hipoksije tumora su izravni i neizravni učinci koje imaju na kemorezistenciju. Pojedini kemoterapijski lijekovi kao što su alkilirajući spojevi su manje učinkoviti u uvjetima hipoksije (Byrne i sur., 2005). Kao odgovor na hipoksiju, stanični ciklus usporava ili se zaustavlja u G1 fazi. Kako neke kemoterapije djeluju u S1 fazi staničnog ciklusa inhibirajući sintezu DNA, njihova učinkovitost se time smanjuje u hipoksičnim uvjetima (Shannon i sur., 2003). Hipoksija dovodi do mutacija u p53 tumor supresor genu (Byrne i sur., 2005). Stanice s mutacijama u p53 su otporne na apoptozu induciranu DNA oštećenjem i vjerojatno će biti kemorezistentne za razliku od stanica s divljim tipom p53. Mutacija p53 dovodi do smanjenja apoptoze posredovane hipoksijom i povećanja proizvodnje VEGF-a (Royds i sur., 1998). Hipoksija također predstavlja problem

kod zračenja jer zračenje djeluje na brzo proliferirajuće stanice i ovisi o prisutnosti kisika dovodeći do povećanja reaktivnih vrsta kisika. Osjetljivost prema zračenju smanjuje se pri niskim koncentracijama kisika. Kisik povećava razinu oštećenja prouzročenu zračenjem stvaranjem slobodnih hidroksil radikala iz kisika koji se javljaju neposredno nakon zračenja (Byrne i sur., 2005). U stvari, doza zračenja koja je potrebna za apoptozu tumorskih stanica je 2-3 veća u uvjetima hipoksije nego u normalnim okolnostima (Harrison i Blackwell, 2004). U kliničkom pogledu hipoksija tumora u korelaciji je s kraćim preživljavanjem u usporedbi s pacijentima koji imaju nehipoksične tumore. Uočena je i korelacija između hipoksije tumora i maligne progresije kod raka vrata maternice te ona može poslužiti kao znak lošeg ishoda i preživljenja i kod raka mekog tkiva glave i vrata (Wouters i sur., 2002). Kao odgovor na hipoksiju, tumori luče angiogene čimbenike rasta kako bi stimulirali rast žila i opskrbu kisikom u čemu posreduje HIF-1 koji modulira ekspresiju brojnih hipoksijom inducibilnih gena i angiogenih čimbenika kao što je VEGF (Slika 18).



Slika 18. Međureakcija Trx i HIF-1 kod povremene hipoksije i posljedično nastale promjene u progresiji raka (preuzeto i prilagođeno: Bhatia i sur., 2013)

Transkripcijski čimbenik HIF-1 aktivira se u uvjetima hipoksije pri čemu dolazi do stvaranja hormona eritropoetina u hepatocitima i bubrezima koji ima ključnu ulogu u hematopoezi na način da potiče stvaranje eritrocita u koštanoj moždini čime se ujedno povećava sposobnost vezanja kisika i smanjuje tkivna hipoksija.

HIF-1 aktivira transkripciju ciljnih gena koji reguliraju nekoliko bioloških procesa poput enzima tirozin hidroksilaze koji olakšava kontrolu ventilacije posredstvom karotidnih tijela, zatim angiogeneze (regulira gene za sintezu čimbenika VEGF-a), proliferacije stanica i preživljavanja, metabolizma glukoze i željeza, regulacije pH i migracije. Nadalje, otkriveno je da je povišena razina HIF-1 povezana s povećanjem angiogeneze, agresivnim rastom tumora i lošom prognozom pacijenata što pobuđuje veliko zanimanje za HIF-1 kao obećavajuće mete u protutumorskoj terapiji.

2.4. POLARIZACIJA MAKROFAGA

Imunosni sustav predstavlja jednu od prvih linija obrane u sprječavanju razvoja tumora zbog svoje sposobnosti prepoznavanja i uništavanja tumorskih stanica, a taj proces imunosnog nadzora nad karcinomom kojeg je prvotno opisao Ehrlich sve više privlači pozornost posljednjih godina (Burnet, 1971; Ehrlich, 1909; Thomas, 1959).

Poznato je da upala ima ključnu ulogu u pokretanju i promicanju raka, dok istovremeno može doprinijeti specifičnom i prirođenom odbacivanju tumora (Brigati i sur., 2002; Coussens i Werb, 2002; deVisser i sur., 2006). Epidemiološka istraživanja ukazuju da je kronična upala predispozicija za različite vrste raka. Upalni odgovori novače mnoštvo imunosnih stanica, među kojima makrofagi imaju ključnu ulogu (Libby, 2002).

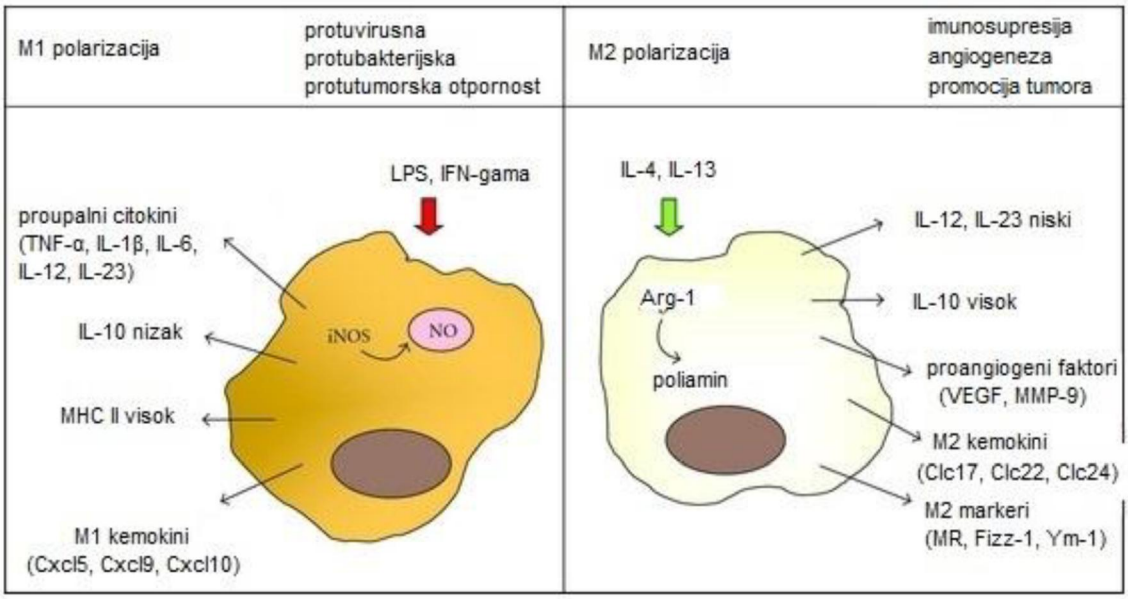
Mikrookoliš koji okružuje tumorsku masu sadrži prekomjerno proliferirajuće tumorske stanice, zajedno s nekoliko komponenata domaćina koje uključuju stromalne stanice, krvožilje koje se proširuje i karakterističan upalni infiltrat povezan sa stalnim remodeliranjem tkiva. Istraživanja pokazuju da su endotelne stanice (Folkman, 2006; 2007; Kerbel i Folkman, 2002), makrofagi (Balkwill i Mantovani, 2001; Balkwill i sur., 2005; Pollard, 2004) i tumoru pridruženi fibroblasti (Orimo i Weinberg, 2006) uključeni u promicanje rasta i progresiju tumora. Čini se da većina komponenti imunosnog sustava može imati dvostruku ulogu u organizmu.

Imunosne stanice mogu odbaciti tumor proizvodnjom protutumorskih citokina kroz izravno uništavanje tumorskih stanica, ali ponekad ih same tumorske stanice novače i usmjeravaju kako bi im pomogle u njegovu napredovanju. Makrofagi su neophodni za obranu domaćina (Adams i Hamilton, 1984; Nathan i Hibbs, 1991). U primitivnim organizmima, makrofagi predstavljaju obranu domaćina budući da su odgovorni za sve od prepoznavanja, proždiranja pa sve do uništavanja prijetnji (Podolsky i Tauber, 1996). U višim organizmima, kao i kod ljudi, makrofagi imaju ključnu ulogu u urođenom i stečenom imunosnom odgovoru na patogene, održavanju homeostaze tkiva te predstavljaju ključne medijatore upalnih procesa. Poznato je da su među prvim stanicama koje stižu na mjesta ranjavanja i/ili infekcije, gdje obavljaju nekoliko funkcija. Proizvode citokine i kemokine kojima orkestriraju novačenje i djelovanje drugih imunosnih stanica, te proizvode čimbenike rasta, angiogene čimbenike i proteaze kojima potiču popravak tkiva. Također ubijaju patogene kroz proizvodnju ROS i RNS te predstavljaju strane antigene citotoksičnim limfocitima T. Općenito, makrofazi ne djeluju tumoricidno na tumorske stanice osim ako nisu aktivirani, primjerice, protutijelima ili kao "klasični" makrofazi stimulirani IFN-α ili bakterijskim produktom, lipopolisaharidom (LPS). Jednom kada su aktivirani, pokazuju izravnu citotoksičnost prema tumorskim stanicama ili neizravnu citotoksičnost putem izlučivanja čimbenika koji potiču protutumorske funkcije drugih vrsta stanica. Stoga makrofazi mogu pokazati pro- i protuupalna svojstva, ovisno o stupnju bolesti i signalima koje primaju odnosno o upalnoj ravnoteži u mikrookolišu.

Makrofazi imaju pleotropnu biološku ulogu koja uključuje predstavljanje antigena kao antigen predočne stanice (APC, engl. *antigen presenting cells*), citotoksičnost prema ciljnim stanicama, uklanjanje oštećenih stanica i remodeliranje tkiva, regulaciju upale, induciranje imunosnog odgovora, tromboze i raznih oblika endocitoze (Auger i Ross, 1992). Kada su aktivirani mogu izazvati smrt neoplastičnih stanica (citotoksičnost, apoptoza) i/ili izazvati štetne reakcije putem promjena tumorske mikrovaskulature (Mantovan i sur., 1992).
Nastaju iz mijeloidnog progenitora koštane srži kao nezreli monociti koji ulaskom u krvotok migriraju u okolna tkiva i organe gdje se konačno diferenciraju u lokalne makrofage uključujući Kupfferove stanice u jetri, alveolarne makrofage u plućima i osteoklaste u kostima (Auffray i sur., 2009). Makrofazi su dinamičke stanice koje mogu mijenjati svoj funkcionalni profil kao odgovor na različite polarizacijske podražaja u funkcionalno različite fenotipove.

Postoje dvije različite podskupine makrofaga: klasično aktivirani makrofazi (CAM, engl. *classically activated macrophages*) ili M1 makrofazi i alternativno aktivirani makrofazi (AAM, engl. *alternatively activated macrophages*) ili M2 makrofazi koji se dalje dijele na barem 3 podskupine M2a, M2b i M2c makrofage (Gordon, 2003; Martinez i sur., 2008) (Slika 19, 21, 23). M1 makrofazi inducirani su samim IFN-γ ili u suradnji s mikrobnim podražajima kao što je lipopolisaharid (LPS) (ligandi TLR receptora) ili citokinima poput TNF-α i GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Través i sur., 2012). Klasično aktivirani M1 makrofazi čine uspješne imunosne efektorske stanice sa akutnim upalnim fenotipom, sposobne ubijanju mikroorganizama i tumorskih stanica te stvaraju velike količine imunostimulirajućih citokina i limfokina.

Navedene stanice luče visoke razine klasičnih proupalnih citokina kao što su TNF-α, interleukine IL-1, IL-6, IL-12 ili IL-23 te povećavaju koncentraciju dušikovog oksida (NO), superoksidnih aniona i slobodnih radikala kisika (Fairweather i Cihakova, 2009; Modolell i sur., 1995). Osim toga, M1 makrofazi mogu izražavati visoku razinu glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) klase I i II antigena te izlučuju čimbenike komplementa koji olakšavaju komplementom posredovanu fagocitozu (Mantovani i sur., 2004). S druge strane, M2 makrofazi inducirani su stimulacijom IL-4, IL-13, IL-10, TGF-β, prostaglandinom E i glukokortikoidima koji smanjuju ekspresiju IL-12 i IL-23, a pojačano reguliraju lučenje protuupalnih citokina IL-10, IL-1, TGF-β te enzima arginaze (Condeelis i Pollard, 2006; Liu i sur., 2011; Solinas i sur., 2009;) i proangiogenih čimbenika poput VEGF-a, MMP-2 i MMP-9. Također, M2 makrofazi odlikuju se ekspresijom receptora za manozu i receptora čistača (Gordon, 2003), stabilinom 1 (Kzhyshkowska i sur., 2006), CD163 (Högger i sur., 1998) i nekim genima uključenim u remodeliranje tkiva poput Fizz-1 (engl. *Found in Inflammatory Zone 1*) i Ym1 (engl. *chitinase 3-like 3*) (Raes i sur., 2002). Alternativno aktivirani M2 makrofazi imaju slabu sposobnost predstavljanja antigena i proizvode čimbenike koje suprimiraju proliferaciju i aktivaciju limfocita T. Bolje su prilagođeni uklanjanju oštećenih stanica, promicanju angiogeneze te popravljanju i remodeliranju ozlijeđenog/oštećenog tkiva.



Slika 19. Shema aktivacije M1 i M2 makrofaga (preuzeto i prilagođeno: Través i sur., 2012)

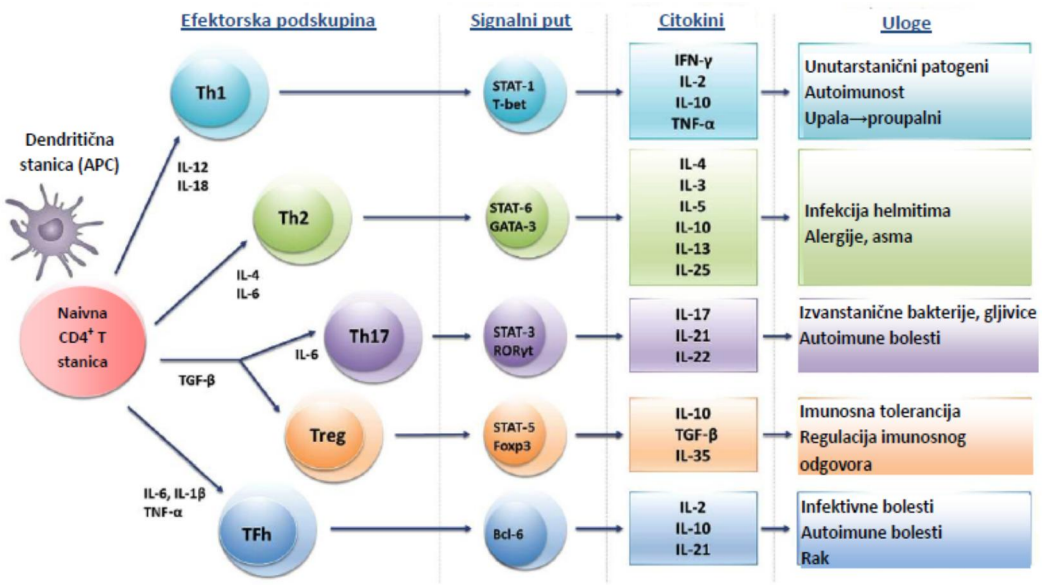
Alternativni metabolički put L-arginina kataliziran arginazom 1 (Arg-1) pruža drugo svojstvo razlikovanja ova dva načina aktiviranja makrofaga. Naime, M1 makrofazi povećavaju regulaciju iNOS enzima koji katalizira pretvorbu L-arginina u NO i citrulin, dok su M2 makrofazi karakteristični po visokoj ekspresiji Arg-1, citosolnog enzima koji metabolizira L-arginin do ornitina i poliamina, koji predstavljaju prekursore za sintezu kolagena i staničnu proliferaciju (Rodríguez i Ochoa, 2008). M1 i M2 makrofazi također eksprimiraju različit sadržaj kemokina: M1 proizvode proupalne kemokine kao što su Cxcl9 (engl. *C-X-C motif ligand 9*), Cxcl10 i Cxcl5, dok je M2 polarizacija praćena proizvodnjom Ccl17, Ccl22 i Ccl24 (Mantovani i sur., 2004). Na temelju njihovog polarizacijskog stanja ovo mnoštvo molekula i gena vodi do izražavanja različitih funkcija makrofaga. Stoga su klasično aktivirani makrofazi bitni čimbenici u inicijaciji i održavanju upale, kao i u obrani domaćina i primjene protutumorskog imunosnog odgovora (Gordon, 2003). Tako primjerice IL-12 kojeg luče M1 makrofazi potiče diferencijaciju naivnih limfocita T u Th1 stanice, stimulira rast limfocita T i NK stanica te povećava baktericidnu aktivnost fagocita (Través i sur., 2012). Osim navedenog, IL-12 djeluje protuangiogeno kroz povećanje kemokina inducibilnog proteina-10 (IP-10 ili Cxcl10) (Sgadari i sur., 1996). Nadalje, M1 kemokini kao što su Cxcl9, Cxcl10 i Cxcl5 induciraju novačenje Th1, Tc1 i NK stanica (Mantovani i sur.,

2004). Podskupine alternativno aktiviranih, protuupalnih M2 makrofaga imaju različite funkcije, uključujući regulacija imunosnog odgovora, održavanje tolerancije i popravak tkiva/zacjeljivanje rana.

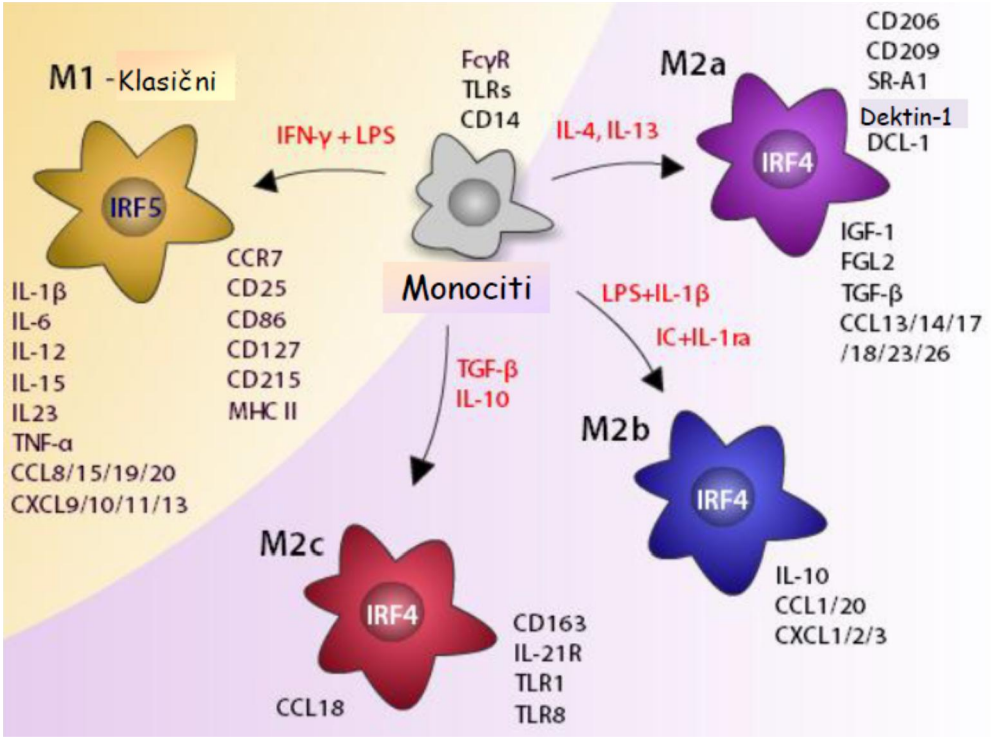
Stanice monocitne/makrofagne loze pokazuju izvanrednu plastičnost kao odgovor na endogene i egzogene podražaje što se može koristiti kod premošćivanja početnih M1/M2 polarizacijskih procesa, primjerice pretvorbe M2 makrofaga u M1 aktivirano stanje pod određenim uvjetima.

Nasuprot tome, M2 makrofazi imaju lošu sposobnost predočavanja antigena, proizvode čimbenike koji potiskuju proliferaciju i aktivnost limfocita T te uglavnom sudjeluju u uklanjanju parazita, remodeliranju tkiva, imunomodulaciji i progresiji tumora (Fairweather i Cihakova; 2009). Tako primjerice, IL-10 eksprimiran od strane M2-makrofaga potiče Th2 stanice da proizvode IL-4 i IL-13 (Th2 citokine) (Mantovani i sur., 2009), inhibira sintezu proupalnih citokina kao što su IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF-a i GM-CSF te suprimira sposobnost predočavanja antigena antigen predočnim stanicama (APC). Nadalje, proizvodnja Ccl17, Ccl22 i Ccl24 pogoduje privlačenju imunosnih inhibitornih stanica kao što su regulatorni limfociti T (Treg) (Mantovani i sur., 2002).

Različite Th stanične linije i njihovi citokini prikazani su na Slici 20.

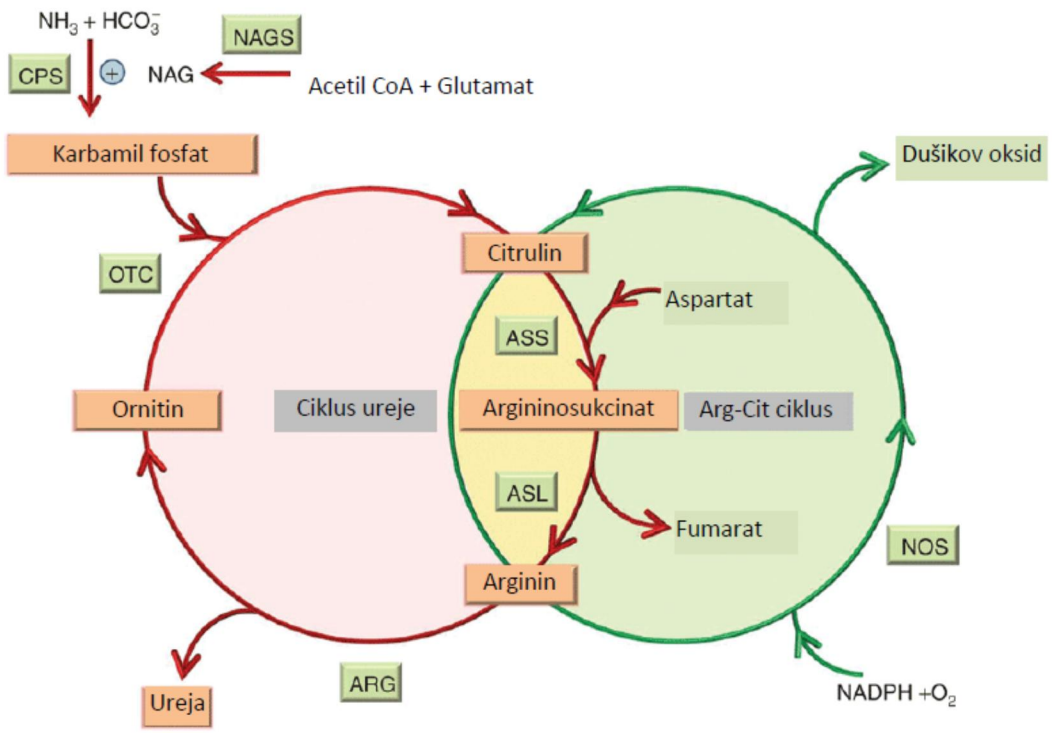


Slika 20. Različite Th stanične linije, njihovi glavni regulatori i karakteristični citokini (preuzeto i prilagođeno: O'Shea i sur., 2010)



Slika 21. Aktivacija makrofaga i polarizacija (preuzeto i prilagođeno: http://www.biolegend.com/NewsLegend/022311/index.htm)

Prema tome, povećana regulacija enzima Arg-1 uglavnom je prisutna kod M2 makrofaga koji luče proangiogene čimbenike poput VEGF-a, MMP-2 i MMP-9 te posjeduju protuupalno svojstvo popravka oštećenog tkiva, dok je iNOS više prisutna kod M1 makrofaga koji luče proupalne citokine te imaju pojačano protumikrobno djelovanje. Zbog svega navedenog, svi čimbenici koji kontroliraju brzinu toka L-arginina između Arg-1 i iNOS mogu biti važni u regulaciji staničnog rasta kako ne bi došlo do pojave kroničnog oboljenja (Slika 22).



Slika 22. Ciklus ureje i arginin-citrulin ciklus. Iako je argininosukcinat liaza (ASL) uključena u ciklus ureje bez sinteze arginina u jetri, mnoštvo tkiva ovise o tome zbog regeneracije arginina. U većini tkiva, arginin-citrulin ciklus povezuje recikliranje arginina do citrulina pomoću dušik oksid sintaze (NOS) uz stvaranje dušikova oksida (NO) (preuzeto i prilagođeno: Erez, 2013).

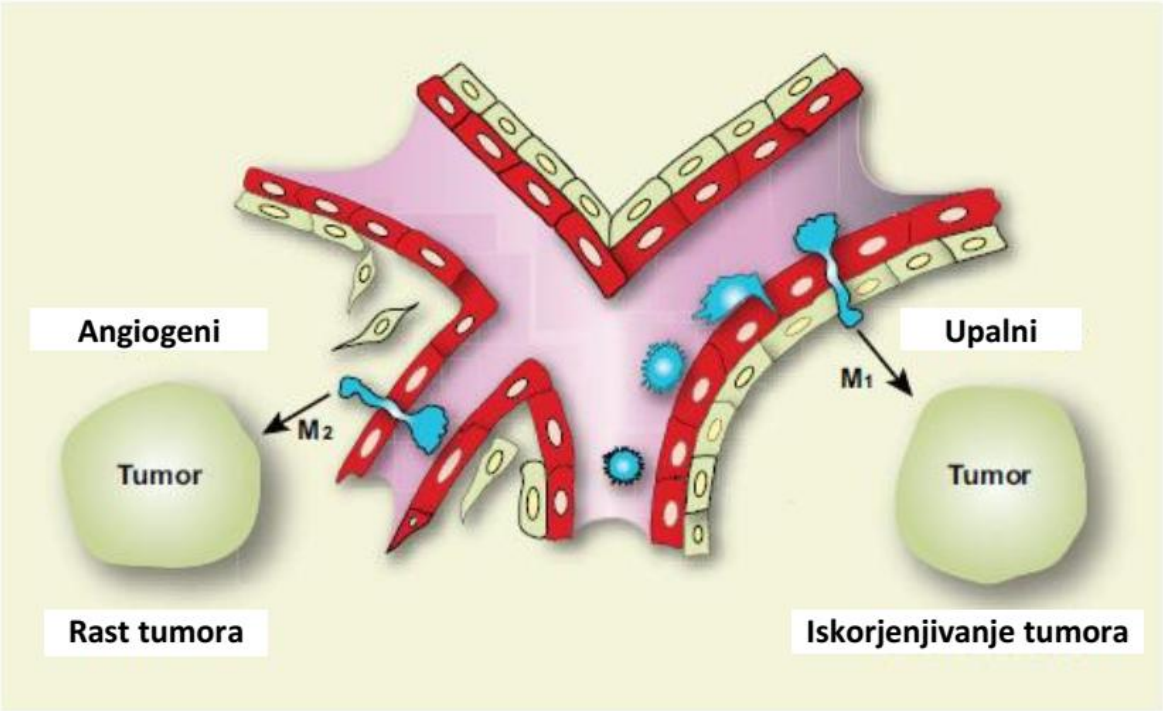
Kratice: ARG, arginaza; **ASL**, argininosukcinat liaza; **ASS**, argininosukcinat sintetaza; **CPS**, karbamil fosfat sintetaza; **NADPH**, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidaza; **NAG**, N-acetilglutamat; **NAGS**, N-acetilglutamatsintetaza; **OTC**, ornitin transkarbamilaza.

2.4.1. Tumoru pridruženi makrofagi (TAMs, engl. tumor-associated macrophages)

Solidni tumori kao i primarne lezije te metastaze infiltrirani su velikim brojem tumoru pridruženih leukocita koji čine heterogenu populaciju stanica sastavljenu od raznih (i varijabilni) podskupina limfocita T (pomoćnički, supresorski i citotoksični), limfocita B, NK stanica i makrofaga (Jiang i sur., 2015). Makrofazi su često dominantni budući da čine do 80 % stanične mase u karcinomu dojke (Bingle i sur., 2002).

Posljednjih godina pojavili su se uvjerljivi dokazi da makrofazi imaju važnu ulogu u razvoju tumora. Iako je njihova uloga u tumorima i dalje kontroverzna, u većini ljudskih karcinoma kao što su karcinom dojke, prostate, jajnika, cerviksa, pluća i melanom kože, mikrookoliš tumora koji je bogat makrofazima u korelaciji je s lošom prognozom (Jiang i sur., 2015; Pollard, 2004; Sica i sur., 2006). Hipoksični stres u tumorskoj masi dovodi do ekspresije upalnih molekula koje promiču regrutiranje makrofaga koje je praćeno pretvorbom u M2 fenotip (Jiang i sur., 2015). TAMs su sposobni modulirati i inducirati neovaskularizaciju kao i uloge koje su vezane uz stvaranje strome. Ovi tumoru pridruženi makrofazi (TAMs) dijele mnoge zajedničke osobine s alternativno aktiviranim makrofazima pokazujući tipične M2 biljege s visokom ekspresijom lektinskih receptora C-tipa (kao što su manoza receptor (MR) i Mgl-1/2), stabilina 1 i Arg-1 (Mantovani i sur., 2002). TAMs potječu iz cirkulirajućih monocitnih prekursora (Slika 23), prethodno unovačenih u tumorsku regiju kao odgovor na kemokine (poput CCL2 kemokina (engl. *chemokine (C–C motif) ligand 2*) poznatog i kao monocitni kemotaktički protein (MCP)) i citokine koje luče tumorske stanice (Través i sur., 2012). Ostali kemoatraktanti koji su uključeni u privlačenje monocita u tumorsku masu su M-CSF ili CSF-1 (engl. *macrophage-colony stimulating factor*), VEGF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, MIP-1α (engl. *macrophage inflammatory protein-1 alpha*) i MIF (engl. *macrophage migration inhibition factor*), a njihova razina u tumorskoj masi često pozitivno kolerira s brojnošću TAMs kod humanih tumora (Murdock i sur., 2004). Također, tumorske stanice oslobađaju čimbenike rasta kao što su kiseli (aFGF/FGF1) i bazični (bFGF/FGF2) čimbenik rasta fibroblasta, VEGF, GM-CSF, TGF-α, čimbenik rasta sličan inzulinu 1, PDGF, čimbenik rasta tumora β (TGF-β) i drugi monokini poput TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, supstanca P, prostaglandini, interferoni i trombospondin koji dovode do aktivacije

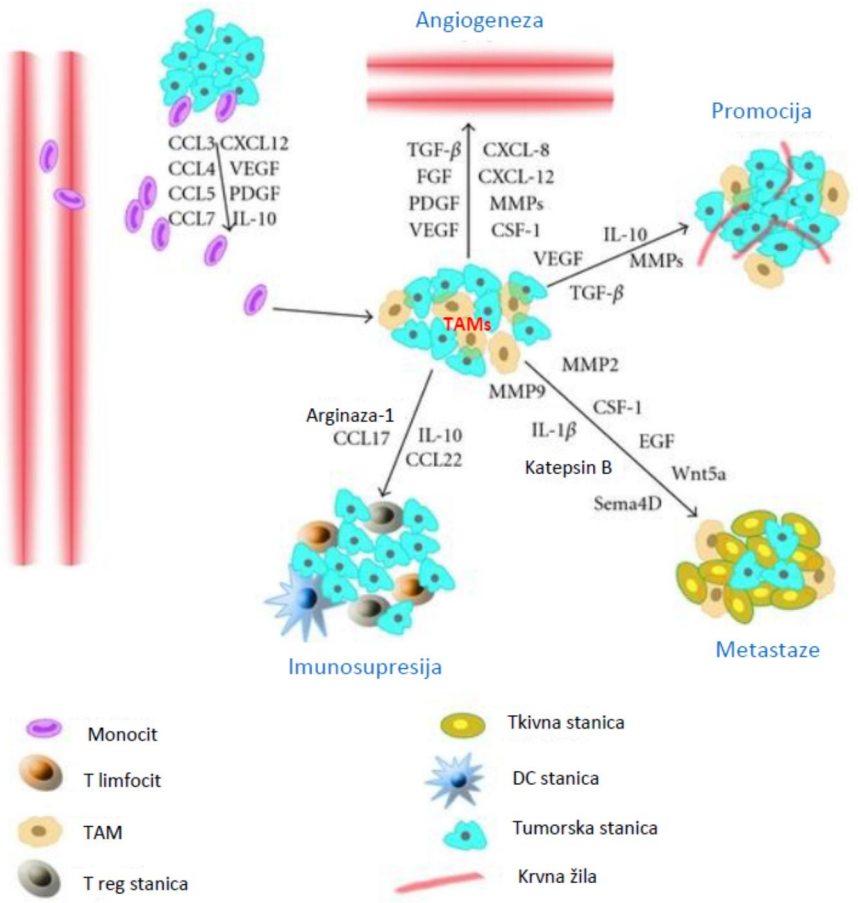
makrofaga i imaju sposobnost utjecanja na angiogeni proces (Jiang i sur., 2015; Tanaka i sur., 2002; White i sur., 2001)



Slika 23. Proces polarizacije makrofaga (preuzeto i prilagođeno: Lamagna i sur., 2006)

U tumorskoj masi, TAMs vrše imunosupresivne funkcije kroz otpuštanje protuupalnih citokina i proteaza (poput TGF-β, IL-10 i Arg-1) (Bak i sur., 2008; Flavell i sur., 2010; Jiang i sur., 2015; Kurte i sur., 2004), moduliraju mikrookoliš tumora kroz proizvodnju čimbenika rasta i preživljavanja (npr. VEGF-a) i olakšavaju napredovanje i rast tumora kroz oslobađanje proangiogenih čimbenika čime utječu na migraciju tumorskih stanica, angiogenezu i vaskularizaciju (Jiang i sur., 2015; Mantovani i sur., 2002; Pollard, 2004). Tako primjerice TGF-β kojeg izlučuje TAMs inhibira protutumorski odgovor različitim mehanizmima uključujući a) inhibiciju citolitičke aktivnosti NK stanica (Castriconi i sur., 2003; Flavell i sur., 2010), b) diferencijaciju $CD4^+$ limfocita T u Th2 stanice (Maeda i Shiraishi, 1996), c) inhibiciju protutumorske aktivnosti $CD8^+$ limfocita T (Flavell i sur., 2010) i d) održavanje diferencijacije Treg stanica (Flavell i sur., 2010). IL-10 pospješuje izbjegavanje imunosne reakcije (Jiang i sur., 2015) sprječavajući proizvodnju IL-12, citokina koji potiče proliferaciju i citotoksičnost limfocita T i NK stanica (Beissert i sur., 1995) kao i otpuštanje citokina IFN-γ, glavnog čimbenika koji potiče diferencijaciju limfocita T (Sica i sur., 2000). Osim toga, IL-10 smanjuje sposobnost epidermalnih antigen predočnih stanica

(APC) u predstavljanju tumoru pridruženih antigena interferirajući time s indukcijom protutumorskog imunosnog odgovora (Beissert i sur., 1995). Visoka aktivnost Arg-1 uočena je kod TAMs u 3LL mišjem karcinomu pluća (Rodríguez i sur., 2008), u mišjim tumorima humanog papiloma virusa koji izražavaju E6/E7 (Lepique i sur., 2009) i $CD11b^{+}/CD14^{-}$ mijeloidnim stanicama iz karcinoma bubrega (Ochoa i sur., 2007). Povećana ekspresija Arg-1 može potaknuti rast tumora kroz nekoliko mehanizama uključujući smanjenje regulacije NO-posredovane citotoksičnosti tumora (Chang i sur., 2001), povećanje stanične proliferacije kroz sudjelovanje u sintezi poliamina i prolina, disregulacije signalizacije TCR receptora, induciranje supresije i neaktivnosti $CD8^{+}$ limfocita T (Bak i sur., 2008) te povećanje sposobnosti inhibicije mijeloidnih supresorskih stanica na proliferaciju limfocita T (Rodríguez i sur., 2008). Konačno, TAMs oslobađaju kemokine koji imaju temeljnu ulogu u imunosupresiji. Ccl13, Ccl18 (samo kod čovjeka), Ccl22, a u manjoj mjeri i Ccl17 važni su kemoatraktanti za inhibitorne stanice imunosnog sustava kao što su Treg koje mogu inhibirati protutumorsku imunost što rezultira rastom tumora i smanjenjem preživljavanja bolesnika (Mantovani i sur., 2004). Štoviše, Ccl2 i Ccl5 potiskuju odgovore posredovane limfocitima T (Mantovani i sur., 2004). Brojni dokazi ukazuju da TAMs imaju ključnu ulogu u regulaciji angiogeneze kod mnogih tumora poput glioma, karcinoma pločastih stanica jednjaka, karcinoma dojke, mokraćnog mjehura i prostate (Bingle i sur., 2002; Hanada i sur., 2000; Koide i sur., 2004; Lissbrant i sur., 2000) budući da je uočena korelacija između povećanja brojnosti TAMs i visokog stupnja prožiljenosti kod mnogih vrsta tumora (Hanada i sur., 2000; Koide i sur., 2004; Lissbrant i sur., 2000).



Slika 24. Uloge TAMs u progresiji tumora (preuzeto i prilagođeno: Hao i sur., 2012)

TAMs potiču invaziju tumorskih stanica izlučivanjem širokog spektra molekula, uključujući čimbenike rasta (VEGF, PDGF, TGF-β), proangiogene citokine (IL-8 ili Cxcl8), proteaze poput matriks metaloproteinaza (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 i MMP-12) (Giraudo i sur., 2004; Hagemann i sur., 2006; Krecicki i sur., 2001), lizosomalne proteaze tipa cisteina, plazmina, urokinazni plazminogen aktivator i receptor te kemokine (poput Ccl2, Ccl5, Cxcl9 i Cxcl16) (Slika 24) (Balkwill, 2004). Osim toga, utvrđeno je da TAMs stvaraju hipoksične regije kod humanih i eksperimentalnih tumora poput karcinoma endometrija, dojke, prostate i jajnika (Lewis i Pollard, 2006). TAMs reagiraju na hipoksični mikrookoliš pojačavajući hipoksijom izazvanu transkripciju čimbenika HIF-1 i HIF-2 koji induciraju ekspresiju proangiogenih gena kao što su VEGF, Cxcl8 i Cxcl12. Istraživanja su pokazala da su TAMs bitni za rast tumora (Polverini i Leibovich, 1987) te da je njihova infiltracija uočena kod nekoliko vrsta tumora kao što su rak dojke, endometrija i bubrežnih stanica (Tsutsui i sur., 2005) što pokazuje pozitivnu korelaciju između proliferacije tumorskih stanica i

infiltracije TAMs-a. Nekoliko čimbenika/molekula poput MMP-9, IL-23 i IL-10 koje luče TAMs olakšavaju proliferaciju tumorskih stanica i time ograničavaju citotoksičnost mikrookoliša. TAMs su također uključeni u regulaciju procesa metastaziranja pri čemu je vidljivo da sustavno smanjenje makrofaga rezultira manjim stvaranjem metastaza u plućima (Lin i sur., 2001). Čini se da TAMs utječu na mikrookoliš oslobađanjem MMPs poput MMP-2, MMP-7 i MMP-9 kako bi olakšali migraciju tumorskih stanica (Coffelt i sur., 2009; Wyckoff i sur, 2004) budući da ove MMPs doprinose transformaciji proteina izvanstaničnog matriksa i induciraju ekspresiju čimbenika rasta limfnog endotela (VEGF-C) koji potiče stvaranje limfnih žila u tumoru (Schoppmann, 2005). Osim lučenja VEGF-a, TAMs olakšavaju progresiju tumora kroz otpuštanje i drugih proangiogenih čimbenika poput IL-8, PDGF i TGF-β te povećavaju aktivnost arginaze, a smanjuju aktivnost iNOS. Protumorska funkcija TAMs čini ove stanice ciljnim metama za biološko istraživanje protutumorske terapije; povećanje M1 tumoricidne djelotvornosti TAMs i blokiranje M2 tumorske aktivnost TAMs moglo bi biti ključno u inhibiciji angiogeneze te inhibiciji rasta tumora (Allavena i Mantovani 2012).

2.5. POLIFENOLI

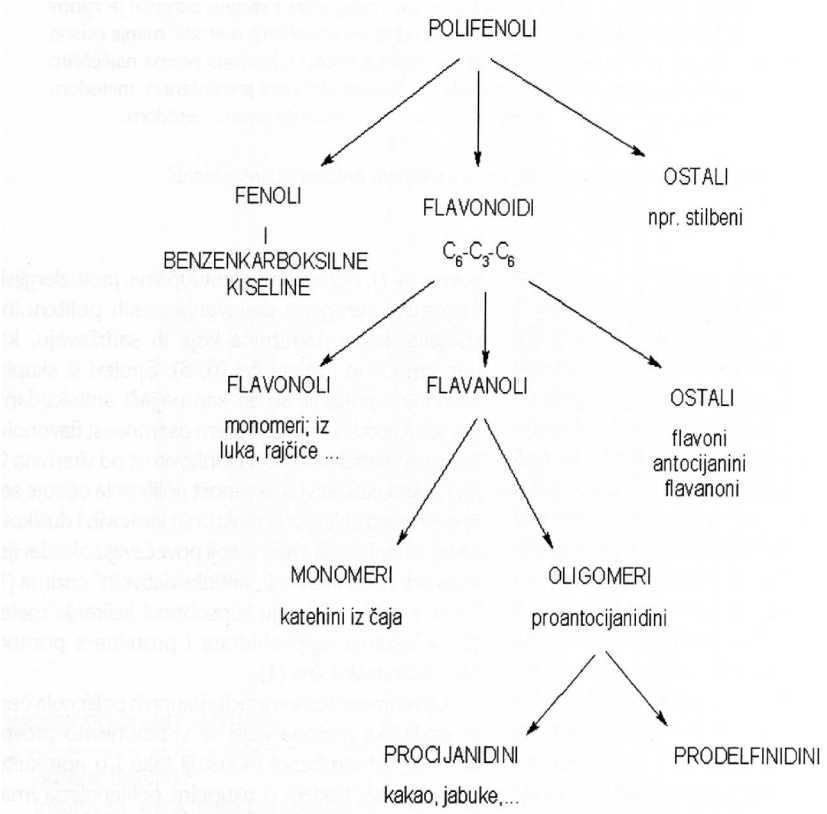
Polifenoli su heterogena skupina biljnih spojeva nastali kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka, a koji se međusobno razlikuju prema broju hidroksiliranih benzenskih prstenova (Blasco i sur., 2005). Njihova uloga je održavanje normalnih fizioloških procesa u biljkama te pružanje zaštite biljkama od UV zračenja, infekcije patogena, oksidacijskog oštećenja i oštrih klimatskih uvjeta, dok u namirnicama pridonose gorčini, oštrini, boji, okusu, mirisu i oksidacijskoj stabilnosti (Naczk i Shahidi, 2004). Do danas je poznato više od 8 000 polifenolnih spojeva koje prema kemijskog građi (broju fenolnih prstenova i supstituenata na njima) dijelimo na: a) fenolne kiseline, b) flavonoide, c) stilbene i d) lignine (Manach i sur., 2004) (Slika 25). Hrana biljnog podrijetla predstavlja bogat izvor polifenolnih spojeva, a sadržaj tih spojeva ne ovisi samo o okolišnim uvjetima tijekom vegetacije biljaka već i o metodama prerade hrane (Andreotti i sur., 2008; D'Archivio i sur., 2010). Biološka dostupnost polifenola ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su njihova kemijska struktura, topljivost u vodi, količina konzumirane hrane i koncentracija polifenola u određenoj hrani. Većina polifenola prisutna je u hrani u obliku polimera ili glikozida koji nisu biološki

dostupni. Međutim, oni se razgrađuju do biodostupnih spojeva male molekulske mase pomoću crijevnih enzima koji potječu od domaćina ili ih luči crijevna mikroflora (Cerda i sur., 2004; D'Archivio i sur., 2010). Prije nego što polifenolni metaboliti uđu u krvotok, oni kao i drugi ksenobiotici prolaze kroz strukturne promjene u tankom crijevu, ali prvenstveno u jetri. Te promjene sastoje se od konjugacije s glukuronskom kiselinom, sumpornom kiselinom ili metilnim ostacima s ciljem smanjenja toksičnog učinka ksenobiotika. Konjugacija također olakšava uklanjanje ksenobiotika pomoću žuči ili urinom što proizlazi iz njihove povećane topljivosti i molekulske mase konjugiranih metabolita. Nepromijenjeni polifenoli rijetko se nalaze u krvi, osim primjerice katehina zelenog čaja. Koncentracija polifenola u gastrointestinalnom sustavu može prijeći 1 mM (Scalbert i Williamson, 2000), dok s druge strane koncentracije određenih metabolita polifenolnih spojeva u krvi rijetko dosegnu 1 μM (D'Archivio i sur., 2010). No usprkos tome, dokazano je da polifenoli posjeduju kemopreventivna svojstva na sustavnoj razini kako kod ljudi (Thomasset i sur., 2007) tako i na animalnim modelima (Yamakoshi i sur., 2002).

Zbog sve veće zastupljenosti polifenola u ljudskoj prehrani javlja se povećano zanimanje za njihovo istraživanje posebice u prevenciji bolesti povezanih s oksidacijskim stresom poput dijabetesa, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i malignih bolesti. Dokazano je da imaju različita biološka svojstva na ljudsko zdravlje kao što su antioksidativno, imunomodulatorsko, protutumorsko, kemopreventivno, antiangiogeno, protuupalno, protuosteoporotsko, protualergijsko, protumikrobno, hipoglikemijsko (Arts i Hollman, 2005; Joseph i sur., 2005; Lambert i sur., 2005; Vita, 2005). Nadalje, polifenoli koji čine aktivne tvari u mnogim ljekovitim biljkama mogu modulirati aktivnost širokog raspona enzima i staničnih receptora. Kako bi se postigla učinkovitost u liječenju raka, znanstvenici su se usredotočili na farmakološka istraživanja bioaktivnih spojeva ekstrahiranim iz biljaka ili polusintetske derivate dobivene iz prirodnih spojeva. Istraživanja su pokazala da biljke koje obiluju polifenolnim spojevima mogu djelovati ne samo na humoralni imunološki odgovor (Kong i sur., 2004), već i na staničnom nivou, kroz aktivaciju limfocita B i naknadnom proliferacijom limfocita T *in vitro* (Lin i sur., 2005).

Iako je poznato da su biljni polifenoli prirodni antioksidansi pri nižim koncentracijama, oni isto tako mogu djelovati i kao prooksidansi *in vitro* (Ahmad i sur., 1992; Inoue i sur., 1994;) ako se radi o višim koncentracijama. Osim toga, utvrđeno je da njihova prooksidativna sposobnost u prisutnosti iona prijelaznog metala (npr. Cu ili Fe) može biti važan mehanizam protutumorskog i apoptozom induciranog djelovanja (Hadi i sur., 2000) budući da reaktivne vrste kisika (ROS) mogu posredovati apoptotičkoj fragmentaciji DNA. Istraživanja su pokazala da flavonoidi (Ahmad i sur., 1992), taninska kiselina i njen strukturni sastojak galna kiselina (Khan i Hadi, 1998), kurkumin (Ahsan i Hadi, 1998), galokatehini (Malik i sur., 2003) i resveratrol (Ahmad i sur., 2000) uzrokuju oksidacijsko cijepanje DNA bilo u prisutnosti ili bez iona prijelaznog metala kao što je bakar. Bakar je važan metal prisutan u kromatinu i usko je povezan s DNA bazama, posebice gvaninom (Kagawa i sur., 1991) kao i jedan od najviše redoks aktivnih različitih metalnih iona prisutnih u stanici. Smatra se da većina farmakoloških svojstava biljnih polifenola odražavaju njihovu sposobnost sakupljanja endogeno stvorenih radikala kisika ili slobodnih radikala stvorenih od strane različitih ksenobiotika (antikarcinogeni lijekovi, anestetici, antibiotici, analgetici, herbicidi, antihipertenzivi, antidepresivi, alkohol,...), zračenja itd. Međutim, pojedini literaturni podatci ukazuju da se antioksidativna svojstva polifenolnih spojeva ne mogu u potpunosti objasniti njihovim kemopreventivnim i protutumorskim učincima (Gali i sur., 1992; Hadi i sur., 2000). Tako je primjerice potvrđeno da se neki od polifenolnih spojeva mogu vezati za DNA i Cu(II) tvoreći trokomponentni kompleks kao što je kompleks resveratrol-Cu(II) koji može izazvati razaranje DNA u humanim perifernim limfocitima upotrebom alkalnog komet testa (Azmi i sur., 2005). U takvom trokomponentnom kompleksu može doći do redoks reakcije između polifenola i Cu(II) pri čemu prvotno dolazi do redukcije Cu(II) u Cu(I), a zatim do ponovne reoksidacije Cu(I) u Cu(II) stvarajući različite reaktivne vrste kisika (ROS). No, isto tako sami polifenoli (u odsutnosti dodanog Cu) mogu također uzorkovati lom DNA u stanicama. Inkubacija limfocita s neokuproinom, koji je specifični kelator Cu(I), dovela je do inhibicije razgradnje DNA uzrokovane reaktivnim vrstama kisika što je potvrdilo da je Cu(I) intermedijer u reakciji cijepanja DNA tijekom redukcije Cu(II) u Cu(I) polifenolima (Azmi i sur., 2005). Budući da je bakar glavni metalni ion pristan u jezgri, uočeno je da su razine Cu znatno povišene u stanicama, tkivima i serumu kod različitih malignih oboljenja. Stoga stanice raka mogu biti podložnije prijenosu elektrona između iona Cu i polifenola s ciljem stvaranja ROS-a.

Polifenoli predstavljaju važnu skupinu kemoprevencijskih sredstava budući da mogu ukloniti ili spriječiti stvaranje ROS i RNS (D'Angelo i sur. 2009). Sposobnost polifenolnih spojeva za uklanjanje slobodnih radikala proizlazi iz njihove kiselosti (sposobnosti doniranja protona iz hidroksilnih skupina) i njihovih delokaliziranih π-elektrona (sposobnosti premještanja elektrona dok struktura ostaje relativno stabilna) karakterističnih za benzenske prstenove.



Slika 25. Osnovna podjela polifenola (preuzeto: Berend i Grabarić, 2008)

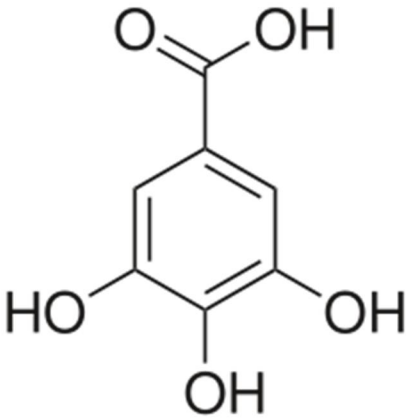
2.5.1. Galna kiselina

Galna kiselina (GA) ($C_7H_6O_5$) poznata i pod nazivom 3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina (Slika 39), prisutna je u biljkama poput lijeske, ruja, rogača, kore hrasta, zatim u listovima čajeva, kavi, voću (jagode, borovnice, grožđe, mango, ananas, banane, limun), povrću (luk, krumpir) te crvenom i bijelom vinu u slobodnom obliku ili češće kao sastavni dio tanina zvanih galotanini koji hidrolizom daju šećer i galnu kiselinu. Dobro se apsorbira u ljudi budući da je utvrđena mikromolarna koncentracija slobodnog i glukoronidiranog oblika GA kao i njezinog glavnog metabolita 4-O-metilgalne kiseline u krvnoj plazmi čovjeka nakon unosa hrane bogate GA (Manach i sur., 2005; Shahrzad i sur., 2001). Pronađeno je da galotanini inhibiraju topoizomerazu II u *in vitro* uvjetima (Kashiwada i sur., 1993).

Što se tiče njezine biološke aktivnosti, GA djeluje antioksidativno, protubakterijski, protuvirusno, protuupalno (Kang i sur., 2008; Kratz i sur., 2008; Wolfe i sur., 2003;), protugljivično (Klein i Weber, 2001), protumalarijski (Klein i Weber, 2001), antiherpetski (Fiuza i sur., 2004), antimelanogenetski putem inhibicije aktivnosti tirozinaze (Kim, 2007). Također, inhibira dislipidemiju izazvanu prehranom s visokim udjelom masti, steatozu jetre (masna jetra), oksidacijski stres (Hsu i Yen, 2007) kao i mutagene učinke benzidina koji predstavlja kancerogen mokraćnog mjehura kod čovjeka (Makena i Chung, 2007). U različitim staničnim linijama raka poput leukemije (Inoue i sur., 2000), limfoma (Lu i sur., 2006), tumora usne šupljine i jednjaka (Faried i sur., 2007), prostate (Kaur i sur., 2009), pluća (Kawada i sur., 2001), jetre, osteosarkoma, želudca, debelog crijeva, dojke i vrata maternice utvrđeno je protutumorsko, kemopreventivno i selektivno citotoksično djelovanje galne kiseline inhibirajući proliferaciju i rast tumorskih stanica, kao i smanjenje gustoće krvnih žila u *in vivo* ali i *in vitro* uvjetima. Istovremeno kod endotelnih stanica, fibroblasta i humanih limfocita GA ne pokazuje svoje citotoksično djelovanje (Inoue i sur., 1995; Yang i sur., 2001). Smatra se da GA osim antioksidativnog djelovanja može djelovati i prooksidativno ovisno o prisutnosti Fe ili H_2O_2 u mediju ili plazmi (Sakagami i Satoh, 1997; Strlic i sur., 2002). GA također inhibira oslobađanje histamina od strane mastocita, sprječava proizvodnju proupalnih citokina, štiti stanice hepatocita čovjeka od oksidacijskog stresa induciranog vodikovim peroksidom (Li i sur., 2010) i pruža antiapoptotičku aktivnost (Sameermahmood i sur., 2010). Osim toga, GA može kelirati sa slobodnim Fe(III) tvoreći kompleksni spoj (Fazary i sur., 2009) te stoga ima potencijal u sprječavanju gastropatije inducirane

nesteroidnim protuupalnim lijekom kelirajući sa slobodnim Fe(III) i blokirajući oksidacijski stres posredovan aktivacijom apoptoze želučano-mukoznih stanica (Pal i sur., 2010).

Alkilni esterski derivati GA poput, metil, propil, oktil i dodecil galata uvelike se koriste u proizvodnji hrane kao antioksidansi, kao i u farmakološkoj i kozmetičkoj industriji. Prijašnja istraživanja pokazala su da ti spojevi imaju također snažna biološka svojstva poput protutumorskog, protubakterijskog, protuvirusnog, protugljivičnog, protumalarijskog, antiherpetskog kao i antioksidativnog u sakupljanju reaktivnih vrsta kisika (ROS) (Inoue i sur., 1995; Ow i Stupans 2003; Savi i sur., 2005) te da su učinkovitiji oni derivati GA sa 8 ili više ugljikova atoma u bočnom lancu od same galne kiseline. Razlog tomu bilo bi povećanje hidrofobnosti odnosno lipofilnosti same skupine koja čini se jako doprinosi aktivnosti, vjerojatno kroz povećanje afiniteta i propusnosti same stanične membrane (Saeki i sur., 2000). Također, pokazalo se je da su alkilni galati s manje od 8 ugljikovih atoma u bočnom lancu manje aktivni u svome protutumorskom djelovanju od galata s 8-14 ugljikovih atoma u bočnom lancu u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima nekoliko staničnih linija raka poput staničnih linija melanoma, raka pluća i dojke. Osim toga, alkilni esterski derivati GA pokazuju nisku citotoksičnost u uvjetima *in vitro* u netumorskih staničnih linija poput normalnih mišjih epitelnih stanica mozga i fibroblasta bubrega majmuna (Savi i sur., 2005; Lu i sur., 2010).



Slika 26. Struktura galne kiseline

(preuzeto od: https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid)

Mogući mehanizmi djelovanja GA i njezinih derivata u induciranju apoptoze tumorskih stanica su različiti (Slika 28). Propil galat sadrži hidrofobnu alkilnu estersku skupinu koja pomaže spoju pri prolasku kroz staničnu membranu i ulasku u citoplazmu (Jacobi i sur., 1999) pri čemu se propil galat pretvara u GA uz pomoć esteraze prisutne u

citoplazmi uz proizvodnju ROS-a. Pri tome dolazi do oslobađanja reaktivnih vrsta poput vodikovog peroksida (H_2O_2), superoksidnog anionskog radikala ($O_2^{-\bullet}$) i semikinona koji su odgovorni za oštećenje DNA i posljedično induciranje apoptoze (Inoue i sur., 2000; Jacobi i sur., 1999). Također i oktil galat ima citotoksično djelovanje izravno povezano s proizvodnjom slobodnih radikala (Locatelli i sur., 2009) dok se galati do 8 ugljikova atoma u alkilnom bočnom lancu (metil, propil i oktil) mogu apsorbirati i metabolizirati pomoću unutarstaničnih esteraza potičući proizvodnju slobodnih radikala, dok oni s više od 8 atoma ugljika (decil i dodecil galati) to ne mogu (Tammela i sur., 2004). Pokazalo se je da lauril, metil i propil galat induciraju apoptozu u staničnim linijama tumora i inhibiraju proliferaciju limfocita (Mahadevan i Reddy, 1968).

Pretpostavlja se da GA i neki derivati poput propil galata induciraju apoptozu vanjskim putem kroz aktivaciju Fas receptora koji je važan posrednik za smrt apoptotičkih stanica pomoću Fas liganda (Fas-L) (Chen i sur., 2011), dok galati s 8 ili više ugljikovih atoma u bočnom lancu induciraju apoptozu stanica aktiviranjem unutarnjeg puta (Locatelli i sur., 2013). Istraživanja su pokazala da su alkilni esteri učinkovitiji od GA u induciranju apoptoze i da je aktivnost povezana s amfipatskim svojstvom alkilnih esterskih derivata što je povezano s povećanjem afiniteta i permeabilnosti stanične membrane (Locatelli i sur., 2013).

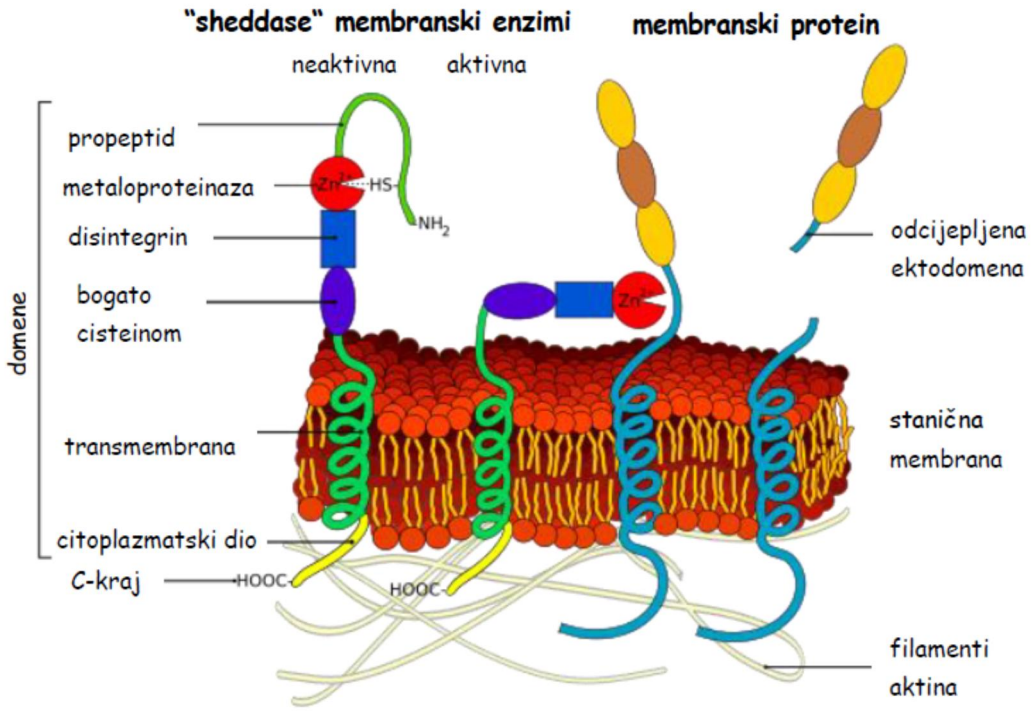
Osim toga, istraživanja su pokazala da je protutumorsko djelovanje GA i galata povezano sa sposobnošću stvaranja ROS-a i povećanje razine unutarstaničnog Ca^{2+} što dovodi do aktivacije kaspaze 3 i oslobađanja citokroma c u citoplazmu kroz povećanu permeabilnost pora mitohondrija (MPT pore, engl. *mitochondrial permeability transition pore*) (Isuzugawa i sur., 2001) te aktiviranja ostalih kaspaza poput pro-kaspaze 9, kaspaze 3 i čimbenika aktivacije apoptotičke proteaza (Apaf-1, engl. *apoptotic peptidase activating factor 1*) koji dovodi do fragmentacije DNA i uništenja same stanice. Drugi učinak koji je potaknut GA i galatima je induciranje ekspresije kaspaze 3 i kaspaze 8, promjena odnosa ekspresije Bcl-2/Bax proteina u korist Bax proteina i inhibicija fosforilacije tirozna BCR/ABL kinaze kao i smanjenje razine COX-2 regulacije što rezultira promjenom mitohondrijskog potencijala i indukcijom apoptoze (Reddy i sur., 2012; Yeh i sur. 2011).

Naime, GA, oktil i dodecil galati induciraju smanjenje mitohondrijskog potencijala na membrani (de Cordova i sur., 201; You i sur., 2010) kao i povećanje Bax ekspresije, a smanjenje Bcl-2 ekspresije budući da je poznato da je Bcl-2 protein uključen u povećanje rezistencije na apoptozu (de Cordova i sur., 2011; Roy i sur., 2000). Madlener i sur., (2007)

pokazali su da je GA sposobna inhibirati aktivnost COX-1 i COX-2 u HL-60 staničnim linijama, što je osobito zanimljivo budući da se smatra da je povećanje COX-2 ekspresije povezano s napredovanjem tumora kroz poticanje diobe stanica i inhibiciju apoptoze (Rizzo 2011; Tang i sur., 2002). Galati s 8 ili više ugljikovih atoma u bočnom lancu potiču smanjenje ATP razine i uzrokuju promjenu mitohondrijskog potencijala. U nekim slučajevima, povećanje membranskog potencijala i koncentracije ATP-a predstavlja jedan od početnih koraka apoptoze, dok se s druge strane, obično javlja snažno smanjenje sadržaja ATP-a u stanici izazivajući apoptozu (Biroccio i sur., 2002).

Istraživanje provedeno s propil galatom pokazalo je također sličan učinak budući da taj spoj inhibira aktivnost sukcinat dehidrogenaze, enzima povezanog s Krebsovim ciklusom. Povećanje ROS razine u tumorskim stanicama dovodi do povećanja razine katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD), a istovremeno do smanjenja GSH razine što dovodi do apoptoze stanica (de Cordova i sur., 2011; Han i Park 2009; Locatelli i sur., 2008; 2009; You i Park 2010; You i sur., 2010) pri čemu to smanjenje razine GSH može biti povezano sa smanjenjem aktivnosti enzima i ekspresijom proteina γ-glutamil cistein sintaze (γ-GCS) (Chen i sur., 2011; Locatelli i sur., 2009). Benlloch i sur., (2005) navode da otkriće spojeva koji su sposobni održavati nisku razinu glutationa u metastatskim stanicama mogu predstavljati ključni napredak u liječenju raka, uglavnom jer je glutation uključen u mehanizme višestruke rezistencije na lijekove u tumorskim stanicama. Kim (2007) je pokazao da GA promiče nukleofilni napad na GSH, što dovodi do smanjenja koncentracije GSH i povećanja količine adukta GSH-GA. Abnormalni redoks uvjeti u tumorskim stanicama mogu dati ciljanog kandidata za terapijske svrhe. Proizvodnja slobodnih radikala i aktivacija kaspaze-9 i kaspaze-3 javljaju se kasnije u apoptozi i čini se da su posljedica redoks neravnoteže (Biroccio i sur., 2002). Štoviše, budući da povišene razine GSH-a imaju važnu ulogu u posredovanju otpornosti tumorskih stanica na kemoterapiju, učinak galata na sadržaj GSH u stanici koji mogu pridonijeti povećanju osjetljivosti na lijekove i inhibiciji aktivnosti γ-GCS, može biti terapeutski korisno zbog ponovnog uspostavljanja apoptotičkog puta u stanicama raka. Poremećaj u redoks ciklusu glutationa može utjecati na sakupljanje slobodnih radikala u stanici, te je u skladu s time primijećeno da primjena galata u kombinaciji sa Trolox®-om ili SOD-om tijekom inkubacije na mišjim stanicama melanoma (B16F10) smanjuje smrt stanica te da je ujedno došlo do inhibicije stvaranja slobodnih radikala nakon istovremene inkubacije galata s Trolox®-om (Locatelli i sur., 2009).

Čini se da galati također potiču povećanje ekspresije p53 i p21, što dovodi do promjena unutar staničnog ciklusa poput povećanja G1/S faze i smrti stanice. Od ostalih učinaka galata (oktil, dodecil i tetradecil galat), poznato je da uzrokuju inhibiciju P-glikoproteina (P-gp) poznatog kao i MDR1 (engl. *multidrug resistance protein 1*) koji je odgovoran za rezistenciju tumorskih stanica. Stoga se sposobnost galata da blokiraju Pgp pumpu može primijeniti za smanjivanje otpornosti tumorskih stanica na djelovanje raznih lijekova. Nadalje, galati inhibiraju migraciju i adheziju tumorskih stanica, inhibiranjem ekspresije adhezijskih proteina ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*) i VCAM-1 (engl. *vascular adhesion molecule 1*) na površini same stanice čime se zapravo smanjuje sposobnost metastaziranja tumorskih stanica (Locatelli i sur., 2011). S obzirom na pojavu metastaziranja, GA može smanjiti invazivnost tumora smanjenjem regulacije metaloproteinazne domene 17 (ADAM17), zatim p-Erk i p-Akt (Lu i sur., 2010). Disintegrin i metaloproteinazne domene (ADAMs) (Slika 27) poznate su kao aktivne peptidaze koje djeluju kao metaloendoproteinaze. ADAM porodica proteina pripada Zn-ovisnim metaloproteinazama (Kheradmand i Werb, 2002; Lu i sur., 2008) pri čemu je ADAM17 važan njezin član koji je uključen u proteolizu kolagena IV u izvanstaničnom matriksu i oslobađanje nekoliko integrina s površine stanice, sugerirajući da ADAM17 utječe na invazivnu aktivnost različitih stanica uključujući i glioma stanice (Wildeboer i sur., 2006). Galna kiselina, propil, oktil i lauril galati značajno snižavaju fosforilaciju članova protein tirozin kinaza (PTK), PI3K/Akt i Ras/MAPK prijenosnih signalnih puteva koji su uključeni u vijabilnost, proliferaciju, invaziju, preživljavanje stanice i stvaranje žila (Lu i sur., 2010; Roy i sur., 2000; Serrano i sur., 1998) što upućuje da supresija ADAM17 pomoću GA može biti odgovorna za smanjenje invazivnosti tumora kroz smanjenje regulacije signalnih putova PTK, PI3K/Akt i Ras/MAPK (Lu i sur., 2010).



Slika 27. Građa ektodomene ADAM metaloproteinaze (preuzeto i prilagođeno od: https://en.wikipedia.org/wiki/Sheddase)

S druge strane, galna kiselina istovremeno inhibira razinu ekspresije mRNA i proteina MMP-2 i MMP-9 što dovodi do smanjenja migracije stanica i metastaziranja (Ho i sur., 2010; Liao i sur., 2012; Lo i sur., 2011;) pri čemu su mogući signalni putevi djelovanja GA posljedica smanjenja regulacije proteina kinaze C (PKC), inhibicije mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) i fosfatidilinozitol-3-kinaze/protein kinaze B (PI3K/AKT) (Liao i sur., 2012). Nadalje, kao jedan od mogućih mehanizama induciranja apoptoze od strane GA je odnos između inhibicije NF-κB aktivnosti i smanjenja regulacije PI3K/AKT signalnog puta pri čemu GA može povećati sposobnost vezanja inhibitora NF-κB (IκB) za sam čimbenik NF-κB i time suprimirati PI3K/AKT signalni put kroz smanjenje razine proteina PI3K, AKT-1 i P-AKT što posljedično dovodi do smanjenja metastaziranja tumorskih stanica adenokarcinoma želudca (Ho i sur., 2010). Naime, NF-κB je transkripcijski čimbenik sastavljen od više podjedinica koji je uključen u odgovor stanice na virusne infekcije i upale, a koji se održava u citoplazmi kroz međureakciju sa svojim inhibitorom IκB. Nakon disocijacije, NF-κB odlazi u jezgru i potiče stanice raka na proliferaciju, angiogenezu i metastaziranje (Park i sur., 2007). Nekoliko istraživanja pokazalo je da količina inhibitora IκB

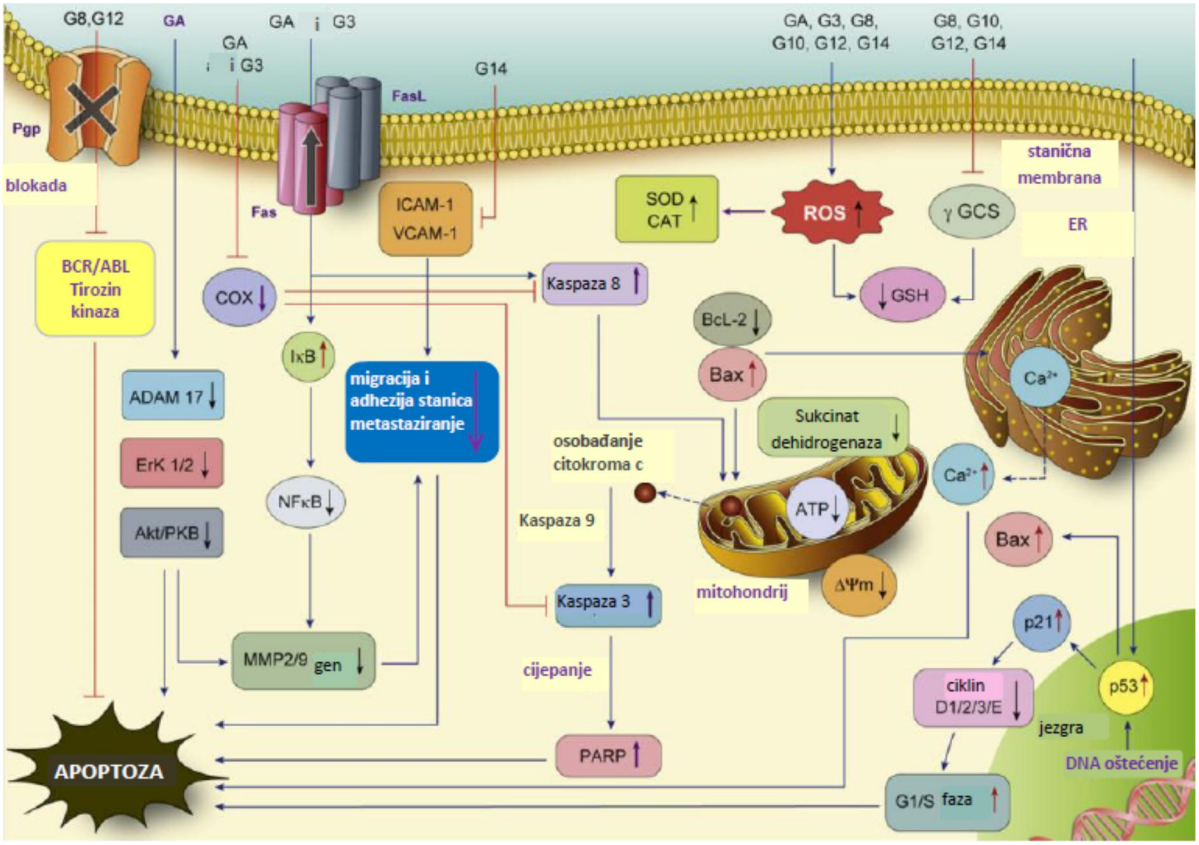
može kontrolirati translokaciju NF-κB u jezgru i time posljedično utjecati na ekspresiju MMP-2 u nekoliko vrsta ljudskih stanica raka (Park i sur., 2007). Poznato je da PI3K signalni transdukcijski put regulira metastaziranje stanica melanoma i da je usko povezan s razvojem i progresijom različitih tumora (Hennessy i sur., 2005), pa je stoga PI3K/AKT signalni put konstitutivno aktivan u većini tumora. Osim uloge u tumorskoj invaziji stanica, ovaj signalni put regulira i mnoge stanične procese uključene u tumorigenezi, rast/veličinu stanice, proliferaciju, preživljavanje, metabolizam glukoze, stabilnost genoma, metastaziranje i angiogenezu (Yoon i sur., 2006). Aktivirani Akt može se izravno vezati za IκB kinazu (IKK) i aktivirati je što dovodi naposljetku do razgradnje IκB inhibitora (Hennessy i sur., 2005). Ras-homologne (Rho) GTPaze igraju ključnu ulogu u regulaciji brojnih staničnih funkcija povezanih s malignom transformacijom i metastaziranjem. Članovi Rho porodice proteina malih GTPaza ključni su regulatori u reorganizaciji aktina, pokretljivosti stanice, adheziji stanica-stanica i izvanstaničnog matriksa kao i u progresiji staničnog ciklusa, ekspresiji gena i apoptoze (Fritz i Kaina, 2006). Iako RhoA, RhoB i RhoC dijele više od 85 % identičnosti aminokiselinskog slijeda, njihova uloga u onkogenezi je sasvim različita. Dok RhoA i RhC kao i drugi članovi GTPazne porodice poput Ras, Rac1 i Cdc42 potiču onkogenezu, invaziju i metastaziranje, novi dokazi ukazuju na tumor-supresivnu ulogu RhoB (Chen i sur., 2000). Nadalje, PI3K je efektor Ras funkcije i potreban je za razvoj i održavanje tumora (Lim i sur., 2005).

U prilog tome govore rezultati istraživanja u kojem su mnogobrojni proteini koji su inače uključeni u signalni put metastaziranja i reorganizaciju citoskeleta, poput Ras, Cdc42, Rac1, RhoA, PI3K i p38MAPK bili inhibirani od strane GA te je značajno smanjena razina citoskeletnog F-aktina, dok je istovremeno došlo do povećanja razine RhoB u stanicama adenokarcinoma želudca (Ho i sur., 2010).

Na temelju tih učinaka, moguće je pretpostaviti da GA može biti korisna u suzbijanju angiogeneze, pri čemu su potrebna daljnja pojašnjenja temeljnih mehanizama. Dok s jedne strane GA i propil galat inhibiraju ekspresiju NF-κB u tumorskim stanicama želudca, oktil, decil i dodecil galati imaju sposobnost povećanja ekspresije NF-κB u stanicama melanoma (Locatelli i sur., 2008; 2009). Transkripcijski čimbenik NF-κB aktiviran je u stanicama nakon izlaganja citotoksičnih spojeva (uključujući i uvjete oksidacijskog stresa), liganada receptora smrti na površini stanice kao što je TNF i Fas te genotoksičnih sredstava i kemoterapijskih lijekova (Bian i sur., 2001). U mnogim slučajevima, aktivacija NF-κB

posreduje u otpornosti na staničnu smrt ili zaštite od apoptoze. S druge strane, neka istraživanja pokazala su da je aktivacija NF-κB važan čimbenik u indukciji Fas-posredovane apoptoze (Bian i sur., 2001). Aktivacija čimbenika NF-κB potiče smanjenje regulacije bcl-2, translokaciju bax i povećanje regulacije p53 inducirajući apoptozu u humanim endotelnim stanicama aorte (Bian i sur., 2001; Shishodia i Aggarwal 2004). U vezi s Fas aktivacijom utvrđeno je da GA inducira apoptozu u 3T3 preadipocitima preko mitohondrijskog puta (Hsu i sur., 2007). Mehanizam stanične smrti oktil galata je vjerojatno povezan s stvaranjem slobodnih radikala, decil i dodecil galata s aktivacijom NF-κB, dok je galat s 14 ugljikovih atoma uključen u inhibiciju adhezije stanica. Razlozi različitih mehanizama induciranja stanične smrti mogu biti povezani s različitim razinama hidrofobnosti svakog pojedinog spoja budući da istraživanja ukazuju da je hidrofobnost alkilnog lanca derivata galata važna u određivanju protuproliferativne aktivnosti i da alkilni lanac može pridonijeti poboljšanju stanične permeabilnosti ili međureakcije s hidrofobnim džepovima u ciljanoj molekuli (Dodo i sur., 2008; Locatelli i sur., 2008).

Iako aktivacija NF-κB čimbenika može potaknuti transkripciju i protu- i pro-apoptotičkih proteina, pokazalo se je da se njegova aktivacija javlja u prooksidativnim uvjetima (Meyskens i sur., 1999) te je na temelju toga moguće zaključiti da je induciranje NF-κB od strane estera GA izravno povezano s induciranjem proizvodnje ROS-a (de Cordova i sur., 2011). Madlener i sur., (2007) sugeriraju da GA inhibira ribonukleotid reduktazu, što rezultira značajnom promjenom ravnoteže dNTP-a, brzim blokiranjem DNA sinteze što dovodi do poremećaja staničnog ciklusa i induciranja apoptoze. U prilog tome govori i da propil galat u staničnoj liniji THP-1 (leukemija humanih monocita) značajno inducira pojavu apoptotičkih mjehurića i kondenzaciju kromatina, posreduje cijepanju kaspaza 3, 8 i 9 i utječe na razine Bax, Bcl-2 i p53 (Chen i sur., 2011).



Slika 28. Mogući mehanizmi djelovanja galne kiseline (GA) i njezinih derivata estera s obzirom na **broj C-atoma u bočnom lancu (galati G3, G8, G10, G12, G14)**

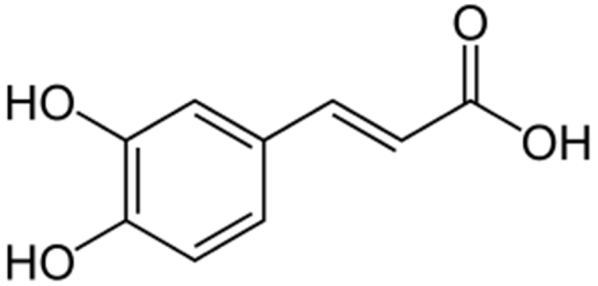
Kratice: PgP, P-glikoprotein (engl. *multidrug resistance protein*); **Fas**, receptor smrti; **FasL**, ligand receptora smrti; **ADAM**, disintegrin i metaloproteinazne domaine; **ErK**, izvanstanična signalom regulirana kinaza; **AkT/PKB**, protein kinaza B; **MMP**, matriks metaloproteinaza; **COX**, ciklooksigenaza; **NF-kB** nuklearni čimbenik kappa B-pojačivač lakog lanca aktiviranih B limfocita; **IkB**, **NF-κB** regulatorni protein; **ICAM**, unutarstanična molekula adhezije; **VCAM**, vaskularna molekula adhezije; **PARP**, poli ADP-ribozna polimeraza; **SOD**, superoksid dismutaza; **CAT,** katalaza; **ROS**, reaktivne vrste kisika; **BCL-2**, antiapoptotički protein; **Bax**, pro-apoptotički član porodice Bcl-2 proteina; **GSH** reducirani glutation; **γ GCS**, γ glutamil sintaza; **p21**, regulatorni protein staničnog ciklusa; **p53**, protein popravka genoma; **G1/S** faza, pos- mitotička faza staničnog ciklusa; **$\Delta\Psi_m$**, mitohondrijski membranski potencijal. (preuzeto i prilagođeno: Locatelli i sur., 2013)

2.5.2. Kafeinska kiselina

Kafeinska kiselina (CA) ($C_9H_8O_4$) poznata i pod nazivom 3,4-dihidroksicimetna kiselina, široko je rasprostranjena fenolna kiselina prisutna u svim biljkama budući da kao glavni intermedijer sudjeluje u biosintezi lignina (Slika 29). Zastupljena je u mnogim prehrambenim proizvodima kao što su voće (jabuke, kruške, bobičasto voće), povrće (artičoke, patlidžan), vino, maslinovo ulje, kava i pčelinji propolis (Genaro-Mattos i sur., 2015; Oršolić i Bašić, 2007; Oršolić, 2010). Nedavna istraživanja upućuju na to da je kafeinska kiselina snažan antioksidant (Benkovic i sur., 2008, Genaro-Mattos i sur., 2015; Oršolić i sur., 2007) i da ima blagotvorni učinak na zdravlje u *in vivo* (Benkovic i sur., 2008; Oršolić i sur., 2007). Kafeinska kiselina ističe se brojnim farmakološkim i biološkim svojstvima kao što su protuvirusno (inhibicija replikacije HIV-a) (Kashiwada i sur., 1995; Utsunomiya i sur., 2014), antioksidativno (Benkovic i sur., 2008; Genaro-Mattos i sur., 2015, Oršolić i sur., 2007), protutrombotsko (Johnson i sur., 2010), antihipertenzivno (Hudson i sur., 2000), protufibrozno (Park i Kahng 1995), protuupalno (Oršolić, 2010; Oršolić i Bašić, 2007), protukancerogeno (Oršolić, 2010; Oršolić i Bašić, 2005; 2007; Oršolić i sur., 2003; 2004) i imunomodulatorsko djelovanje (Oršolić i Bašić, 2005). Pokazalo se je da CA inhibira aktivnost lipooksigenaze i time suprimira lipidnu peroksidaciju (Jayanthi i Subash, 2010), te u potpunosti sprječava proizvodnju reaktivnih vrsta kisika i sustava ksantin/ksantin oksidaza (Jayanthi i Subash 2010). Nadalje, učinkovito inhibira ceramidom induciranu aktivnost NF-κB (Nardini i sur., 2001) i UVB induciranu ekspresiju COX-2 (Kang i sur., 2009; Oršolić, 2010). Nekoliko istraživanja upućuje na to da CA pokreće apoptozu u staničnim linijama raka, te da inhibira rast tumora i regresiju kod životinja (Guo i sur., 2015; Oršolić i sur., 2003; Papademetrio i sur., 2016). Poznato je također da CA inhibira replikaciju HIV-a (Kashiwada i sur., 1995). Njezin derivat fenetil ester kafeinske kiseline, CAPE (engl. *caffeic acid phenethyl ester*) koji predstavlja aktivni sastojak propolisa odlikuje se također protutumorskim, protuvirusnim, protubakterijskim, protuupalnim svojstvima te inhibira aktivnost NF-κB (Michaluart i sur., 1999; Watabe i sur., 2004). Istraživanja su pokazala da CA inhibira aktivnost MMP-9, dok njen derivat CAPE inhibira i MMP-2 i MMP-9 (Chung i sur., 2004). CA može djelovati i kao prooksidant katalizirajući DNA staničnu razgradnju u perifernim limfocitima čovjeka uz prisutnost prijelaznih metala poput bakra (Bhat i sur., 2007). Nadalje, CA ima i prooksidativno djelovanje i u pojedinim humanim staničnim linijama raka vrata

maternice (HeLA i ME-180) u visokim dozama pri čemu dolazi do povećanja razine ROS-a unutar stanice i promjene potencijala na membrani mitohondrija što dovodi do smrti stanica zbog povećanja apoptotičkih morfoloških promjena u CA obrađenim stanicama (Kanimozhi i Prasad 2015). Razlog tomu su proteini iz obitelji Bcl-2 koji dominiraju intrinzičnim (unutarnjim) apoptotičkim putem što dovodi do oslobađanje citokroma c s mitohondrija. U vezi s time, važno je napomenuti da je konzumacija kave povezana sa smanjenim rizikom pojave različitih vrsta raka kao što je rak debelog crijeva (Nehlig i Debry, 1994; Porta i sur., 2003), dijabetesom tipa 2, Parkinsonovom bolesti te bolesti jetre (Bhatti i sur., 2013; Lang i sur., 2013; Trandafir i sur., 2013). Međutim, pokazalo se da oralna primjena visokih koncentracija CA u štakora uzrokuje papilome u želudcu, što upućuje na kancerogena svojstva kafeinske kiseline (Hirose i sur., 1997).

Iako su poznata antioksidativna svojstva CA, njen učinak na tumorsku angiogenezu, polarizaciju makrofaga, razinu iNOS i Arg-1, te proupalne citokine još uvijek nije istražen.



Slika 29. Struktura kafeinske kiseline

(preuzeto od: https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid)

2.5.3. Taninska kiselina

Taninska kiselina (TA) ($C_{76}H_{52}O_{46}$) poznata još pod nazivom dekagaloil glukoza poseban je oblik tanina kojeg ubrajamo u biljne polifenole (Slika 30). Naime, sastoji se od središnje molekule glukoze koja je na svim 5 hidroksilnim skupinama esterificirana s dvije molekule galne kiselina. TA često je pogrešno smatrana "taninom", a zapravo je relativno uobičajeni galotanin koja se zajedno s drugim kondenziranim taninima nalazi u crvenom vinu, pivi, kavi, crnom i zelenom čaju, voću (kruška, banana, grejp), zatim u mahunarkama (crni grah), sirku, žitaricama (leća) i čokoladi (Chung i sur., 1998a; King i Young, 1999).

Zbog brojnih fenolnih skupina prisutnih u strukturi, TA je slabo kisela (pKa oko 10). Krajem 19. stoljeća i početkom 20. stoljeća TA koristila se je zajedno sa magnezijem ili aktivnim ugljenom u obradi čišćenja od toksičnih tvari poput trovanjem strininom. Slično kao i mnogi polifenoli, pokazalo se je da TA posjeduje snažna antioksidativna (Andrade i sur., 2005; Ferguson, 2001; Lopes i sur., 1999; Wu i sur., 2004;), protuvirusna, protubakterijska (Akiyama i sur., 2001), kontraktivna, protuupalna, protutrombotska (Freedman i sur., 2001), antimutagena (Chen i Chung, 2000; Ferguson 2001; Horikawa i sur., 1994), protukancerogena svojstva (Athar i sur., 1989; Gali i sur., 1992; Horikawa i sur., 1994; Nepka i sur., 1999), a ujedno smanjuje razinu kolesterola i triglicerida u serumu te suprimira lipogenezu (Elli i sur., 2009).

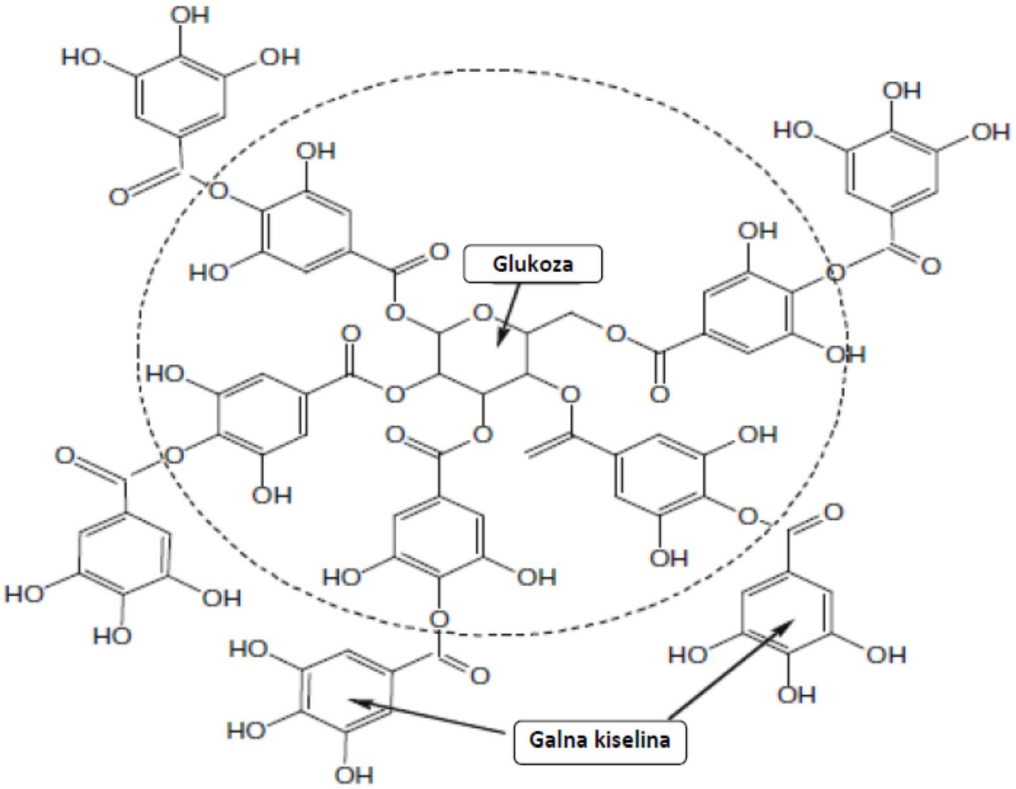
Smatra se da su upravo njezina relativno hidrofobna "jezgra" i hidrofilna "ljuska" značajke koje su odgovorne za njeno antioksidativno djelovanje (Isenburg i sur., 2006). Antioksidativni mehanizam djelovanja TA još uvijek nije u potpunosti razumljiv te su potrebna daljnja istraživanja. Naime, u prisutnosti iona bakra, TA ponaša se ili kao prooksidans, potičući oštećenje DNA molekule (Ferguson, 2001; Khan i Hadi 1998; Khan i sur., 2000) ili kao antioksidans pri čemu suprimira stvaranje hidroksil radikala (Andrade i sur., 2005). Utvrđeno je da TA inhibira rast tumora kože, pluća, želudca koji su inducirani kancerogenim policikličkim aromatskim ugljikovodicima i N-metil-N-nitrozourejom u miša (Khan i sur., 1988; Vance i Teel, 1989).

Taninska kiselina koristi se u proizvodnji albumin tanata za liječenje dijareje i kao prehrambeni aditiv čije je sigurno doziranje u rasponu od 40-100 μg ovisno o vrsti hrane u koju se dodaje (Chen i Chung, 2000). Nedavno istraživanje pokazalo je da TA štiti od štetnih promjena crijevne permeabilnosti tijekom infekcije poboljšanjem otpornosti sluznice (van

Ampting i sur., 2010). Također, čini se da TA ima zaštitni učinak na oksidacijskim stresom induciranu staničnu smrt (Chen i sur., 2007; Tikoo i su. 2008) te da je učinkovita u sprječavanju i liječenju upala i ozljeda crijeva (Martin i sur., 2006; Souza i sur., 2007). TA koristila se je kao kemopreventivno sredstvo kod alkilacijom induciranog karcinoma jetre i debelog crijeva na modelu štakora gdje je pokazala značajan učinak na inhibiciju karcinogeneze (Hirose i sur., 1991). Nadalje, prema jednom istraživanju pokazalo se je da TA ne utječe na spontani razvoj tumora u štakora (Onodera i sur., 1994), dok je prema drugima TA bila učinkovita u inhibiciji promocije epidermalnog tumora miša (Chen i sur.,1995). U *in vitro* uvjetima, pokazalo se je da TA ima citotoksični učinak na maligne humane stanične linije (Ramanathan i sur., 1992). Uočeno je da TA poveća razgradnju masti u stanicama jetre. Nepka i sur., (1999) pokazali su da unos TA u niskim dozama može kemoprotektivno utjecati na razvoj spontane neoplazme jetre u miša. Naknadna obrada štakora s TA sprječava induciranu nefrotoksičnost s cisplatinom (5 mg/kg) te ujedno smanjuje cijepanje poli-(ADP-riboza) polimeraze, fosforilaciju p38 i hipoacetilaciju histona H4, dok s druge strane zajednička primjena TA i cisplatine potencira nefrotoksičnost (Tikoo i sur., 2007). Lokalna primjena TA na doza ovisan način značajno inhibira aktivnost ornitin dekarboksilaze (ODC) inducirane s TPA (12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat) u epidermi miševa u *in vivo* uvjetima (Gali i sur., 1991). Prilikom istraživanja učinaka TA na kožne upale, došlo se je do saznanja da predobrada s TA smanjuje razine IL-18 mRNA ekspresije i proteina u staničnoj liniji humanih keratinocita (HaCaT) budući da IL-18 ima višestruke učinke na različite stanice u stvaranju upalnog odgovora. Osim toga, TA značajno inhibira aktivaciju p38 mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK) i izvanstanične signalom regulirane protein kinaze kao i pojačanu ekspresiju proupalnih medijatora poput IL-1, IL-6, TNF-α, COX-2 i prostaglandina E_2 kod UVB-om ozračenih HaCaT stanica. Lokalna primjera TA na koži miša koja je izložena djelovanju UVB zračenja pokazala je da TA inhibira stvaranje eritema. Na temelju ovih dobivenih rezultata, može se zaključiti da TA ima značajni protuupalni učinak na kožne upale inducirane s UVB zračenjem (Park i sur., 2006). Pokazalo se je da TA fizički umrežava kolagen i elastin i time poboljšava njihovu otpornost na razgradnju enzimima (Isenburg i sur., 2005; 2007). Demeule i sur., (2000) sugeriraju da TA može inhibirati aktivnost matriks metaloproteinaza i time suzbiti invazivnost i metastaziranje tumorskih stanica. Slično su utvrdili i Zhang i sur., (2009) kada je uočeno da intramiokardijalna obrada štakora s TA nakon induciranog infarkta miokarda sprječava razgradnju kolagenskog matriksa kroz umrežavanje

fibroznog kolagena i inhibicijom aktivnosti MMP-2 i MMP-9 pri čemu ne dolazi do poboljšanja unutrašnje kontrakcijske funkcije miokarda. Istraživanje koje je napravljeno na kulturi humanih dermalnih fibroblasta u *in vitro* uvjetima pokazuje da TA značajno povećava odlaganje elastina u odnosu na kontrolu, uzrokuje vezanje za elastin i tropoelastin, smanjuje proteolitičku razgradnju elastina uzrokovanu elastolitičkim enzimima poput serin proteinaze, cistein proteinaze i metaloproteinazama te povećava elastogeni učinak odabranih stimulansa elastogeneze (Jimenez i sur., 2006).

Iako je dokazano da mnogi prirodni polifenolni spojevi inhibiraju tumorigenezu u animalnim modelima, jako je malo istraživanja koja su proučavale kemoprotektivni učinak taninske kiseline u *in vivo* uvjetima.



Slika 30. Struktura taninske kiseline (preuzeto i prilagođeno: Gülçin i sur., 2010)

Predobrada miševa s TA (u dozama 25 ili 50 g/kg dnevno) koji su naknadno obrađeni s tetrakloruglјikom (CCl_4) radi induciranja jetrene fibroze značajno poboljšava morfologiju jetre, smanjuje aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), koncentraciju malondialdehida (MDA) i razinu endotelina-1 (ET-1) u serumu. Osim toga, uočeno je da TA povećava aktivnost SOD, CAT, glutation peroksidaze

(GSH-Px), endotelne dušik oksid sintaze (eNOS) i razinu NO u serumu. Nadalje, TA smanjuje ekspresiju angiotenzin II receptora-1 (ATR-1), IL-1β, TNF-α, TGF- β, kaspaze-3, c-fos, c-jun, odnos Bax/bcl-2, tkivnog inhibitora metaloproteinaze 1 (TIMP-1), a povećava MMP-9 i MMP-1 (Chu i sur., 2016).

U *in vitro* uvjetima, pokazalo se je da TA (u dozama 0,01 mM; 0,1 mM ili 1 mM) smanjuje omjer TIMP-1/MMP-1 te vijabilnost HSC (engl. *hepatic stellate cells*) stanica u kulturi što govori da TA ima zaštitno djelovanje na CCl_4-induciranu jetrenu fibrozu u miševa pri čemu se mogući mehanizmi djelovanja TA mogu povezati s inhibicijom nakupljanja kolagena, oksidacijskog stresa i upale, induciranjem apoptoze u hepatocitima, a inhibicijom aktivacije HSC stanica (Chu i sur., 2016). Van Molle i sur., (2000) ustvrdili su da TA značajno smanjuje razinu jetrenog ALT enzima u serumu, apoptozu jetre i smrtnost miševa kod kojih je induciran letalni hepatitis pomoću čimbenika TNF u kombinaciji s D-(+)-galaktozaminom (GalN).

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Tumorske stanice

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) je heterogeni, slabo diferencirani, brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti, a izvorno se javlja kao spontani karcinom mliječne žlijezde u miša. U jetri miševa, nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora, dolazi do znatnog povećanja lipidne peroksidacije te do smanjenja količine antioksidativnih enzima. Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) održavali smo intraperitonealno (*ip*) u Swiss albino miševima, serijskim presađivanjem stanica svakih 7 ili 9 dana u obliku ascitesa. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 3 mL fiziološke otopine i lagane masaže trbušne stijenke, napravili smo rez i otvorili peritonealnu šupljina miša. Pasteurovom pipetom uzeli smo peritonealnu tekućina s tumorskim stanicama i razrijediti s fiziološkom otopinom (0,9 % otopina natrijeva klorida, Pliva) do ciljane koncentracije 2,5 x 10^6 EAT stanica/0,5 mL. Broj živih stanica odredili smo brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker-Türkovoj komorici. Unos EAT stanica u peritonealnu šupljinu miša predstavlja 0. dan pokusa.

3.1.2. Pokusne životinje

U istraživanju smo koristiti visokosrodne miševe istog spola, soja Swiss albino, u dobi oko 2-5 mjeseci, mase 25–35 g, iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Miševe smo držati u kavezima s najviše 5 životinja pod standardnim uvjetima (24 °C, ciklus 12 sati svjetla i 12 sati mraka) uz stalnu dostupnost standardne hrane za glodavce (Standard Diet 4RF 21 GLP certificate, Mucedola, Italija) i vode.

Istraživanje smo proveli u skladu s važećim etičkim principima u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine broj 135/06, Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih

životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne novine broj 176/04) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) 86-23, 1985).

Prije početka pokusa, sve životinje smo podijelili u **13 skupina** (n=15 životinja u svakoj skupini, **skupina 1** – kontrola; **skupine 2-13** – pokusne skupine). Prije početka i tijekom izvođenja pokusa životinje su pojedinačno izvagane i svrstane u skupine sa sličnom tjelesnom težinom (± 2 g) na temelju čega se je odredila količina pojedinačnih pripravaka koja se je davala tijekom pokusa.

3.1.3. Priprema galne kiseline (GA)

Galnu kiselinu (engl. *gallic acid*, $C_7H_6O_5$, Mr = 170,12; t_v = 260 °C) proizvođača Sigma, St. Louis, MO, SAD, pripremili smo otapanjem u fiziološkoj otopini 0,9 % NaCl (aq) u dozi od 40 mg/kg i 80 mg/kg neposredno prije uporabe.

3.1.4. Priprema kafeinske kiseline (CA)

Kafeinsku kiselinu (engl. *caffeic acid*, $C_9H_8O_4$, Mr = 180,16; t_v = 223 – 225 °C) proizvođača Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka pripremili smo otapanjem u fiziološkoj otopini 0,9 % NaCl (aq) u dozi od 40 mg/kg i 80 mg/kg neposredno prije uporabe.

3.1.5. Priprema taninske kiseline (TA)

Taninsku kiselinu (engl. *tannic acid*, $C_{76}H_{52}O_{46}$, Mr = 1701,19; t_v = 200 °C) proizvođača Merck, Njemačka, pripremili smo otapanjem u fiziološkoj otopini 0,9 % NaCl (aq) u dozi od 5 mg/kg i 10 mg/kg neposredno prije uporabe.

3.1.6. Otapalo

Koristili smo fiziološku otopinu 0,9 % NaCl (aq) kao otapalo (0, 9 % otopina natrijeva klorid za infuziju), proizvođača B. Braun Adria d. o. o., Zagreb, HR.

3.1.7. Kemikalije

Za anesteziranje životinja korištene su sljedeće kemikalije:

- Ksilapan® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska;
- Narketan ® 10, Vétoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska.

Za izradu histoloških preparata parafinskom tehnikom korištene su sljedeće kemikalije:

- eozin, Kemika, Hrvatska;
- etanol, apsolutni (100 %), p.a. Gram-Mol d. o. o.; Hrvatska;
- formaldehid, 36-38 %, Lach-Ner, Češka;
- kloroform, *p.a.*, Kemika, Hrvatska;
- ksilen, Zorka Pharma, Srbija;
- ledena octena kiselina, *p.a.*, Alkaloid, Makedonija;
- Mayerova otopina, Kemika, Hrvatska;
- octena kiselina, min 99,5 %, Kemika, Hrvatska.

Za određivanje aktivnosti enzima oksidacijskog stresa korištene su sljedeće kemikalije:

- natrijev karbonat anhidrid (Na_2CO_3), Mr = 105,99; *p. a.*, Applichem GmbH, Njemačka;
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Na_2HPO_4 x 2 H_2O), Mr = 177,99; *p. a.*, Applichem GmbH, Njemačka;
- natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat (Na_2HPO_4 x 12 H_2O), Mr = 358,14; *p. a.*, Applichem GmbH, Njemačka;
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (NaH_2PO_4 x 2 H_2O), Mr = 156,01; *p. a.*, Kemika, Hrvatska;
- natrijev hidroksid (NaOH), Mr = 40,00; *p. a.*, T. T. T. d. o. o., Hrvatska;
- natrij-kalij tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6$ x 4 H_2O), Mr = 282,23; *p. a.*, T. T. T. d. o. o., Hrvatska;
- bakrov(II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4$ x 5 H_2O), Mr = 249,68; *p. a.*, T. T. T. d. o. o., Hrvatska;

- glutation reduktaza (enzim, iz pekarskog kvasca), 100-300 U/mg proteina, Sigma-Aldrich Corporation, SAD;
- Folin i Ciocalteu's fenol reagens, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka;
- citokrom C iz goveđeg srca, ≥ 95 %, 100 mg, Sigma-Aldrich Corporation, SAD;
- ksantin oksidaza, Buttermilk 50 U, 1,05 U/mg proteina, Calbiochem, SAD;
- ksantin (2,6-dihidroksipurin) ($C_5H_4N_4O_2$), ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Kina;
- EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ X $2H_2O$), Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka;
- NADPH tetranatrijeva sol, Mr = 833,35; Applichem GmbH, Njemačka;
- DTNB (5, 5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina), Mr = 396,36; Fluka, Švicarska;
- albumin iz goveđeg seruma, BSA, Sigma-Aldrich, SAD;
- SDS, natrij dodecil sulfat, Promega Corporation, SAD;
- PBS (fosfatni) pufer, Biowhittaker ®, Lonza, Belgija;
- L-glutation, reducirani, ≥ 98,0 %, Mr = 307,32; Sigma-Aldrich, SAD;
- TBA, tiobarbituratna kiselina, Mr = 144,15; Applichem GmbH, Njemačka;
- octena kiselina, min 99,5 %, Kemika, Hrvatska;
- klorovodična kiselina (HCl), 37 %, *p.a.*, Gram-Mol d. o. o., Hrvatska;
- vodikov peroksid (H_2O_2), 30 %, *p.a.*, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka.

<u>Za uzgoj staničnih kultura korištene su sljedeće kemikalije:</u>

- natrijev klorid, 0,9 %, otopina za infuziju, Braun Adria d. o. o., Hrvatska;
- hranjivi medij DMEM (Dubelcco´s Modified Eagle´s Medium) sa 4,5 g/L glukoze i L-glutaminom, Biowhittaker ®, Lonza, Belgija;
- FBS serum (eng. *Fetal bovine serum*) Gibco, Invitrogen, UK;
- tripsin 2,5 % (10X), Biowhittaker ®, Lonza, Belgija;
- lipopolisaharid (LPS) iz stijenke bakterija *Escherichia coli*, kataloški br. 0111:B4, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka;
- limfoprep ™, Axis-Shield PoC AS, Norveška.

<u>Za određivanje razine dušikova(II) oksida, NO korišten je:</u>

- Griess reagent system, kataloški br. G2930, Promega, SAD.

Za određivanje koncentracije enzima Arg-1 korišene su sljedeće kemikalije:

- ureja, ≥ 99,5 %, Mr = 60,06; Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka;
- triton ® X-100, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka;
- TRIS baza ($C_4H_{11}NO_3$), Mr = 121,14; Applichem GmbH, Njemačka;
- $MnCl_2$ x $4H_2O$ *p.a.*, Mr = 197,91; Kemika, Hrvatska;
- L-arginin, Mr = 174,20; PanReac Applichem ITW Copmanies Gmbh, Njemačka;
- α-ISPF, α- izonitrozopropiofenon, ($C_9H_9NO_2$), Mr =163,17; Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD;
- klorovodična kiselina (HCl), 37 %, *p.a.*, Gram-Mol d. o. o., Hrvatska;
- sumporna kiselina (H_2SO_4), 96 %, *p.a.*, Carlo Erba Reagents Spa, Italija;
- fosforna kiselina (H_3PO_4), 85 %, *p.a.*, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka;
- etanol, apsolutni (100 %), *p.a.* Gram-Mol d. o. o.; Hrvatska.

Za određivanje koncentracije proangiogenih čimbenika: VEGF, MMP-2, MMP-9, COX-2 te Th1/Th2/Th17 citokina korištene su sljedeće kemikalije:

- Human/Mouse Total COX-2, kataloški br. DYC4198-2, R&D Systems Europe, Ltd., UK;
- Mouse MMP-2 ELISA Kit, kataloški br. BEK1157, Chongqing Biospes Co., Ltd, Biospes, Kina;
- Mouse MMP-9 ELISA Kit, kataloški br. BEK1163, Chongqing Biospes Co., Ltd, Biospes, Kina;
- Quantikine® ELISA Mouse VEGF Immunoassay, kataloški br. MMV00, R&D Systems Europe, Ltd., UK;
- Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokines Multi-Analyte ELISArray Kit, kataloški br. MEM-003A , QIAGEN Gmbh, Njemačka;
- natrijev azid (NaN_3), ≥ 99,5 %, Mr = 65,01; Sigma-Aldrich, SAD;
- TMB , 3,3´,5,5´-tetrametilbenzidin ($C_{16}H_{20}N_2$), Mr = 240,35; PanReac Applichem BioChemica, Njemačka;
- natrijev hidrogenfosfat anhidrid *p.a.* (Na_2HPO_4), Mr = 141,96; Kemika, Hrvatska;
- limunska kiselina monohidrat *p.a.* ($C_6H_8O_7$ x H_2O), Mr = 210,14; Gram-Mol, d.o.o. Hrvatska.

Za kvalitativno određivanje enzima Arg-1, iNOS i β-aktina Western blot tehnikom korištene su sljedeće kemikalije:

- standard, Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, kataloški br. 161-0373, Bio-Rad, SAD;
- gelovi, NuPAGE Novex 12 % Bis--Tris Gels, 1,0 mm debljine, 17 jažica, kataloški br. NP0349BOX, Invitrogen™, SAD;
- PAGE pufer za uzorke, Prionics-Check Western Component 6, kataloški br. 12000, Prionics AG, Švicarska;
- antioksidant, NuPAGE Antioxidant, kataloški br. NP005, Invitrogen™, SAD;
- MOPS pufer 20 x, NuPAGE MOPS/SDS Running Buffer, Invitrogen™, kataloški br. NP0001, SAD;
- PVDF membrane, Immobilon-P Transfer membrane, 0,45 µm veličina pora, kataloški br. IPV00010. Millipore Corporation, SAD;
- Tween® 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka;
- glicin ≥ 99 % ($C_2H_5NO_2$), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka;
- glicerol ($C_3H_8O_3$) redestiliran *p. a.*, Mr = 92,10; Gram-Mol d. o. o.; Hrvatska;
- Western Blotting Luminol Reagent, kataloški br. sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD;
- arginase I (H-52), kataloški br. sc-20150, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD;
- NOS2 (M-19), kataloški br. sc-650, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD;
- β -Actin (N-21), kataloški br. sc-130656, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD;
- koza anti-zec IgG-HRP, kataloški br. sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD;
- razvijač RTG filma, Developer G153 A i G 153B, kataloški br. HT536, CURIX 60 AGFA, Belgija;
- fiksir RTG filma, Rapid fixir G354, kataloški br. 2828Q, CURIX 60 AGFA, Belgija;
- filter papir, kromatografski papir, 3 mm, Whatman® International Ltd., Engleska;
- RTG filmovi, Ortho CP-G PLUS, medical x-ray film 100 NIH 18X24, kataloški br. EASUF, AGFA, Belgija.

3.1.8. Instrumenti

Tijekom istraživanja korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga Kern & Sohn GmbH, ABS 220-4, d = 0,01 g : 220 g;
- digitalna vaga Kern KB 2000-2N, d = 0,01 g : 2000 g;
- vodena kupelj GFL 1052 i Memmert WNB14 GmbH + Co. KG;
- ultrazvučni homogenizator Bandelin electronic UW 2070 s uređajem Bandelin Sonoplus HD 2070;
- inkubator (s CO_2 sustavom) NAPCO® Model 5415 IR CO_2 System i JUMO ITRON 08 (bez CO_2 sustava);
- laminar Cleanroom Technology, Klima oprema;
- brojač stanica Differ 100, ER TEFAK;
- tresalica IKA® 130 basic;
- vorteks miješalica VORTEX GENIUS 3, IKA-Werke GmbH & CO. KG;
- magnetska miješalica i grijalica Heidolph MR 2002;
- pH metar Lab 850, Schott instuments;
- mikrotom Thermo Electron Corporation, Shandon Finesse 325;
- termostat Shel Lab SL®;
- centrifuga Centrifuge 5702, Eppendorf i Mikro 200R, Hettich;
- UV-Vis spektrofotometar: UV-160, Shimadzu i Libra S22, Biochrom;
- mikrotitarski čitač Microplate reader Model 550, Bio-Rad i iEMS Reader MF, Labsystems ;
- svjetlosni mikroskop Nikon, Eclipse E600 s kamerom AxioCam ERc5s, Zeiss;
- svjetlosni mikroskop Olympus Cx21;
- invertni svjetlosni mikroskop Wild M40 Heerbrugg;
- epifluorescencijski mikroskop Leitz Wetzlar sa kamerom COHU High Performance CCD Camera, MOD 4912-5000/0000;
- fluorescencijski mikroskop Carl Zeiss;
- elektronski brojač stanica ABBOTT CELL DYN 3700;
- biokemijski analizator Beckman Coulter AU 680;

- platformska njihalica, Incubating Rocking Platform Shaker GFL 3013 i DUOMAX 1030 Heidolph Instuments;
- uređaj za elektroforezu Power pac 300, Bio-Rad s kadicom Sub-Cell® GT Basic, Bio-Rad (za komet testa);
- uređaj za elektroforezu Power pac 200, Bio-Rad s kadicom Novex™ XCell™ *SureLock*™ Mini-Cell, Invitrogen™ (za Western blot tehniku);
- termostat Dri-Block, DB-2D, TECHNE;
- transfer uređaj TRANS_BLOT ™ CELL, Bio-Rad;
- Program za obradu slike: AxioCam ERc5s-ZEN 2 (blue edition).

3.2. METODE

3.2.1. Praćenje promjena tjelesne težine životinja

Procjenu rasta tumora i učinka fenolnih pripravaka na razini cjelokupnog organizma pratili smo vaganjem životinja tijekom pokusa te praćenjem promjene tjelesne težine. Životinje su vagane na digitalnoj vagi (Kern KB 2000-2N P.b.- 0,01 g : 2000 g) tijekom pokusa svakog 5. dana. Pratili smo gubitak ili prirast mase životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. Postotak promjene tjelesne težine životinja izračunat je za svaku pojedinu jedinku prema sljedećoj formuli:

$$\%\, promjene\ tjelesne\ težine = \left(\frac{konačna\ težina - početna\ težina}{konačna\ težina}\right)\ x\ 100\ \%.$$

3.2.2. Plan pokusa i način obrade životinja

Nakon početnog vaganja i podjele životinja po skupinama, u njih je *ip* injicirano 2,5 x 10^6 stanica EAT-a što označava 0. dan pokusa.

Obradu životinja s EAT tumorom po skupinama započeli smo idućeg dana (1. dan pokusa) *ip* injiciranjem odgovarajuće doze fenolne kiseline i/ili od 5. dana kada je vidljiva progresija rasta EAT stanica. Prvi način obrade životinja obuhvaćao je ukupno 6 skupina (skupine od 2–7) koje su nakon injiciranja EAT stanica obrađene *ip* s fenolnim kiselinama u dozi od 40 i

80 mg/kg (galna i kafeinska kieslina) te dozom od 5 i 10 mg/kg za taninsku kiselinu tijekom 10 dana u nizu. Drugi način obrade životinja također je obuhvaćao 6 skupina (skupine od 8–13) koje su nakon injiciranja EAT stanica obrađene *ip* s fenolnim kiselinama u dozi od 40 i 80 mg/kg (galna i kafeinska kiselina) te dozom od 5 i 10 mg/kg za taninsku kiselinu 5., 7., 9. i 11. dana. Kontrolna skupina (skupina 1) obrađena je *ip* s fiziološkom otopinom (Tablica 7).

Životinje iz svih skupina (1–13) žrtvovane su 14. dana od unosa EAT stanica te su prikupljeni uzorci krvi (serum), ascitesa i organi od ciljnog interesa (bubreg, jetra, slezena i peritoneum). Tijekom tog postupka sve životinje su adekvatno anestezirane i analgezirane *ip* primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar ketamin) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar ksilazin) u dozi od 0,1 mL /10 g (10 mg/kg).

Prije žrtvovanja izmjerena je tjelesna težina životinja. Nakon toga prikupljeni su uzorci krvi za određivanje hematoloških i biokemijskih parametara, genotoksičnog učinka te uzorci tkiva jetre, slezene, bubrega kao i ascitesa iz trbušne šupljine za određivanje biljega oksidacijskog stresa (lipidne peroksidacije, glutationa, SOD, katalaza). Kod svake skupine životinja izmjeren je volumen ascitesa dobiven iz trbušne šupljine kao i mase organa (bubreg, jetra, slezena). Naposljetku uzet je dio peritonealne ovojnice za histološku i mikroskopsku analizu krvnih žila.

Tablica 7. Pokusne skupine i način obrade fenolnim kiselinama

Oznaka skupine	Doziranje	Početak obrade	Period obrade (dani)
1. EAT kontrola	0,5 mL 0,9 % NaCl svaki dan	2. dan od EAT unosa	10
2. GA 40 mg/kg	40 mg/kg svaki dan	2. dan od EAT unosa	10
3. GA 80 mg/kg	80 mg/kg svaki dan	2. dan od EAT unosa	10
4. CA 40 mg/kg	40 mg/kg svaki dan	2. dan od EAT unosa	10
5. CA 80 mg/kg	80 mg/kg svaki dan	2. dan od EAT unosa	10
6. TA 5 mg/kg	5 mg/kg svaki dan	2. dan od EAT unosa	10
7. TA 10 mg/kg	10 mg/kg svaki dan	2. dan od EAT unosa	10
8. GA 40 mg/kg	40 mg/kg svaki 2. dan	5. dan od EAT unosa	4
9. GA 80 mg/kg	80 mg/kg svaki 2. dan	5. dan od EAT unosa	4
10. CA 40 mg/kg	40 mg/kg svaki 2. dan	5. dan od EAT unosa	4
11. CA 80 mg/kg	80 mg/kg svaki 2. dan	5. dan od EAT unosa	4
12. TA 5 mg/kg	5 mg/kg svaki 2. dan	5. dan od EAT unosa	4
13. TA 10 mg/kg	10 mg/kg svaki 2. dan	5. dan od EAT unosa	4

3.2.3. Protutumorska učinkovitost fenolnih kiselina

3.2.3.1. Praćenje preživljenja pokusnih životinja

Preživljenje i spontano uginuće pokusnih životinja pratili smo nakon terapijske obrade miševa nositelja EAT tumora unutar pojedinih skupina te izračunali povećanje životnog vijeka (% ILS, engl. *increased life span*) prema sljedećoj formuli:

$$\%\,\boldsymbol{ILS} = \mathbf{100} - \left(\frac{\boldsymbol{T} - \boldsymbol{C}}{\boldsymbol{C}}\right) \boldsymbol{x}\ \mathbf{100}\ \%;$$

T - srednja vrijednost vremena preživljenja obrađene skupine životinja;

C - srednja vrijednost vremena preživljenja kontrolne skupine životinja.

3.2.3.2. Određivanje ukupnog volumena peritonealne tekućine i broja živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini

Nakon ispiranja peritoneuma s 3 mL fiziološke otopine i lagane masaže trbuha, napravili smo rez i otvorili peritonealnu šupljinu miša te Pasteurovom pipetom uzeli peritonealnu tekućinu.

Pomoću graduiranih epruveta izmjerio se je ukupni volumen peritonealne tekućine koja se je dobila od pojedinog miša. Broj živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini odredio se je brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker-Türkovoj komorici. Žive tumorske stanice su neobojene (imaju sposobnost izbacivanja boje), dok mrtve tumorske stanice su plavo obojene. Postotak inhibicije rasta tumora preračunali smo prema sljedećoj formuli:

$$\%\ \boldsymbol{inhibicije\ tumora} = \left(\frac{\boldsymbol{br.stanica\ u\ kontroli - br.stanica\ u\ pokusnoj\ skupini}}{\boldsymbol{br.stanica\ u\ kontroli}}\right) \boldsymbol{x\ 100}\ \%\ .$$

3.2.3.3. Diferencijalna analiza stanica u peritonealnoj tekućini

Za diferencijalno određivanje broja stanica u peritonealnoj tekućini, uzeli smo peritonealnu tekućinu na dan žrtvovanja životinja i na predmetnim stakalcima napravili razmaze peritonealne tekućine. Nakon sušenja preparata na sobnoj temperaturi, razmaze smo prvotno obojali bojom May Grünwaldom tijekom 7 minuta, a zatim i vodenom otopinom Giemse (1 dio Giemse : 2 dijela vode) tijekom 11–15 minuta. Diferencijalnu analizu preparata vršili smo brojenjem limfocita, makrofaga, neutrofila, eozinofila i bazofila na 100 stanica, pod svjetlosnim mikroskopom Olympus Cx21, pri ukupnom povećanju 400X. Za svaku obrađenu skupinu napravili smo po četiri preparata.

3.2.4. Određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga iz peritonealne tekućine

Funkcionalnu aktivnost makrofaga odredili smo nakon završene obrade svih pokusnih životinja i kontrole. Od svih skupina uzeli smo peritonealnu tekućinu za određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga i napravili razmaze na predmetnim stakalcima (po 4 stakalca za svaku skupinu) te fiksirali razmaze sušenjem na sobnoj temperaturi tijekom 15–20 minuta. Preparate smo zatim isprali u fosfatnom puferu (PBS) čime se uklanjaju neadherirane stanice, a adherirane stanice koje su ostale na stakalcima inkubirali smo tijekom 2 sata u hranjivom mediju DMEM koji sadrži 10 nM HEPES pufera pri temperaturi 37 ˚C. Nakon inkubacije, uklonili smo hranjivi medij, a stanice fiksirati s 2,5 %-tnim glutaraldehidom tijekom 5 minuta. Preparate smo zatim obojali s 5 %-tnom otopinom Giemse tijekom 10 minuta, a potom analizirati pod svjetlosnim mikroskopom Olympus Cx21 pri ukupnom povećanju 400X. Pregledom preparata i brojanjem ukupno 200 makrofaga po svakom preparatu utvrđen je udio aktiviranih makrofaga u odnosu na neaktivirane. Aktivirani makrofagi su velike stanice s dugim plazmatskim nastavcima, a neaktivirani makrofagi su tamnije obojeni, okrugli i bez plazmatskih nastavaka.

3.2.5. Analiza hematoloških i biokemijskih parametara

Krv smo uzeli iz pazdušnog spleta krvnih žila te stavili u heparizirane vacuutainere. Krv smo analizirali standardnim laboratorijskim metodama. Od hematoloških parametara odredili smo ukupan broj eritrocita (E), trombocita (Trc) i leukocita (L), udio polimorfonuklearnih (PMN) i mononuklearnih (MN) leukocita u perifernoj krvi, raspodjelu eritrocita po veličini (RDW), prosječan volumen trombocita (MPV), koncentraciju hemoglobina (Hgb), hematokrita (Hct), prosječan volumen eritrocita (MCV), prosječan sadržaj hemoglobina u eritrocitima (MCH) i prosječnu koncentraciju hemoglobina u eritrocitima (MCHC). Od biokemijskih parametara odredili smo koncentraciju glukoze, ureje, ukupnog bilirubina, C-reaktivnog proteina (CRP), te aktivnosti enzima aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT), laktat-dehidrogenaze (LDH) i amilaze (AMS). Hematološki parametri su određeni na elektronskom brojaču ABBOTT CELL DYN 3700. Biokemijski parametri u serumu su određeni na biokemijskom analizatoru Beckman Coulter AU 680.

3.2.6. Komet test

U istraživanju smo koristili standardnu izvedbu komet testa u alkalnim uvjetima na bijelim krvnim stanicama i stanicama EAT (Singh i sur., 1988). Na brušeno predmetno stakalce Pasteurovom pipetom nakapali smo svježe priređenu otopinu 1 % agaroze normalnoga tališta (NMP) i pokrili pokrovnicom. Nakon polimerizacije agaroze na sobnoj temperaturi sa stakla smo uklonili pokrovnicu i taj sloj gela. Na osušeno staklo pomoću mikropipete nakapali smo 300 µL 0,6 % NMP agaroze i pokriveno pokrovnicom stakalce smo držali 10 minuta na ledu. Na stakalca s priređenim slojem NMP agaroze nanosili smo sljedeći sloj koji se sastojao od 100 µL 0,5 % agaroze niskoga tališta (LMP) pomiješane s 5 µL uzorka krvi uzete iz pazdušnog spleta krvnih žila te tumorske stanice iz peritonealne tekućine miša, te ponovo pokrili pokrovnicom. Nakon 10 minuta stajanja na ledu, taj sloj gela prekrili smo sa 100 µL 0,5 % agaroze niskog tališta (LMP) i preparat ponovo držali na ledu 10 minuta. Priređenim preparatima skinuli smo pokrovnice i uronili ih u pufer za lizu (2,5 M NaCl, 1 % Na-laurilsarkozinat, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10 % DMSO, 1 % Triton X-100), pH=10 u kojem su stajali jedan sat na 4 ˚C. Preparate smo iz pufera za lizu prebacili u pufer

za denaturaciju (0,3 M NaOH, 1 mM Na_2EDTA), pH=13. Denaturaciju smo proveli na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Nakon denaturacije, preparate smo premjestili u vodoravnu kadicu za elektroforezu. Elektroforezu smo proveli u istom puferu kao i denaturaciju, pri jakosti struje od 400 mA i naponu od 25 V, tijekom 20 minuta. Nakon elektroforeze, preparate smo ispirali tri puta po 5 minuta u neutralizacijskom 0,4 M Tris-HCl puferu, pH=7,5. Nakon zadnjeg ispiranja, preparate smo fiksirali u 96 %-tnom etanolu tijekom 7 minuta, te posušili predmetna stakalca na zraku. Na dan analize preparata, preparate smo obojali sa 100 µL etidij-bromidom (20 µg/mL) u trajanju od 10-12 minuta bez prisustva svjetlosti. Obojene gelove kratko smo isprali u Tris-HCl puferu, pH=7,5 te pokrili pokrovnicom. Radi stabilizacije boje, preparate smo prije početka analize držali u mraku najmanje 15 minuta. Obojane preparate analizirali smo pomoću epifluorescencijskog mikroskopa Leitz Wetzlar i kamerom COHU High Performance CCD Camera, MOD 4912-5000/0000 s ekscitacijskim filterom od 515–560 nm pri čemu se vide strukture nalik na komete koje potječu od obrisa jezgara stanica u gelu. Mjerenja dužine repa, % DNA u repu i repnog momenta proveli smo pomoću programa za analizu slike *Comet Assay II*, proizvođača *Perceptive Instruments Ltd*. Na svakom preparatu analizirali smo po 100 kometa (n=4), odnosno ukupno 400 stanica iz pojedine pokusne skupine.

3.2.7. Mikronukleus test

Na dan žrtvovanja miševima smo uzeli uzorak krvi iz pazdušnog spleta krvnih žila i prirediti razmaze na predmetnim stakalcima prema Krishna i Hayashi (2000). Mikroskopska analiza osušenih preparata i naknadno obojanih fluorescencijskom bojom akridin oranž izvršena je u tamnoj sobi na fluorescencijskom mikroskopu s ekscitacijskim filterom 502–525 nm. U svakom pojedinačnom uzorku analizirali smo 2 000 retikulocita s crveno obojanom citoplazmom u kojima smo utvrdili ukupni broj i raspodjelu mikronukleusa (MN) koji fluoresciraju žuto pod mikroskopom.

3.2.8. Učinak fenolnih kiselina na angiogenezu

3.2.8.1. Priprema histoloških preparata peritoneuma

Nakon žrtvovanja miševa i izolacije stanica iz peritonealne šupljine, odstranili smo dio peritoneuma, isprali ga u fiziološkoj otopini te fiksirati tijekom 24 sata u Bouinovom fiksativu (75 mL zasićene pikrinske kiseline, 25 mL 40 % formaldehida, 5 mL ledene octene kiseline). Nakon fiksacije, uzorci peritoneuma isprani su temeljito u vodovodnoj vodi te podvrgnuti postupku dehidriranja uranjanjem u rastuće koncentracije etanola (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %) uz dodatak par kapi otopine amonijaka, te postupku prosvjetljivanja gdje se tkivo stavlja u kloroform tijekom 24 sata. Uzorci peritoneuma su zatim uklopljeni u paraplast te rezani pomoću mikrotoma na rezove debljine od 7–8 μm. Nakon peglanja rezova peritoneuma na predmetnim stakalcima u zagrijanoj vodenoj kupeljina na 40 ^{o}C, uzorci su podvrgnuti postupku deparafiniranja uranjanjem u ksilol (2X po 15 minuta), zatim u padajuće koncentracije etanola (100 %, 96 %, 80%, 70 %) u trajanju od 5 minuta, te naposljetku ispiranju s destiliranom vodom 2X po 5 minuta. Preparati su zatim obojani s Mayerovom otopinom hematoksilinom (hemalaunom) tijekom 8 minuta i 0,5 % eozinom (H&E) tijekom 3–4 minute upotrebom standardnog protokola. Nakon bojanja, preparati su ponovno podvrgnuti postupku dehidriranja uranjanjem u rastuće koncentracije etanola (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) i ksilol te uklapani u kanada balzam nakon čega su sušeni tijekom 24 sata. Obojeni dijelovi preparata uzeti iz usporedivih područja analizirali smo pod svjetlosnim mikroskopom Nikon Eclipse E600 pri povećanju od 40, 100 i 200X. Fotomikrografije su snimljene uporabom digitalne kamere AxioCam ERc5s, Zeiss i obrađene računalnim programom AxioCam ERc5s-ZEN2 za morfometrijsku analizu slika.

3.2.8.2. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti

Kvantitativno mjerenje prožiljenosti peritonealne ovojnice proveli smo određivanjem prosječne gustoće prožiljenosti peritonealne ovojnice (MVD) u područjima najintenzivnije prokrvljenosti/vaskularizacije. Mjerenje smo napravili na reprezentativnim uzorcima nakon što smo pregledali sve histološke preparate prema Weidnerovim preporukama o veličini vidnog polja i načinu brojenja:

- mjesta najveće gustoće krvnih žila („hot spots“) tražili smo na najmanjem povećanju 10X;
- brojenje pojedinačnih krvnih žila proveli smo na povećanju 400X uz veličinu vidnog polja od 0,12 –1 mm^2;
- u rezultate smo ubrajali ne samo kompletne krvne žile već i tračke endotelnih stanica i pojedinačne endotelne stanice;
- lumen krvnih žila nije potreban kao ni prisustvo eritrocita;
- brojanje su provela dva ispitivača.

3.2.9. Određivanje koncentracije parametara oksidacijskog stresa i antioksidativne zaštite

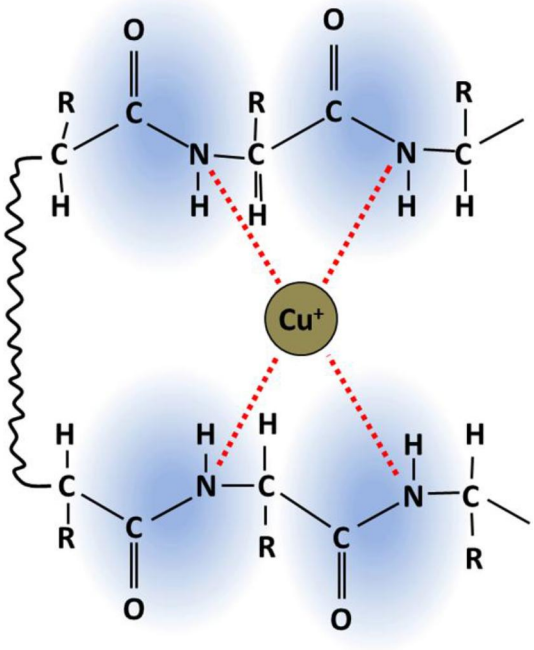
3.2.9.1. Izolacija i priprema tkiva

Na dan žrtvovanja izolirana tkiva (bubrezi, jetra i slezena) smo izvagali i pohranili na -80 °C do pripreme za analizu. Tjedan dana nakon pohrane, odvagali smo 30–45 mg svakog organa u Eppendorf epruvetu, dodali fosfatni pufer (PBS) u omjeru 1:10 i uzorke homogenizirali ultrazvučnim homogenizatorom nekoliko sekundi pazeći pritom da se ne zapjene i ne zagriju. Dobivene homogenate centrifugirali smo na 15000 okretaja kroz 15 minuta na 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojili smo nadtalog, razrijedili ga 10 puta s PBS-om (100 µL nadtaloga i 900 µL fosfatnog pufera) i sve uzorke pohranili na -20 °C do sljedeće analize.

3.2.9.2. Određivanje proteina metodom po Lowry-u

Količinu proteina u tkivima odredili smo metodom po Lowry-u (1951). Metoda se temelji na reakciji dvovalentnih bakrenih iona (Cu^{2+}) s dušikom iz amino skupine peptidnih veza proteina u lužnatoj sredini pri čemu dolazi do redukcije u monovalentni ion bakra (Cu^{+}) što predstavlja tzv. biuret reakciju. Nakon toga u reakcijsku smjesu dodaje se Folin-Ciocalteuov reagens koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline, a koji reagira s Cu^{+}-protein kompleksom (Slika 31) kao i sa fenolnim skupinama bočnih ogranaka tirozina (Tyr), triptofana (Trp) i cisteina (Cys) iz proteina. Pri tome se fenoksidni ion aromatskih aminokiselina oksidira, a Folin-Ciocalteuov reagens u početku stvara nestabilan kompleks koji se polako reducira do plavo obojenih volframova i molibdenovog oksida (λ=600 nm). Intenzitet nastalog plavog obojenja upravo je proporcionalan koncentraciji proteina u otopini.

Prisustvo agenasa koji zakiseljuju otopinu (npr. kiseline, jako kiseli puferi, visoka koncentracija amonijeva sulfata i sl.), kelirajućih agenasa koji vežu Cu^{2+} ione (npr. EDTA) ili reducirajućih agenasa (npr. 2-merkaptoetanol, ditiotreitol i sl.) znatno utječu na rezultate mjerenja. Također na rezultate mjerenja mogu utjecati i razlike u sadržaju Tyr i Trp u proteinima.



Slika 31. Koordinativna veza Cu^{+} iona s 4 dušikova atoma peptidne veze (princip rada Lowry-eve metode)

Metodom po Lowry-u odredili smo proteine u ascitesu te supernatantu homogenata bubrega, jetre i slezene miša. Uzorci su razrijeđeni u PBS-u: ascites, bubreg i slezena 50 X, a jetra 20 X. U epruvete smo dodali po 100 µL razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 8) i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodali smo 200 µL otopine E (Tablica 8) nakon čega smo snažno vorteksirali i inkubirali 30 minuta na sobnoj temperaturi. Količinu proteina odredili smo na UV-Vis spektrofotometru Libra S22, tvrtke Biochrom mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard upotrijebili smo albumin goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine serum albumin*) u koncentracijama od 2 mg/mL prema manjim koncentracijama (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 i 0 mg/mL). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA odredili smo nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunali smo koncentraciju proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli:

$$\boldsymbol{\gamma} = \left(\frac{\boldsymbol{A_{uzorka} - b_{st.\ krivulje}}}{\boldsymbol{a_{st.krivulje}}} \right) \boldsymbol{x\ razrjeđenje.}$$

Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL.

Tablica 8. Priprema otopina za određivanje proteina po Lowry-u

Vrsta otopine	***Priprema otopine***
Otopina D	Pomiješati otopine u omjeru 48:1:1 (A:B:C) **A: 2 % (w/v) Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH** 9,6 g Na_2CO_3 + 480 mL 0,1 M NaOH **B: 1 % (w/v) natrij-kalij tartarat × 4 H_2O u dH_2O** 0,1 g natrij-kalij tartarat × 4 H_2O + 10 mL dH_2O **C: 0,5 % (w/v) $CuSO_4$ × 5H_2O u dH_2O** 0,05 g $CuSO_4$ × 5H_2O + 10 mL dH_2O
Otopina E	Pomiješati Folin i Ciocalteu's fenol reagens i dH_2O u omjeru 2:1

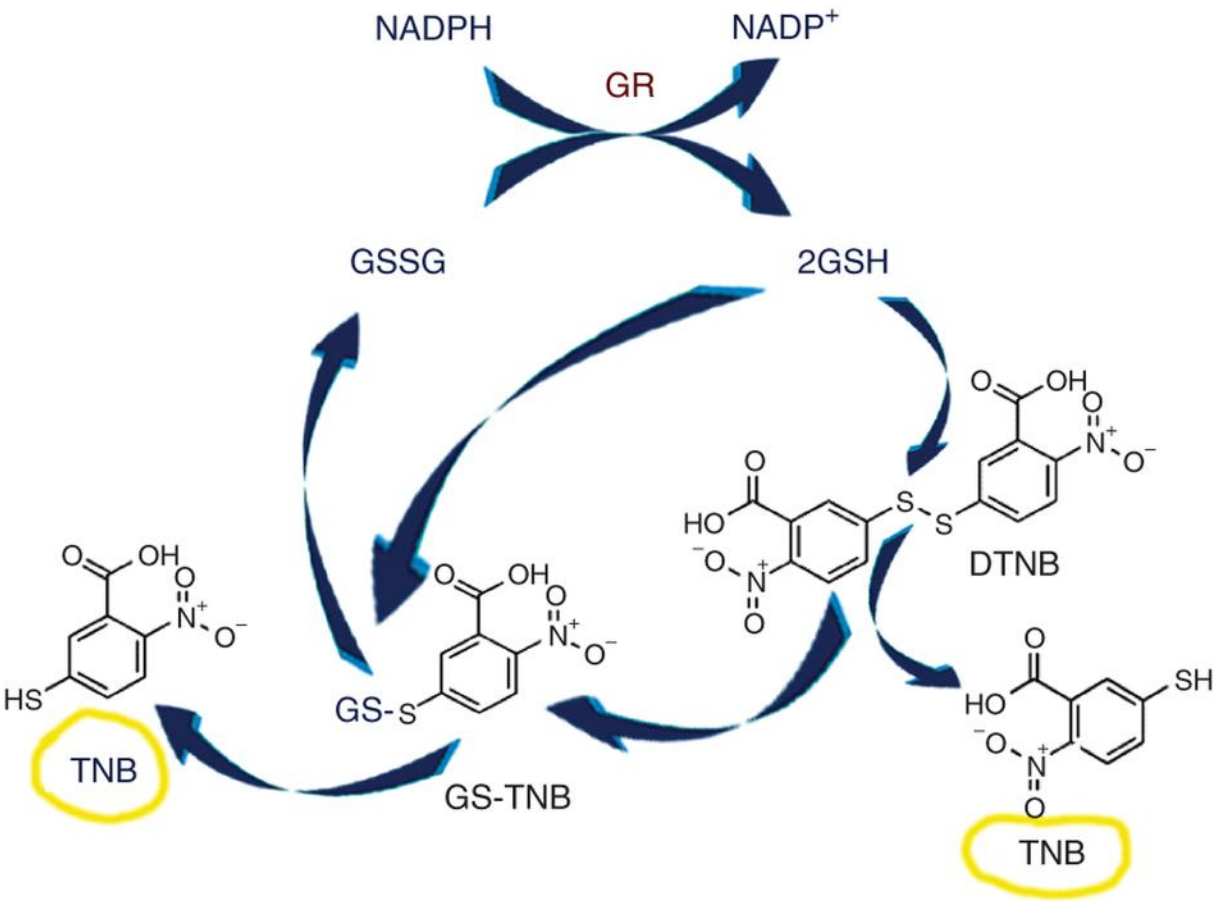
3.2.9.3. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

Reducirani oblik glutationa (GSH) (γ-glutamilcisteinglicin tripeptid) jedan je od najznačajnijih antioksidansa prisutnih u stanicama sisavaca. U kataliziranoj reakciji redukcije vodikovog peroksida i lipidnih hidroperoksida pomoću enzima glutation peroksidaze (GPx) u molekulu vode i odgovarajući alkohol dolazi do oksidacije tiolne skupine cisteina GSH te reducirani glutation (GSH) prelazi u oksidirani oblik (GSSG). GSSG može se vratiti u GSH oblik u prisustvu glutation reduktaze (GR) i nikotin adenin dinukleotid fosfata (NADPH). Kada su stanice izložene povećanom oksidacijskom stresu dolazi do smanjenja omjera GSH/GSSG uslijed nakupljanja GSSG-a. Mjerenje količine GSSG-a ili određivanje omjera GSH/GSSG koristan je pokazatelj oksidacijskog stresa (Ambriović Ristov i sur., 2007).

$$\mathbf{H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O;}$$

$$\mathbf{GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+}$$

Koncentraciju ukupnog glutationa u supernatantu homogenta bubrega, jetre, slezene i ascitesa odredili smo prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969). U postupku koji se koristi za određivanje koncentracije glutationa u uzorku, glutation reduktaza (GR) reducira oksidirani oblik glutationa (GSSG) u reducirani oblik (GSH) (Slika 32). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) sa sulfhidrilnom skupinom glutationa (GSH) pri čemu se stvara kromofor 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) koja apsorbira pri valnoj duljini od 405–414 nm. Osim nastalog žuto obojenog TNB-a, nastaje i miješani disulfid, GS-TNB koji se reducira uz pomoć glutationa reduktaze (GR) i NADPH pri čemu nastaje i druga molekula TNB i reciklirajući GSH. Brzina nastanka TNB-a proporcionalna je recirkulirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani oblik glutationa (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida glutationa (GS–TNB) brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije mjerenjem apsorbancije TNB pri 495–414 nm odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.



Slika 32. GSH recirkulirajući mehanizam (Giustarini i sur., 2013)

Koncentracija ukupnog GSH mjeri se u mikrotitarskoj pločici na mikročitaču Model 550, tvrtke Bio-Rad. U jednu jažicu dodaje se 20 µL razrijeđenog uzorka (40X razrjeđenje za organe i 10X za ascites), 40 µL 0,035 M HCl i 40 µL 10 mM DTNB, te nakon inkubacije od 10 minuta pri sobnoj temperaturi izmjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 415 nm. Zatim se dodaje 100 µL otopine GR i NADPH i mjeri se apsorbancija tijekom 5 minuta. Priprema navedenih otopina prikazana je u Tablici 9. Za standard korištene su koncentracije reduciranog GSH (0–200 µM). Nacrtani su pravci za sve standarde kao promjena apsorbancije u vremenu. Očitani su nagibi pravaca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema sljedećoj formuli:

$$c = \left(\frac{a_{\,uzorka} - \; a_{\,slijepe\,probe}}{a_{\,standarda}} \right) x\, razrjeđenje.$$

Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao µM GSH po mL proteina.

Tablica 9. Priprema otopina za određivanje koncentracije GSH

Vrsta otopine	*Priprema otopine*
0,5 M pufer PBS	**17 mL 1 M $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$** i (3 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ i do 17 mL dH_2O) **183 mL 1 M $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$** (65,5 g $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ i do 183 mL dH_2O)
0,5 M EDTA	37,2 g EDTA u 200 mL dH2O
0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA	200 mL 0,5M PBS + 200 mL 0,5M EDTA
0,035 M HCl	7 mL 0,1 HCl + do 200 mL dH_2O
10 mM DTNB	20 mg DTNB + do 5 mL 0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA
0,8 mM NADPH	6,67 mg NADPH + do 10 mL 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA
otopina GR (glutation reduktaze)	20 µL GR (50 U/mL) u 9980 µL 0,8 mM NADPH

3.2.9.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

Osnovna uloga katalaze (CAT) je razgradnja vodikovog peroksida (H_2O_2). Katalazna aktivnost očituje se tek pri većim koncentracijama H_2O_2, što govori da je katalaza isključivo odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa (Ambriović Ristov i sur., 2007). Aktivnost katalaze (CAT) u supernatantu homogenata bubrega, jetre, slezene i ascitesa odredili smo spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984). U toj metodi aktivnost katalaze određuje se kao količina potrošenog vodikovog peroksida (H_2O_2).
U kivetu ukupnog volumena 1 mL dodali smo 980 µL 10 mM H_2O_2 (Tablica 10), a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je uzorak odgovarajućeg razrjeđenja (ascites 0X, jetra, bubreg i slezena 10X razrjeđenje). Nakon toga na UV-Vis spektrofotometru UV-160, tvrtke Shimadzu mjerili smo smanjenje količine vodikovog peroksida pri 240 nm tijekom jedne minute. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta vodikovog peroksida ($\varepsilon = 39{,}4\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) prema formuli:

$$c = \left(\frac{A_{uzorka}}{\varepsilon\,(\mathrm{H_2O_2})\ \mathrm{x}\ l}\right)\ x\ razrjeđenje,$$

gdje je l jednak duljini puta zrake svjetlosti koja prolazi kroz kivetu i iznosi 1 cm. Rezultat je izražen kao U/mg proteina što odgovara µmol razgrađenog vodikovog peroksida po minuti po miligramu proteina.

Tablica 10. Priprema otopine za određivanje koncentracije CAT

Vrsta otopine	*Priprema otopine*
10 mM H_2O_2	113 µL 30 % H_2O_2 + 99,887 mL PBS

3.2.9.5. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaza (SOD) katalizira dismutaciju superoksidnih radikala (O_2^{-}•) u vodikov peroksid (H_2O_2) pri čemu se jedna molekula superoksidnog radikala oksidira u kisik, a druga reducira u vodikov peroksid. Kod eukariota prisutna su 3 izoenzimska oblika SOD-a: bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD ili SOD1), mangan superoksid dismutaza (MnSOD ili SOD2) i izvanstanična superoksid dismutaza (ECSOD ili SOD3). Sva 3 izoenzima imaju istu funkciju, a to je otklanjanje superoksidnog aniona.

Aktivnost SOD-a određena je prema modificiranoj metodi po Flohé i Ötting (1971) u supernatantima homogenata bubrega, jetre, slezene i ascitesa. Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (XOD).

U ovoj metodi korištene su dvije slijepe probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 11) te je apsorbancija mjerena na UV-Vis spektrofotometru UV-160, tvrtke Shimadzu pri 550 nm tijekom 3 minute. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD). U kivetu je dodano redom: 25 µL destilirane vode, zatim 1,45 mL reakcijske otopine A i 15–30 µL ksantin oksidaze (0,8 U/mL) (Tablica 11). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja kivete izmjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 minuta pri 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti oko 0,025 U/min. U ovom slučaju volumen XOD koji je odgovarao bio je 25 – 30 µL. Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, analizirali smo uzorke. Uzorci su prethodno razrijeđeni u PBS-u: bubreg 0X, a jetra, slezena i ascites 10X. U svaku reakcijsku

smjesu umjesto destilirane vode dodano je 25 µL uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Enzimska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze koja se računa prema sljedećoj formuli:

$$\%\ \boldsymbol{inhibicije} = \mathbf{100}\ - \left(\frac{\Delta \boldsymbol{A}_{\boldsymbol{uzorka}}}{\Delta \boldsymbol{A}_{\boldsymbol{slijepa\ proba}}}\right) \boldsymbol{x}\ \mathbf{100}\ \%\ .$$

Enzimska aktivnost SOD računa se prema sljedećoj formuli:

$$\boldsymbol{Aktivnost\ SOD} = \mathbf{10}\ \boldsymbol{exp}\left(\frac{\%\ \boldsymbol{inhibicije} + \mathbf{12,7\ 5\ 7}}{\mathbf{3\ 09\ 3\ 2}}\right),$$

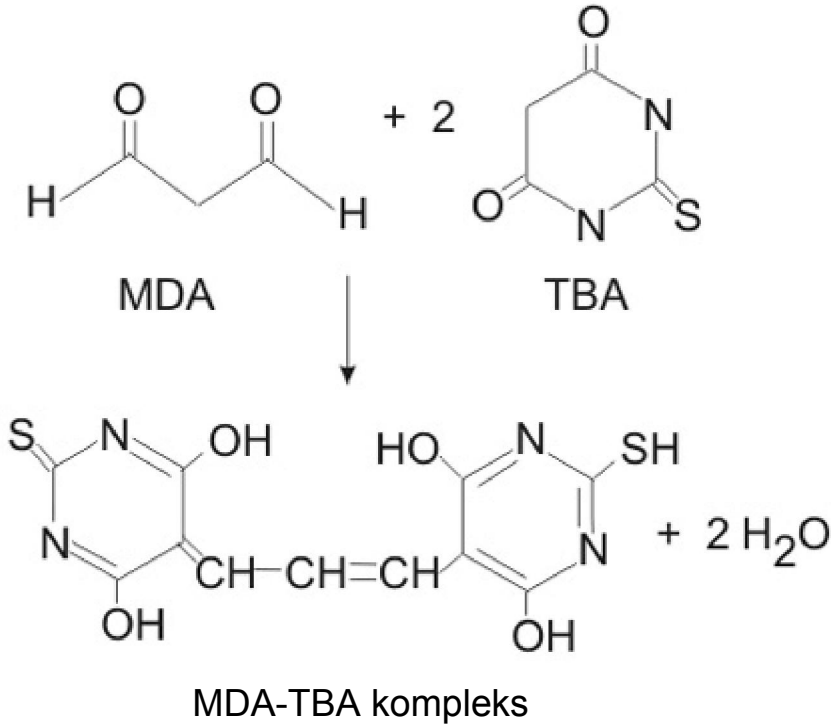
a aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina.

Tablica 11. Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD

Vrsta otopine	*Priprema otopine*
50 mM PBS	17 mL (1,56 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ u 50 mL dH_2O) i 183 mL (5,678 g Na_2HPO_4 u 200 mL dH_2O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL dH_2O
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mM citokroma C (29 mg citokroma C + do 190 mL 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
Reakcijska otopina B XOD (aktivnost 0,8 U/mL)	40 µL ksantin oksidaze i 960 µL dH_2O

3.2.9.6. Mjerenje količine lipidne peroksidacije (MDA)

Količina lipidne peroksidacije određena je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (2007). Metoda se temelji na mjerenju koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije pri čemu MDA u kiselim uvjetima i visokoj temperaturi stupa u reakciju s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje crveni kromogen, kompleks (adukt) MDA–$(TBA)_2$ (Slika 33) čiju je koncentraciju moguće spektrofotometrijski izmjeriti pri valnoj duljini 532 nm.



Slika 33. Mehanizam reakcije MDA s tiobarbiturnom (TBA) kiselinom

U Eppendorf epruvetu dodali smo 100 µL homogenog uzorka određenog razrjeđenja i 1,6 mL reagensa A (Tablica 12). Uzorci su prethodno razrijeđeni u PBS-u: bubreg i slezena 0X, ascites 10X, a jetra 20X. Otopinu smo zatim stavili u vodenu kupelj na temperaturu od 95 °C tijekom 60 minuta. Nakon toga, otopinu smo naglo ohladili na ledu tijekom 10 minuta prilikom čega su se nastale folikule slegnule na dno. Nadtalog smo odvojili centrifugiranjem na 5 000 rpm tijekom 15 minuta pri 4 °C i izmjerili apsorbanciju pri 532 nm na UV-Vis spektrofotometru Libra S22, tvrtke Biochrom. Ukupnu koncentraciju MDA izračunali smo prema sljedećoj formuli:

$$c = \left(\frac{A_{uzorka} - V_{reakcijske\ smjese}}{\varepsilon\ x\ V_{uzorka}\ x\ \gamma_{proteina\ uzorka}} \right),$$

te je izražena kao nmol MDA po mg proteina.

Tablica 12. Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

Vrsta otopine	*Priprema otopine*
8,1 % SDS	0,81 g SDS-a u 10 mL dH_2O
20 % octena kiselina	20 mL 99,5 % octene kiseline i 2,31 mL HCl (37 %), nadopuni se do 50 mL dH_2O i podesi pH=3,5 te nadopuni do 100 mL dH_2O
0,8 % TBA	0,8 g TBA u 40 mL dH_2O uz lagano zagrijavanje. Nakon što se otopi dodaje se 500 µL 5M NaOH te se nadopuni do 100 mL dH_2O
Otopina A	100 µL 8,1 % SDS + 750 µL 20 % octene kiseline (pH = 3,5) + 750 µL 0,81 % TBA

3.2.10. Polarizacija makrofaga slezene i ascitesa

3.2.10.1. Izolacija i stimulacija makrofaga slezene s LPS-om

Slezenu smo izvagali i homogenizirali protiskivanjem kroz Miracloth mrežicu (Falcon) sa špatulom, te zaostale stanice slezene s mrežice isprali s fiziološkom otopinom do 5 mL. Nakon toga, cijelu staničnu suspenziju provukli smo nekoliko puta kroz iglu i špricu kako bismo što bolje razdvojili stanice, a nakon toga smo propasirane stanice prebacili u epruvete i sve ih izjednačili do 6 mL s fiziološkom otopinom. Radeći sterilno u laminaru Cleanroom Technology, tvrtke Klima oprema, napunili smo sterilne epruvete s 3 mL limfoprepa na koje smo zatim pod kutem od 180° nadslojili navedenih 6 mL stanične suspenzije i centrifugirali na 2200 rpm, 20 minuta i pri temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja, nastao je vidljivi bijeli prsten stanica leukocita kojeg smo pipetom pokupili i prebacili u novu epruvetu, pazeći pritom da se ne dira i razbija talog eritrocita na dnu epruvete, te izjednačili volumen izoliranih stanica leukocita s fiziološkom otopinom u svim

epruvetama kako bismo ih isprali ponovnim centrifugiranjem na 2200 rpm, 10 minuta i pri temperaturi od 4 °C. Nastali talog stanica resuspendirali smo u 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a i prebacili u jažicu pločice s 24 polja. Nakon inkubacije stanica u inkubatoru NAPCO® Model 5415 IR na 37 °C i pri 5 % protoku CO_2 tijekom 3 sata, pažljivo samo uklonili hranjivi medij iz svake jažice, te ih lagano isprali s fiziološkom otopinom kako bismo odvojili neadherirane stanice i ponovno dodali 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a i 0,1 µg/mL LPS-a po jažici. Zatim smo inkubirali adherirane stanice makrofaga sljedećih 24 sata pri 37 °C i pri 5 % protoku CO_2. Nakon inkubacije, prebacili smo cijeli nadtalog iz svake pojedine jažice u Eppendorf epruvetu i pohranili na -20 °C, za daljnju analizu NO i Arg-1. Adherirane makrofage vezane na podlogu jažice pažljivo smo ispali s fiziološkom otopinom, a zatim smo ih nakon upotrebe 200 µL 0,25 % tripsina i kratke inkubacije od 3-5 minuta odvojili od podloge. Dodatkom 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a neutralizirali smo djelovanje tripsina, sastrugali stanice sa strugačem stanica, resuspendirali i pohranili ih na -20 °C, za daljnju analizu Arg-1.

3.2.10.2. Izolacija i stimulacija makrofaga ascitesa s LPS-om

Od obrađenih životinja i kontrolne skupine uzeli smo 1 mL ascitesa i inkubirali tijekom 3 sata na 37 °C, pri 5 % CO_2 , u pločicama s 24 jažice. Nakon toga uklonili smo nadtalog tumorskih stanica, dok su na dno jažica ostali adherirani makrofagi koje smo 2X pažljivo isprali s fiziološkom otopinom. Zatim smo u svaku jažicu dodali 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a i 0,1 µg/mL LPS-a te sve skupa inkubirali sljedećih 24 sata na 37 °C, pri 5 % CO_2. Nakon isteka inkubacije, pokupili smo nadtalog i pohranili ga za analizu NO. Adherirane makrofage pažljivo smo isprali s fiziološkom otopinom, te dodali 200 µL 0,25 % tripsina kako bismo ih odvojili od podloge. Nakon 3-5 minuta inkubacije provjerili smo jesu li se stanice odvojile od podloge koristeći inverzni svjetlosni mikroskop Wild M40 Heerbrugg, te neutralizirali djelovanje tripsina dodavanjem 1 mL DMED medija s 10 % FBS-a. Stanice makrofaga sastrugali smo sa strugačem stanica, resuspendirali i pohranili ih na -20 °C, za daljnju analizu Arg-1 i COX-2.

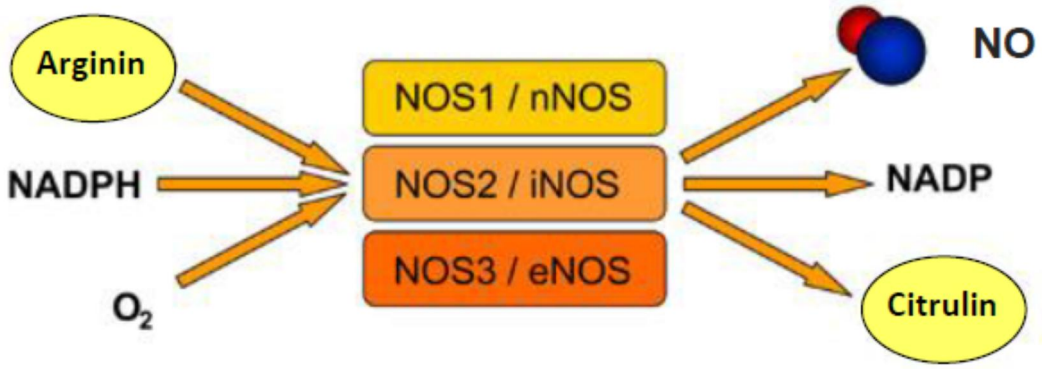
3.2.10.3. Izolacija makrofaga ascitesa bez stimulacije s LPS-om

Preostali ascites obrađenih životinja i kontrolne skupine izjednačili smo s fiziološkom otopinom po volumenu (do 10 mL) i inkubirali tijekom 3 sata na 37 °C pri protoku od 5 % CO_2 u pločicama sa 6 jažica. Nakon inkubacije, tumorske stanice iz nadtaloga prebacili smo u epruvete i centrifugirali ih na 2200 rpm, 10 minuta pri 4 °C. Dobiveni nadtalog tumorskih stanica pohranjen je na -20 °C za analizu NO, Arg-1, VEGF-a, MMP-2, MMP-9 i citokina, a sam talog tumorskih stanica resuspendiran je s 3 mL fiziološke otopine i pohranjen na -20 °C za analizu VEGF-a, MMP-2, MMP-9 i COX-2.
Na adherirane makrofage koji su preostali na dnu pločice, dodali smo 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a i inkubirali preko noći. Sutradan pohranili smo nadtalog adheriranih makrofaga na -20 °C za analizu NO i Arg-1, a same makrofage nakon toga pažljivo isprali 2X s fiziološkom otopinom. Zatim smo u svaku jažicu dodali 200 µL 0,25 % tripsina kako bismo ih odvojili od podloge. Nakon 3–5 minuta inkubacije provjerili smo jesu li se stanice odvojile od podloge koristeći inverzni svjetlosni mikroskop Wild M40 Heerbrugg, te neutralizirali djelovanje tripsina dodavanjem 2,5 mL DMED medija s 10 % FBS-a. Stanice makrofaga sastrugali smo sa strugačem stanica, resuspendirali i pohranili ih na -20 °C, za daljnju analizu NO, Arg-1, VEGF, MMP-2 i MMP-9.

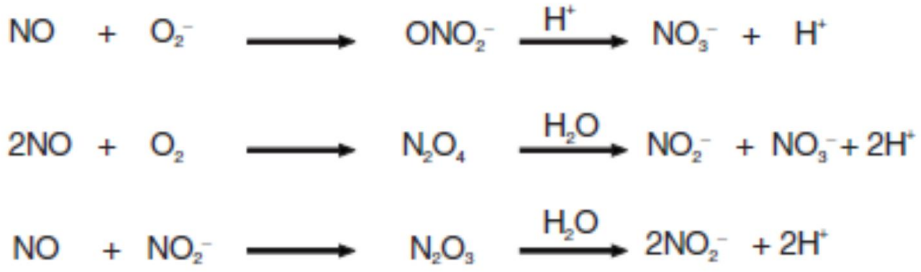
3.2.10.4. Mjerenje dušikova(II) oksida (NO) indirektnom metodom prema Griessu

Dušikov(II) oksid (NO) fiziološki je važna unutarstanična i izvanstanična glasnička molekula u mnogim biološkim sustavima sisavaca, poput imunološkog, živčanog i kardiovaskularnog sustava (Bredt i Snyder, 1995; Dawson i Dawson, 1995) gdje svojim izravnim djelovanjem ili međustaničnom signalizacijom inicira obranu domaćina, homeostatske i razvojne funkcije. U brojnim stanicama sisavaca sinteza dušikova(II) oksida ostvaruje se endogeno 5-elektronskom oksidacijom aminokiseline L-arginina i to pomoću jednog od 3 izoformna oblika enzima dušik oksid sintaze (NOS): inducibilne NOS (iNOS ili NOS2), endotelne (eNOS, cNOS ili NOS3) i neuronske NOS (nNOS ili NOS1) (Slika 34). Kao nusprodukt u toj reakciji nastaje i L-citrulin. Zbog svoje nestabilnosti, dušikov(II) oksid u uvjetima *in vitro* brzo metabolizira u stabilne, nehlapljive produkte, ione nitrita (NO_2^-) ili nitrata (NO_3^-), ovisno oksidira li se molekularnim kisikom ili superoksidnim anionom (Slika

35), i kao takav izlučuje se izvan stanice u hranjivu podlogu (Ambriović Ristov i sur., 2007). Sinteza dušikova(II) oksida može se indirektno odrediti spektrofotometrijski Griessovom metodom, mjereći nitrite i nitrate akumulirane u tekućoj hranjivoj podlozi u kojoj rastu stanice. Relativne razine iona nitrata i nitrita mogu znatno varirati ovisno o uvjetima okoline i redoks stanju ispitivane biološke tekućine.

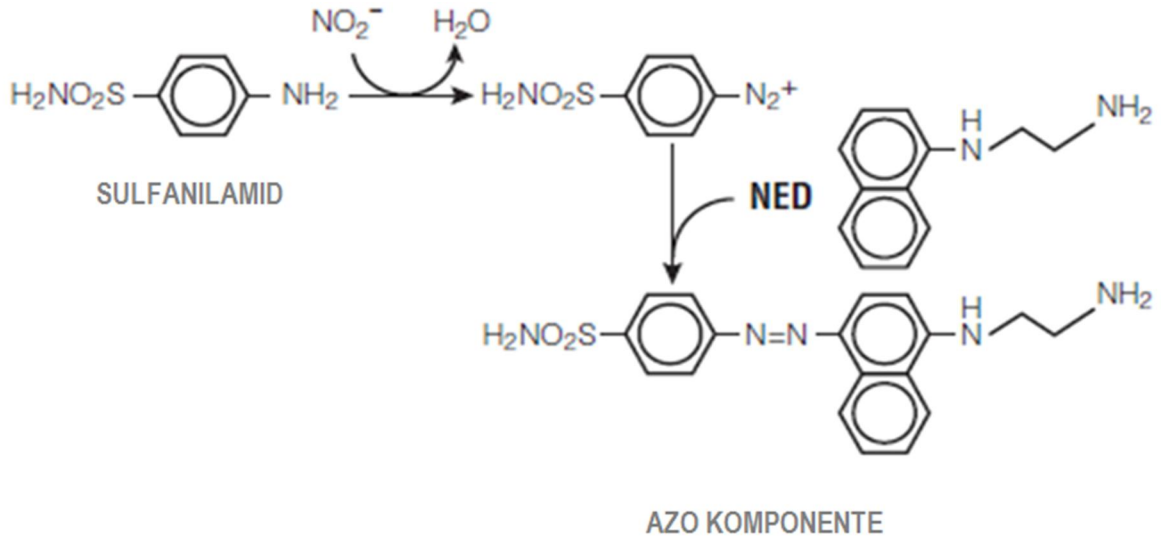


Slika 34. Sinteza dušikov(II) oksida (NO) (preuzeto i prilagođeno: http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/no/synthesis.htm)



Slika 35. Kemijske reakcije prevođenja NO (g) u ione NO_2^- i NO_3^-

Sama metoda temelji se na reakciji diazotizacije koju je prvi opisao Griess 1879. godine (Griess, 1879). Tijekom godina opisane su mnoge modificirane Griessove metode. Ukratko, sustav Griessova reagensa temelji se na kemijskoj reakciji između sulfanilamida i *N*-1-naftiletilendiamin dihidroklorida (NED) u kiseloj sredini fosforne kiseline (H_3PO_4, aq) pri čemu nastaju obojeni azo spojevi koji apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra pri 540 nm (Slika 36).



Slika 36. Kemijske reakcije nastale mjerenjem NO_2^- koristeći sustav Griessovog reagensa (preuzeto od: https://worldwide.promega.com/)

Koristili smo kit *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD), koji za analizu nitrita koristi 1 % otopinu sulfanilamida pripremljenu u 5 % fosfornoj kiselini i 0,1 % otopinu N-1- naftiletilenediamin dihidroklorida (NED) pripremljenu u vodi. Ovaj sustav otkriva ione nitrita u različitim biološkim i eksperimentalnim tekućinama poput plazme, seruma, urina i medija za kulturu tkiva pri čemu osjetljivost nitrita ovisi o vrsti tekućine, a granica detekcije je 2,5 µM (125 pmol) nitrita (u ultračistoj, deioniziranoj, destiliranoj vodi). Također bolja osjetljivost postiže se kada se ta 2 reaktanta dodaju odvojeno, budući da se otopine sulfanilamida i NED-a međusobno natječu za ione nitrita u Griessovoj reakciji (Fiddler, 1977). Radi bolje kvantifikacije iona nitrita potrebno je pripremiti referentne krivulje standardne otopine nitrita, koristeći pri tom isti pufer ili otopinu u kojoj su i ispitivani uzorci.
U mikrotitarsku pločicu sa 96 jažica stavili smo 50 µL svakog uzorka u jažice radeći u triplikatu. Zatim smo dodali 50 µL otopine sulfanilamida i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla. Po isteku inkubacije, dodali smo 50 µL otopine NED i ponovno inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla. Nakon druge inkubacije pojavljuje se ružičasto obojenje uzoraka u jažicama koja potječe od nastalog azo spoja, te smo očitali vrijednost apsorbancije na 540 nm na mikročitaču ploče iEMS Reader MF tvrtke Labsystems. Kao standardnu otopinu koristili smo 0,1 M natrijev nitrit otopljen u vodi u koncentracijama od 0 do 100 µM. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine nitrita određena je jednadžba pravca. Koristeći Lambert-

Beerov zakon ($A = log (P_o/P) = \varepsilon \times b \times c$), iz jednadžbe pravca izračunali smo vrijednosti traženih koncentracija nitrita u ispitivanim uzorcima te smo ih iskazali kao µM.

3.2.10.5. Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti Arg-1

Arginaza je krajnji enzim u ciklusu ureje koji pretvara L-arginin u ureju i L-ornitin te ima važnu ulogu u uklanjanju amonijevih iona iz tijela. Aktivno mjesto arginaze sadrži mangan, te se pojavljuje u dvije izoforme (Arg-1 i Arg-2) kod većine sisavaca koje se razlikuju po zastupljenosti u tkivima i unutarstaničnoj dostupnosti. Arg-1 je citoplazmatski protein uglavnom prisutan u jetri gdje katalizira peti i zadnji korak u ciklusu ureje, dok je Arg-2 mitohondrijski protein prisutan u bubrezima i drugim tkivima koji regulira koncentraciju arginina/ornitina te može biti uključen u metabolizam NO i poliamina. Nedostatak arginaze može dovesti do teških simptoma uključujući neurološka oštećenja, demencija i hiperamonemije. Smanjena aktivnost ili ekspresija Arg-1 dovodi do autosomalnog recesivnog poremećaja hiperargininemije. Povećana aktivnost arginaze u serumu ukazuje na oštećenja jetre i određena patološka stanja kao što je rak. Arginaza također sudjeluje u višestrukim upalnim reakcijama u imunološkom sustavu. Analiza aktivnosti arginaze je bitna za proučavanje metaboličkog puta ureje.
U ovoj metodi, arginaza katalizira pretvorbu L-arginina u ureju i L-ornitin. Nastala ureja specifično reagira sa supstratom kako bi stvorila obojeni produkt koji je proporcionalan trenutnoj aktivnosti arginaze te se mjeri pri valnoj duljini od 540–570 nm.

Aktivnost Arg-1 određena je prema već ranije opisanoj metodi s manjim izmjenama (Corraliza i sur., 1994). Aktivnost arginaze određena je u kulturi makrofaga izoliranih iz peritonealne šupljine (ascitesa) sa i bez stimulacije s LPS-om i LPS-om stimuliranih makrofaga slezene, zatim u nadtalogu makrofaga ascitesa i nadtalogu tumorskih stanica.

Ukratko, u Eppendorf epruvete stavili smo 25 µL određenog uzorka te smo dodali 100 µL 0,1 % Triton-X 100 radi lize stanica i kratko vorteksirali. Tako izmiješane uzorke inkubirali smo 20 minuta na sobnoj temperaturi, uz lagano miješanje na tresalici IKA® KS 130 basic. Zatim smo dodali 100 µL 10 mM $MnCl_2$, 50 mM Tris-HCl, (pH 7,5), sve skupa kratko vorteksirali i inkubirali 10 minuta u vodenoj kupelji Memmert WNB7 GmbH na temperaturi od 55 ^oC radi aktivacije enzima. Hidrolizu arginina potaknuli smo dodatkom 100

μL 0,5 M L-arginina (pH 9,7), kratko vorteksirali i ponovno inkubirali 60 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 ^{o}C. Reakcija je zaustavljena dodatkom 800 μL kisele otopine koja sadrži H_2SO_4 (96 %), H_3PO_4 (85 %) i destilirane vode u omjeru 1:3:7 te 50 μL α-ISPF otopljenog u apsolutnom etanolu (Tablica 13), sve skupa kratko vorteksirali te inkubirali 30 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 100 ^{o}C. Nakon zadnje inkubacije, dolazi do promjene boje uzoraka u ružičastu što odgovara količini nastale ureje, te ih je prilikom hlađenja na sobnu temperaturu potrebno zaštititi od svjetlosti. Mjerenje uzoraka, standarda i slijepe probe izvršeno je u duplikatu na UV-Vis spektrofotometru Libra S22, tvrtke Biochrom očitanjem vrijednosti apsorbancije pri 540 nm. Kao standardnu otopinu koristili smo 6 mM otopinu ureje u rasponu koncentracija od 0 do 5 mM. U standardne otopine ureje određene koncentracije dodano je samo 800 μL kisele otopine H_2SO_4 (96 %), H_3PO_4 (85 %) i destilirane vode u omjeru 1:3:7 i 50 μL α-ISPF-a otopljenog u apsolutnom etanolu, sve zajedno zagrijavano 30 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 100 ^{o}C te je naposljetku izmjerena vrijednost apsorbancije na 540 nm. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine ureje određena je jednadžba pravca. Koristeći Lambert-Beerov zakon ($A = log (P_o/P) = \varepsilon \times b \times c$), iz jednadžbe pravca izračunali smo vrijednosti traženih koncentracija Arg-1 u ispitivanim uzorcima te smo ih iskazali kao μM ureje.

Tablica 13. Priprema otopina za određivanje koncentracije Arg-1

Vrsta otopine	*Priprema otopina*
6 mM ureja	36 mg ureje u 100 mL dH_20
TRITON X-100	100 µL Triton X-100 i do 99,9 mL dH_20
0,2 M TRIS koncentrirana otopina	2,42 g TRIS baze i do 100 mL dH_20
0,2 M HCl	1,642 mL 37 % HCl i do 100 mL dH_2O
50 mM Tris-HCl, pH = 7,5	50 mL 0,2 M Tris + oko 40 mL 0,2 M HCl, podesiti pH = 7,5 i do 200 mL dH_2O
50 mM $MnCl_2$	49,48 mg $MnCl_2$ x 4 H_2O i do 5 mL dH_2O
0,5M L-arginin, pH=9,7	871 mg + dio 0,2 M HCl, podesiti pH = 9,7 do 10 mL dH_2O
H_2SO_4,(96 %) : H_3PO_4, (85 %) : dH_2O	10 mL : 30 mL : 70 mL (tj. 1 : 3 : 7)
9 % α-ISPF	0,355 g α-ISPF i do 5 mL 100 % EtOH

3.2.11. Određivanje koncentracije proangiogenih čimbenika: VEGF, MMP-2, MMP-9 i COX-2

3.2.11.1. ELISA određivanje koncentracije VEGF-a

Koristili smo ELISA test za određivanje promjene razine VEGF-a u nadtalogu tumorskih stanica, tumorskim stanicama i nestimuliranim stanicama makrofaga ascitesa u miša nositelja EAT-a. Nadtalog je sakupljen iz različitih obrađenih skupina i kontrole. VEGF razinu u ascitesnoj tekućini, homogenatu tumorskih stanica ili stanicama makrofaga iz peritonealne šupljine odredili smo pomoću ELISA kita Mouse VEGF Immunoassay, Quantikine® ELISA, proizvođača R&D Systems Europe, Ltd. (UK) prema uputama proizvođača. Ova metoda temelji se na kvantitativnoj sendvič ELISA metodi gdje je poliklonalno protutijelo specifično za mišji VEGF već prethodno naneseno na mikroploču. Ukratko, ascitesnu tekućinu i tumorske stanice razrijedili smo 2 puta s puferom iz kita „Calibrator Diluent RD5T“, dok samo stanice makrofaga ascitesa koristili nerazrijeđene. U mikrotitarsku ploču s 96 jažica dodali smo 50 µL pufera „Assay Diluent RD1N“ i 50 µL

standarda ili odgovarajućeg uzorka i sve skupa inkubirali tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se svaki prisutan mišji VEGF vezao za imobilizirano protutijelo. Nakon toga, sadržaj svake jažice isprali smo 5 puta s po 200 µL puferom za ispiranje kako bi se uklonile nevezane komponente te smo u svaku jažicu dodali po 100 µL peroksidazom obilježenog poliklonalnog protutijela specifičnog za mišji VEGF. Nakon druge inkubacije u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi, ponovno je slijedilo ispiranje mikroploče 5 puta kako bismo uklonili sva nevezana enzimom-obilježena protutijela. Zatim se u jažice dodaje po 100 µL otopine supstrata i ponovno inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetla pri čemu enzimska reakcija stvara plavo obojeni produkt. Po isteku inkubacije dodaje se 100 µL stop otopine u svaku jažicu pri čemu plavo obojeni produkt postaje žuto obojen. Intenzitet nastalog žutog obojenja proporcionalan je s količinom mišjeg VEGF-a vezanog na početku. Vrijednosti apsorbancije uzoraka očitali smo pri 450 nm na mikročitaču iEMS Reader MF, tvrtke Labsystems , uz korekciju valne duljine pri 540 nm. Kao standard koristili smo 500 pg/mL mišji VEGF standard iz kita pripremljenog sa „Calibrator Diluent RD5T“ puferom u rasponu koncentracija od 0 do 250 pg/mL. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine VEGF-a određena je jednadžba pravca. Koristeći Lambert-Beerov zakon ($A = log (P_o/P) = \varepsilon \times b \times c$), iz jednadžbe pravca izračunali smo vrijednosti traženih koncentracija VEGF-a u ispitivanim uzorcima te smo ih iskazali kao pg/mL. Uzorci koji su bili razrijeđeni prije same analize kod konačnog izračuna koncentracije pomnoženi su s faktorom razrjeđenja, a svi uzorci su rađeni u triplikatu. Najmanja granica detekcije mišjeg VEGF-a obično je manja od 3,0 pg/mL (uzorci ispod te vrijednosti smatrani su negativnim).

3.2.11.2. ELISA određivanje koncentracije MMP-2 i MMP-9

Koristili smo ELISA test za određivanje promjene razine MMP-2 i MMP-9 u nadtalogu tumorskih stanica, tumorskim stanicama i stanicama makrofaga ascitesa u miša nositelja EAT-a. Razinu MMP-2 i MMP-9 odredili smo pomoću ELISA kita Mouse MMP-2 ELISA Kit i Mouse MMP-9 ELISA Kit proizvođača Chongqing Biospes Co., Ltd, Biospes, (Kina) prema uputama proizvođača. Ova metoda temelji se na sendvič ELISA tehnici. Anti-MMP-2 ili anti-MMP-9 poliklonalna protutijela prethodno su nanesena na pločicu od 96 jažica. Biotin konjugirana anti-MMP-2 i anti-MMP-9 poliklonalna protutijela koriste se za otkrivanje vezanih metaloproteinaza. Ukratko, nadtalog tumorskih stanica i tumorske stanice razrijedili smo 2 puta s puferom za razrjeđivanje uzoraka/standarda iz kita, dok samo stanice makrofaga ascitesa koristili nerazrijeđene. U mikrotitarsku ploču s 96 jažica dodali smo 100 µL standarda ili odgovarajućeg uzorka i sve skupa inkubirali tijekom 90 minuta na 37 ^{o}C kako bismo omogućili vezanje MMP-2 ili MMP-9 za imobilizirano protutijelo. Nakon toga, uklonili smo sadržaj svake jažice i dodali smo 100 µL radnu otopinu biotinom konjugirano/vezano anti-mišje MMP-2 ili MMP-9 protutijelo u sve jažice i ponovno inkubirali na 37 ^{o}C tijekom 60 minuta. Zatim smo sadržaj svake jažice isprali 3 puta s puferom za ispiranjem iz kita te smo u svaku dodali 100 µL radne otopine avidin-biotin-peroksidaza kompleksa (ABC) i sve zajedno inkubirali na 37 ^{o}C tijekom 30 minuta. Sadržaj svake jažice smo zatim isprali 5 puta s puferom za ispiranje kako bismo uklonili nevezane konjugate te u svaku dodali 90 µL otopine 3,3´,5,5´-tetrametilbenzidin (TMB) supstrata radi vizualizacije HRP enzimske reakcije i stvaranja plavo obojenog produkta uz inkubaciju na 37 ^{o}C tijekom 20 minuta u mraku. Po isteku inkubacije dodaje se 100 µL stop otopine u svaku jažicu budući da HRP katalizira TMB pri nastaje plavo obojeni produkt koji postaje žuto obojen nakon dodatka zakiseljene stop otopine. Intenzitet nastalog žutog obojenja proporcionalan je s količinom mišjeg MMP-2 ili MMP-9 vezanog na početku. Vrijednosti apsorbancije uzoraka očitali smo pri 450 nm na mikročitaču Microplate reader Model 550, tvrtke Bio-Rad. Kao standard koristili smo 10 000 pg/mL mišjeg MMP-2 ili MMP-9 standarda iz kita pripremljenog s puferom za razrjeđivanje uzorka/standarda u rasponu koncentracija od 0 do 5 000 pg/mL. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine MMP-2 ili MMP-9 određena je jednadžba pravca. Koristeći Lambert-Beerov zakon ($A = log\ (P_o/P) = \varepsilon\ x\ b\ x\ c$), iz jednadžbe pravca izračunali smo vrijednosti traženih koncentracija MMP-2 ili MMP-9 u ispitivanim uzorcima te smo ih

iskazali kao pg/mL. Uzorci koji su bili razrijeđeni prije same analize kod konačnog izračuna koncentracije pomnoženi su s faktorom razrjeđenja, a svi uzorci su rađeni u triplikatu. Osjetljivost ovog ELISA kita za određivanje koncentracije mišjeg MMP-2 je < 10 pg/mL, dok je za MMP-9 < 20 pg/mL.

3.2.11.3. ELISA određivanje koncentracije COX-2

Koristili smo ELISA test za određivanje promjene razine COX-2, također poznate i kao prostaglandin G/H sintaze 2 (PGHS2) u talogu tumorskih stanica, stanicama makrofaga ascitesa bez stimulacija i s 1 μg/mL LPS stimulacijom te u LPS-stimuliranim (1 μg/mL) makrofazima slezene u miša nositelja EAT-a. Razinu mišjeg COX-2 odredili smo pomoću ELISA kita Human/Mouse Total COX-2, proizvođača R&D Systems Europe, Ltd. (UK) prema uputama proizvođača. Ova metoda temelji se na sendvič ELISA tehnici gdje se imobilizirana vezujuća protutijela specifično veže za COX-2. Nakon ispiranja nevezanog materijala, biotin vezano detekcijsko protutijelo koje je specifično za COX-2 koristi se za otkrivanje vezanih proteina korištenjem konjugata streptavidin-HRP. Priprema mikropločice s 96 jažica izvršena je dodavanjem 100 μL PBS-om razrijeđenog vezujućeg protutijela (c_k=2,0 μg/mL) po jažici nakon čega je slijedila inkubacija na sobnoj temperaturi preko noći. Prije dodavanja 300 μL pufera za blokiranje u svaku jažicu i ponovne inkubacije 1–2 sata na sobnoj temperaturi, sadržaj svake jažice potrebno je isprati 3 puta s puferom za ispiranjem. Po završetku inkubacije sadržaj svake jažice ispran je 3 puta sa puferom za ispiranje nakon čega je mikropločica spremna za dodavanje uzoraka. Talog tumorskih stanica razrijedili smo 2 puta s puferom za razrjeđivanje uzoraka/standarda, dok smo stanice makrofaga ascitesa sa i bez LPS stimulacije te LPS stimulirane makrofage slezene koristili u orginalu. U jažice je dodano po 100 μL uzorka ili standarda te je sve skupa inkubirano tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je sadržaj svake jažice ispran 3 puta s puferom za ispiranje. Zatim je u svaku jažicu dodano 100 μL razrijeđenog detekcijskog protutijela (600 ng/mL) i sve skupa inkubirano 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedilo ponovno ispiranje jažica (3X). Nakon ispiranja, u svaku jažicu dodano je 100 μL razrijeđenog Streptavidin-HRP konjugata (1:200) te sve ponovno inkubirano tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetla. Prije dodavanja otopine supstrata (100 μL) u svaku jažicu i ponovne inkubacije 20 minuta na sobnoj temperaturi, pločica je isprana 3 puta sa puferom za ispiranje. Nakon zadnje

inkubacije nastaje plavo obojeni produkt, koji postaje žuto obojen nakon dodatka zakiseljene stop otopine (50 µL) u svaku jažicu (Tablica 14). Intenzitet nastalog žutog obojenja proporcionalan je s količinom mišjeg COX-2 vezanog na početku. Vrijednosti apsorbancije uzoraka očitali smo pri 450 nm na mikročitaču iEMS Reader MF, tvrtke Labsystems, uz korekciju valne duljine pri 540 nm. Kao standard koristili smo 120 ng/mL ukupnog COX-2 standarda iz kita svježe pripremljenog s puferom za razrjeđivanje uzorka/standarda u rasponu koncentracija od 0 do 10 000 pg/mL.

Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne COX-2 otopine određena je jednadžba pravca. Koristeći Lambert-Beerov zakon ($A = log (P_o/P) = \varepsilon \times b \times c$), iz jednadžbe pravca izračunali smo vrijednosti traženih koncentracija COX-2 u ispitivanim uzorcima te smo ih iskazali kao pg/mL. Uzorci koji su bili razrijeđeni prije same analize kod konačnog izračuna koncentracije pomnoženi su s faktorom razrjeđenja, a svi uzorci su rađeni u triplikatu.

Tablica 14. Priprema otopina za određivanje koncentracije COX-2

Vrsta otopine	***Priprema otopina***
Pufer za ispiranje	0,05 % Tween 20 u PBS-u, pH 7,2-7,4
Pufer za blokiranje	1 % BSA + 0,05 % NaN_3 u PBS-u, pH 7,2-7,4
Pufer za razrjeđivanje uzoraka i pripremu standarda	1 mM EDTA + 0,5 % Triton x-100 u PBS-u, pH 7,2-7,4
Pufer za razrjeđivanje detekcijskog i Streptavidin-HRP protutijela	1 % BSA u PBS-u, pH = 7,2-7,4; 0,2 µm profiltriran
0,05 M fosfat-citratni pufer	25,7 mL 0,2 M Na_2HPO_4 + 24,3 mL 0,1 M limunska kiselina, podesiti pH= 5,0 te nadopuniti do 100 mL sa dH_2O
Otopina supstrata (TMB)	1 mg TMB-a u 1 mL DMSO + 9 mL 0,05 M fosfat-citratnog pufera + 2 µL svježeg 30 % H_2O_2
Stop otopina	1 M H_2SO_4

3.2.12. Određivanje koncentracije Th1/Th2/Th17 citokina iz nadtaloga tumorskih stanica

Koristili smo ELISA test za određivanje koncentracije Th1/Th2/Th17 citokina iz nadtaloga tumorskih stanica u miša nositelja EAT-a. Razinu mišjeg Th1/Th2/Th17 citokina odredili smo pomoću ELISA kita „Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokines Multi-Analyte ELISArray Kit“, proizvođača, QIAGEN Gmbh (Njemačka) prema uputama proizvođača. Supernatant tumorskih stanica razrijedili smo 2 puta s puferom za razrjeđivanje uzoraka. Neposredno prije upotrebe otopiti antigenske (citokinske) standarde na ledu tijekom 20 minuta, vorteksirati i lagano promiješati. U jednoj Eppendorf epruveti napravi se koktel koncentriranih antigen standarda koji sadrži svih 12 standarda tako što se pipetira 10 µL svakog standarda u 880 µL pufera za razrjeđivanje uzoraka. Radna otopina koktela antigenskih standarda dobije se tako da se koncentrirana otopina antigen standarda razrijedi 5 puta s puferom za razrjeđivanje uzoraka. U svaku jažicu 96 mikropločice dodati 50 µL „Assay“ pufera višekanalnom pipetom. U red A (negativna kontrola) dodaje se redom u sve jažice 50 µL pufera za razrjeđivanje uzoraka, dok se u red H dodaje 50 µL radne otopine koktela antigen standarda. Razrjeđeni uzorci supernatanta tumorskih stanica dodaju se po 50 µL u preostale redove B, C, D, E, F i G nakon čega se cijela mikropločica inkubira tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. U svaku epicu detekcijskog protutijela dodaje se 855 µL „Assay“ pufera i dobro promiješa. Nakon završene inkubacije mikropločice, izlije se sadržaj svih jažica i ispere se 3 puta s puferom za ispiranje uz lagano i kratko miješanje. U redove A do H dodaje se po 100 µL odgovarajućeg razrijeđenog detekcijskog protutijela, lagano promiješamo par sekundi i inkubiramo tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, ponovi se postupak ispiranja mikropločice 3 puta s puferom za ispiranje, te se zatim u svaku jažicu dodaje 100 µL razrijeđenog avidin-HRP konjugata, lagano promiješa i inkubira narednih 30 minuta na sobnoj temperaturi bez prisustva svjetlosti. Nakon toga ponovno se ispire mikropločica 4 puta sa puferom za ispiranje uz lagano miješanje te se u svaku jažicu doda 100 µL otopine za razvijanje (engl. *Development solution*) i inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetla pri čemu dolazi do pojave plavog obojenja u jažicama (Tablica 16). Na kraju se dodaje 100 µL stop otopine u svaku jažicu pri čemu nastaje žuto obojenje. Intenzitet nastalog žutog obojenja proporcionalan je s količinom mišjih Th1/Th2/Th17 citokina vezanih na početku. Vrijednosti apsorbancije uzoraka očitali smo pri

450 nm na mikročitaču iEMS Reader MF, tvrtke Labsystems, uz korekciju valne duljine pri 540 nm. Za svaki antigen (citokin), oduzela se je očitana vrijednost apsorbancije od apsorbancije negativne kontrole, radi dobivanja korigirane vrijednosti apsorbancije te su ujedno pomnožene s faktorom razrjeđenja uzorka. Svi uzorci rađeni su u duplikatu. Granica detekcije svakog pojedinog citokina je koncentracija izvedena iz standardne krivulje koja odgovara srednjoj vrijednosti apsorbancije kontrolnog antigena + 2 standardne devijacije (n = 16) (Tablica 15).

Tablica 15. Granice detekcije koncentracija Th1/Th2/Th17 citokina

CITOKINI	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17A	IL-23	IFN-γ	TNF-α	TGF-β1
(pg/mL)	24,2	32,8	36,1	58,8	59,4	21,1	34,6	83,3	67,2	39,0	30,5	85,4

Tablica 16. Priprema otopina za određivanje koncentracija Th1/Th2/Th17 citokina

Vrsta otopine	*Priprema otopina*
Pufer za ispiranje 1X	50 mL pufera za ispiranje (10X) + 450 mL dH_2O
„Assay buffer“ (pufer za analizu uzoraka)	0,6 mL 10% BSA + do 30 mL „Assay Buffer Stock“, držati na sobnoj temperaturi
Pufer za razrjeđivanje uzoraka	2 mL 10% BSA + 18 mL stock pufera za razrjeđivanje uzoraka
Avidin-HRP konjugat	11 µL Avidin-HRP konjugata u 11 mL „Assay“ pufera, pripremiti neposredno prije upotrebe, zaštititi od svjetla!

3.2.13. Određivanje ekspresije enzima Arg-1, iNOS i COX-2 Western blot tehnikom

3.2.13.1. Priprema uzoraka za Western blot analizu i izvođenje gel elektroforeze

Uzeti 100 mL uzorka i dodati 50 µL PAGE pufera te sve skupa kratko vorteksirati, a zatim staviti 5 minuta na termostat Dri-Block, DB-2D, tvrtke Techne na temperaturu od 95 ^{o}C radi denaturacije proteina. Nakon toga uzorci se nanose na 12 % SDS-PAGE gel (Natrij dodecil sulfat - poliakrilamidni gel za elektroforezu) koji je stavljen u kadicu za elektroforezu Novex™ XCell™ *SureLock*™ Mini-Cell, tvrtke Invitrogen™ sa SDS-MOPS puferom za elektroforezu 1X. U prvu jažicu gela stavljen je standard PAGE pufera (5 µL), dok u preostale jažice stavljamo po 10 µL denaturiranog uzorka te se nadolije pufera za elektroforezu u katodni i anodni prostor kadice za elektroforezu. Radi ujednačenijeg kretanja uzoraka tijekom elektroforeze, u unutarnji (katodni) prostor same kadice za elektroforezu dodali smo 500 µL antioksidansa te priključili na izvor istosmjerne struje uređaja Power pac 200, tvrtke Bio-Rad pri naponu od 150 V tijekom 55 minuta dok plava boja standarda ne dođe 1–2 cm od ruba gela. PVDF (poliviniliden difluoridne) membrane veličine 9 x 6 cm za svaki pojedini gel namočili smo prethodno u metanol (99,8 % *p. a.*) tijekom par minuta, a zatim smo ponovno na same membrane dodali hladnog 1X transfer pufera i ostavili stajati 10 minuta na platformskoj njihalici 3013 tvrtke GFL.

3.2.13.2. Prijenos uzoraka na PVDF membrane i imunološka detekcija

Nakon završene elektroforeze uzoraka, napravili smo mokri prijenos gelova, tako što smo gelove izvadili iz plastičnog okvira, odrezali gornji dio gela s jažicama i donji dio ispod linije standarda. U kazetu za transfer posložili smo po redu u tzv. "sendvič" strukturu: namočenu spužvicu u transfer puferu 1X, namočen filter papir, odrezani gel s uzorcima, namočenu PVDF membranu, namočen filter papir i ponovno namočenu spužvicu te prije zatvaranja kazete za transfer istisnuli zaostale mjehuriće zraka između gela i membrane. Tada se zatvorena kazeta za transfer prebaci u jedinicu za transfer TRANS_BLOT ^{TM} CELL, tvrtke Bio-Rad.

Budući da su proteini negativno nabijeni, kreću se prema pozitivnom anodnom (crvenom) polu jedinice za transfer, pa se stoga ona strana kazete s PVDF membranom okrene prema pozitivnom polu (anoda), a gelovi prema negativnom polu (katoda). Prijenos gelova na PVDF membrane vrši se pri 150 V, 4 ^{o}C tijekom 60 minuta s puferom za transferom 1X uz konstantno hlađenje. Nakon završenog prijenosa proteina na membrane, membrane se izvade iz kazeta i inkubiraju s 1X PVDF puferom za blokiranje tijekom 30 minuta uz lagano miješanje na platformskoj njihalici 3013 tvrtke GFL. Membrane se zatim kratko jedanput isperu s 0,05 % TBST puferom. Neposredno prije samog dodavanja primarnih protutijela na membrane, pripreme se njihova odgovarajuća razrjeđenja: Arg-1(1:500), iNOS (1:250) i β-aktin (1:250) sa 0,05 % TBST puferom. Pripremljena primarna protutijela nanose se direktno na svaku pojedinu membranu i drže tijekom 60 minuta, na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje na platformskoj njihalici 3013 tvrtke GFL nakon čega se svaka membrana ispire 3 puta po 5 minuta s TBST puferom uz miješanje na platformskoj njihalici 3013 tvrtke GFL. Sekundarno protutijelo IgG HRP (1:5000) pripremljeno s 0,05 % TBST puferom inkubira se sa membranom tijekom idućih 60 minuta na sobnoj temperaturi uz miješanje na platformskoj njihalici 3013 tvrtke GFL, zatim se membrane ispiru 3 puta po 5 minuta sa 0,05 % TBST puferom, jedanput s 1X TBS otopinom tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi te lagano sa staničevinom obriše gornja površina membrana. Analiza uzoraka na membrani vrši se uz dodatak 5 mL luminiscencijskog reagensa na membranu tijekom 2-3 minute na sobnoj temperaturi, nakon čega se taj reagens lagano ukloni staničevinom s membrane u kazeti za razvijanje filma, prekrije s prozirnom folijom i lagano sa staničevinom preko folije istisnu se zaostali mjehurići zraka na membrani. U tamnoj komori bez prisustva svjetlosti na membranu u kazeti za razvijanje filma stavi se RTG film i inkubira se u mraku tijekom 3-5 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, iz kazete za razvijanje filma izvadi se RTG film s membrane te se RTG film razvija prvotno u otopini razvijača uz miješanje do 20 sekundi, a zatim isto tako u otopini fiksira, nakon čega se ispire u destiliranoj vodi i posuši na zraku (Tablica 17).

Tablica 17. Priprema otopina za Western blot tehniku

Vrsta otopine	*Priprema otopina*
Pufer za lizu uzoraka	0,4 M Tris-HCl pH 6,8 (4,8 g Tris baze u 50 mL dH_2O) + 5 g SDS (5 %), podesiti pH = 6,8 s HCl + 20 mL glicerola + do 100 mL dH_2O
Osnovna otopina pufera za transfer (TB) 10X	30,28 g Tris baze + 144,13 g glicina + 1000 mL ultra čiste vode; čuvati na temperaturi od 20 ± 3 ^oC
Radna otopina pufera za transfer (TB) 1X	100 mL osnovne otopine TB 10X + 100 mL MeOH (98 %) + 800 mL ultra čiste vode; čuvati na temperaturi od 5 ± 3 ^oC
TBS otopina, pH =7,4	8,77 g NaCl (150 mM) + 6,0 g Tris baze (50 mM) + 1000 mL ultra čiste vode, pH podesiti dodatkom HCl (aq) na pH = 7,4; čuvati na temperaturi od 20 ± 3 ^oC
0,05 % TBST otopina	0,5 mL Tween 20 + 999,5 mL TBS otopine
SDS-MOPS radna otopina pufera 1X	50 mL NuPage SDS-MOPS pufer za elektroforezu (10X) + 950 mL ultra čiste vode
PVDF radna otopina pufera za blokiranje 1X	100 mL PVDF osnovne otopine za blokiranje (5x) + 400 mL ultra čiste vode
Luminiscencijski reagens	10 mL otopine A + 10 mL otopine B iz kita
Radna otopina razvijača RTG filma	1,25 L dH_2O + 1L komponenta A + 0,25 L komponenta B, dobro izmiješati
Radna otopina fiksira RTG filma	2L dH_2O + 0,5 L fiksira, dobro izmiješati

3.2.14. Statistička obrada podataka

Statistička analiza je provedena pomoću STATISTICA 12 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička točnost određena je s $P < 0,05$. Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SV ± SD) i/ili standardna pogreška (SV ± SP). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Daljnja analiza razlika između skupina napravljen je višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina.

§ 4. REZULTATI

4.1. PROTUTUMORSKI UČINAK FENOLNIH KISELINA

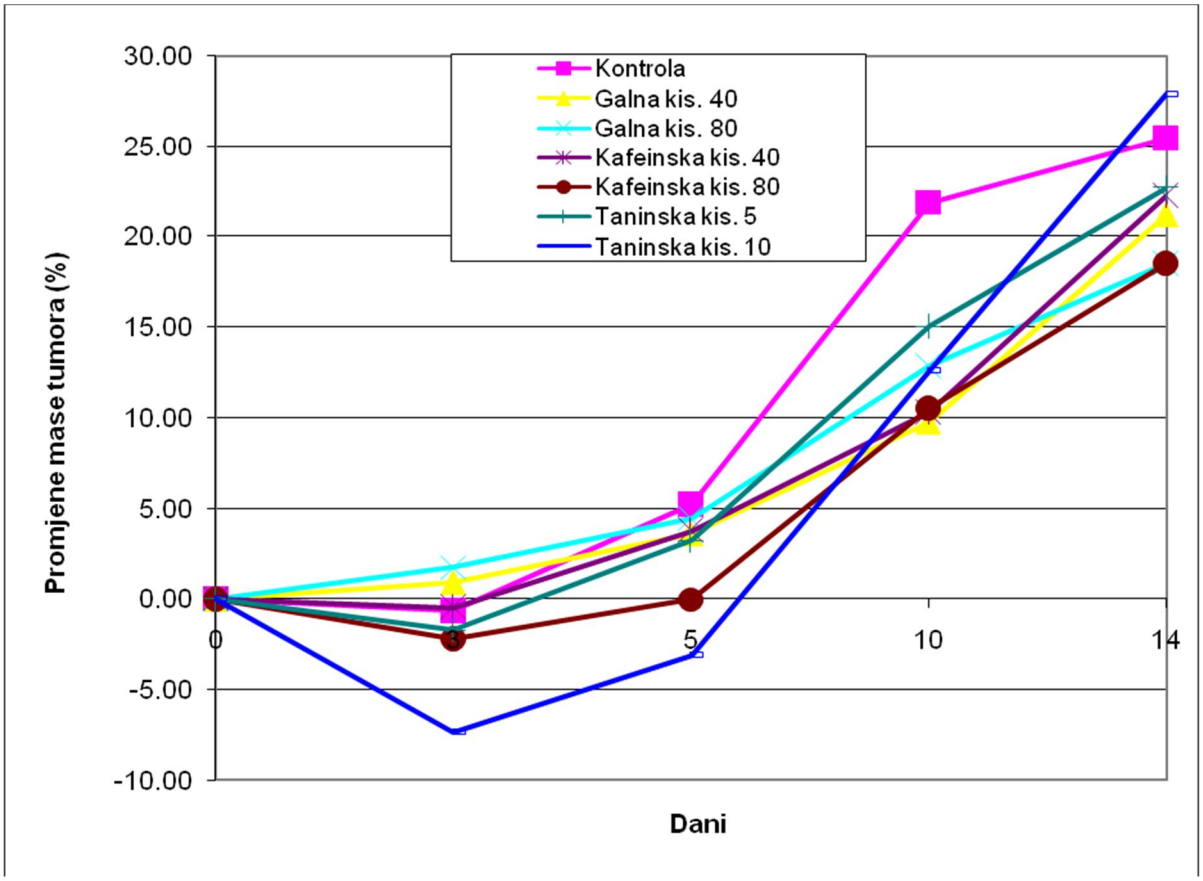
Poznato je da najmanje tri različita patološka događaja mogu prouzročiti ascites: (a) smanjena limfna drenaža iz peritonealne šupljine uzrokovana opstrukcijom limfnih žila sa stanicama tumora; (b) povećana propusnost (hiperpermeabilnost) kapilara peritonealne šupljine; i (c) angiogeneza.

Reaktivne vrste kisika (ROS) povezane su s mnogobrojnim ulogama stanice poput proliferacije i diferencijacije stanica, apoptoze i angiogeneze. ROS su ključne signalne molekule koje igraju važnu ulogu u progresiji upalnih poremećaja, uključujući i nastanak raka. Oksidacijski stres i kronične upale su najkritičniji čimbenici koji utječu na razvoj približno 15-20 % malignih oboljenja u svijetu. Nadalje, ROS može potaknuti lučenje najmoćnijeg angiogenog čimbenika VEGF-a u mnogim vrstama stanica i inducirati proliferaciju, nakupljanje tekućine (ascitesa), migraciju, reorganizaciju citoskeleta i stvaranje novih krvnih žila, kao i pokretanje diferencijacije M2 makrofaga i makrofaga pridruženih tumoru (TAMs) koji također doprinose tumorskoj angiogenezi. Stoga je napredovanje tumora u izravnoj korelaciji s tumorskom angiogenezom i njegovom sposobnošću metastaziranja. Međutim, pokazalo se je da antioksidativna terapija blokira diferencijaciju TAMs i tumorogenezu u mišjim modelima raka. Stoga bi povećanje M1 tumorocidne djelotvornosti TAMs; i blokiranje M2 tumorske aktivnost TAMs moglo biti ključno u inhibiciji angiogeneze te inhibiciji rasta tumora.

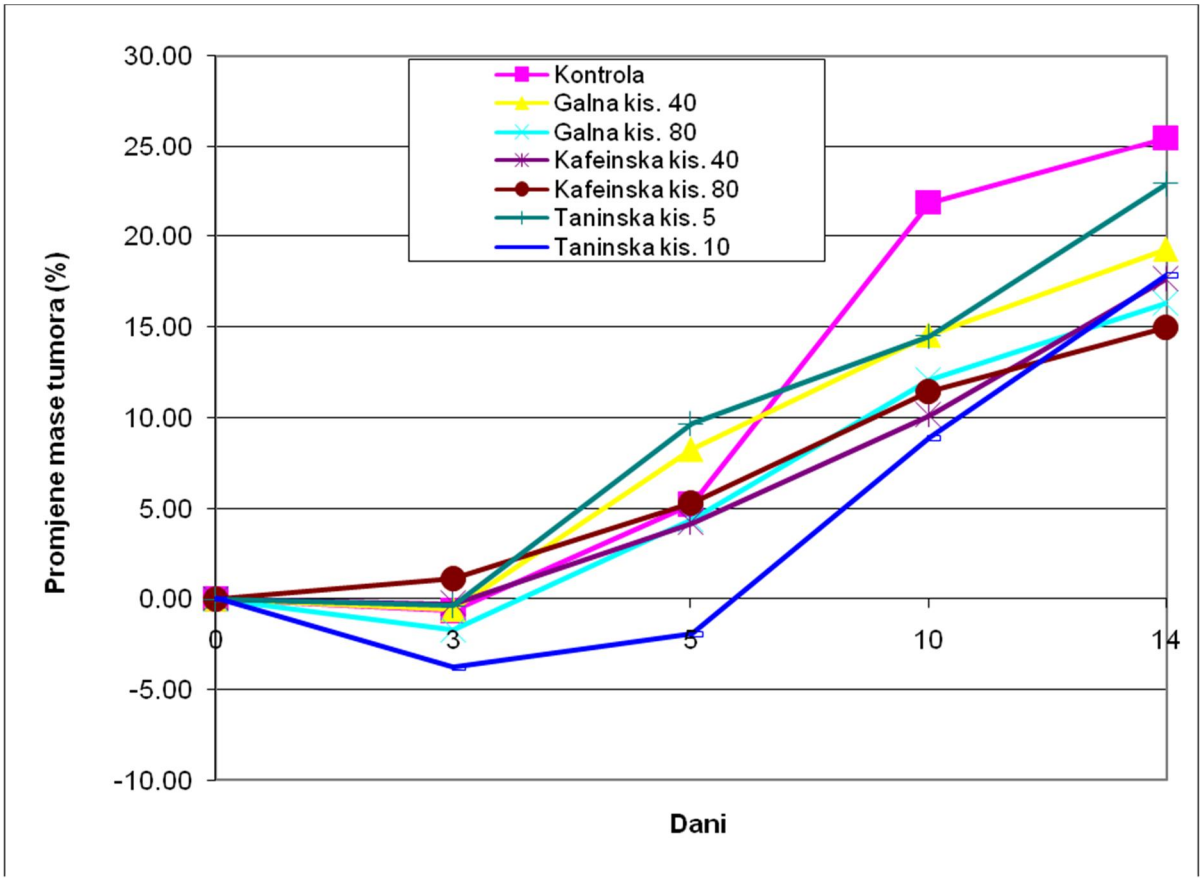
Kako bismo utvrdili protutumorski učinak fenolnih kiselina (galne, kafeinske i taninske kiseline) primijenjenih u različitim dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom izvođenja pokusa pratili smo kako se mijenja tjelesna masa tumora u životinjama, preživljenje samih obrađenih skupina u odnosu na EAT kontrolu. Također, analizirali smo prikupljeni ukupni volumen peritonealne tekućine (ascitesa) nakon žrtvovanja samih životinja kao i ukupan broj stanica koji se nalazi u njemu, te napravljena je diferencijalna analiza stanica uzetih iz peritonealne tekućine.

4.1.1. Promjena tjelesne mase tumora

Praćenjem promjene tjelesne mase tijekom perioda obrade miševa s pojedinim fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg dobili smo uvid u brzinu rasta mase tumora odnosno volumena ascitesa kod pojedine skupine, pri čemu je rast tumora izračun kao postotak (%) u odnosu na početnu masu tumora unutar skupine. Rezultati praćenja promjene mase tumora kod miševa koji su obrađeni fenolnim kiselinama tijekom 10 dana prikazani su na Slici 37. Kod većine skupina uključujući i kontrola do 3. dana zamijećen je blagi linearni pad tjelesne mase, osim kod GA 40 mg/kg i GA 80 mg/kg gdje je vidljiv blagi linearni porast u odnosu na dan injiciranja EAT stanica u trbušnu šupljinu. Tijekom idućih 2 dana (do 5. dana) kod svih skupina vidljivo je povećanje tjelesne mase koje je nastavljeno sve do 14. dana (dana žrtvovanja životinja). Kod obrađenih skupina u odnosu na kontrolu dobitak na tjelesnoj težini od 3. do 5. dana je nešto sporiji, da bi se od do 14. dana približile tjelesnoj težini kontrole. Obrađene skupine GA 80 mg/kg i CA 80 mg/kg imaju istu tjelesnu masu 14. dana i ujedno najsporiji i najniži porast tjelesne mase, dok TA 10 mg/kg pokazuje najveći porast tjelesne mase u odnosu na kontrolu u smislu da je tjelesna težina te skupine veća od postignute mase same kontrole. Tjelesne mase miševa ostalih skupina GA 40 mg/kg, CA 40 mg/kg i TA 5 mg/kg također su se do 14. dana približile vrijednosti tjelesne mase kontrole, ali su i dalje ostale ispod njene najviše postignute vrijednosti. Što se tiče tjelesne mase miševa koji su obrađeni s fenolnim kiselinama nakon 5. dana svaki drugi dan (Slika 38) do 3. dana vidljiva je blaga stagnacija i gubitak tjelesne mase kod većine skupina, osim kod CA 80 mg/kg gdje dolazi do blagog rasta tjelesne mase. U narednom periodu sve do 14. dana kod svih skupina dolazi do porasta tjelesne mase, s time da nijedna obrađena skupina ne prelazi vrijednost tjelesne mase same kontrole. Promjena mase tumora kod kontrole iznosi 25 % tijekom 14 dana, a najveći prirast tjelesne mase ima TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu.



Slika 37. Promjene mase tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=10) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rast mase tumora izražen je kao % u odnosu na početnu masu miševa unutar skupine.



Slika 38. Promjene mase tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=10) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rast mase tumora izražen je kao % u odnosu na početnu masu miševa unutar skupine.

4.1.2. Preživljenje životinja

Učinak fenolnih kiselina u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg na miševe nositelje EAT-a istražili smo praćenjem vremenskog perioda preživljenja životinja što je prikazano u Tablici 18, Slika 39. Obrada miševa s GA 80 mg/kg tijekom 10 dana pokazuje najbolje rezultate u smislu povećanja životnog vijeka (% ILS,) za 30,27 %, dok je najmanje povećanje životnog vijeka kod skupine TA 10 mg/kg i iznosi svega 4,72 %. Kod obrađenih skupina CA 40 mg/kg i TA 5 mg/kg vidljiv je bolji učinak preživljenja životinja nego kod primjene njihovih dvostrukih doza, za razliku od primjene galne kiseline gdje je bolji % ILS-a s 80 mg/kg nego s 40 mg/kg. Što se tiče preživljenja miševa kod obrade od 5. dana svaki drugi dan (Tablica 19, Slika 40) kada je tumor u uznapredovaloj fazi rasta bolji rezultati ostvareni su kada je primijenjena dvostruka koncentracija svih navedenih fenolnih kiselina, s time da je najbolji učinak ostvaren s CA 80 mg/kg gdje je % ILS-a 52,93 %. U ovom slučaju najmanje povećanje životnog vijeka bilo je kod primjene TA 5 mg/kg i iznosilo je -2,44 %. Ako se međusobno usporede rezultati oba dva načina obrade životinja onda proizlazi da je primjena kafeinske kiseline puno više učinkovitija kod obrade u napredovaloj fazi rasta tumora, dok je primjena galne i taninske kiseline djelotvornije u ranijoj fazi razvoja tumora.

Tablica 18. Preživljenje miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon obrade s fenolnim kiselinama 10X svaki dan.

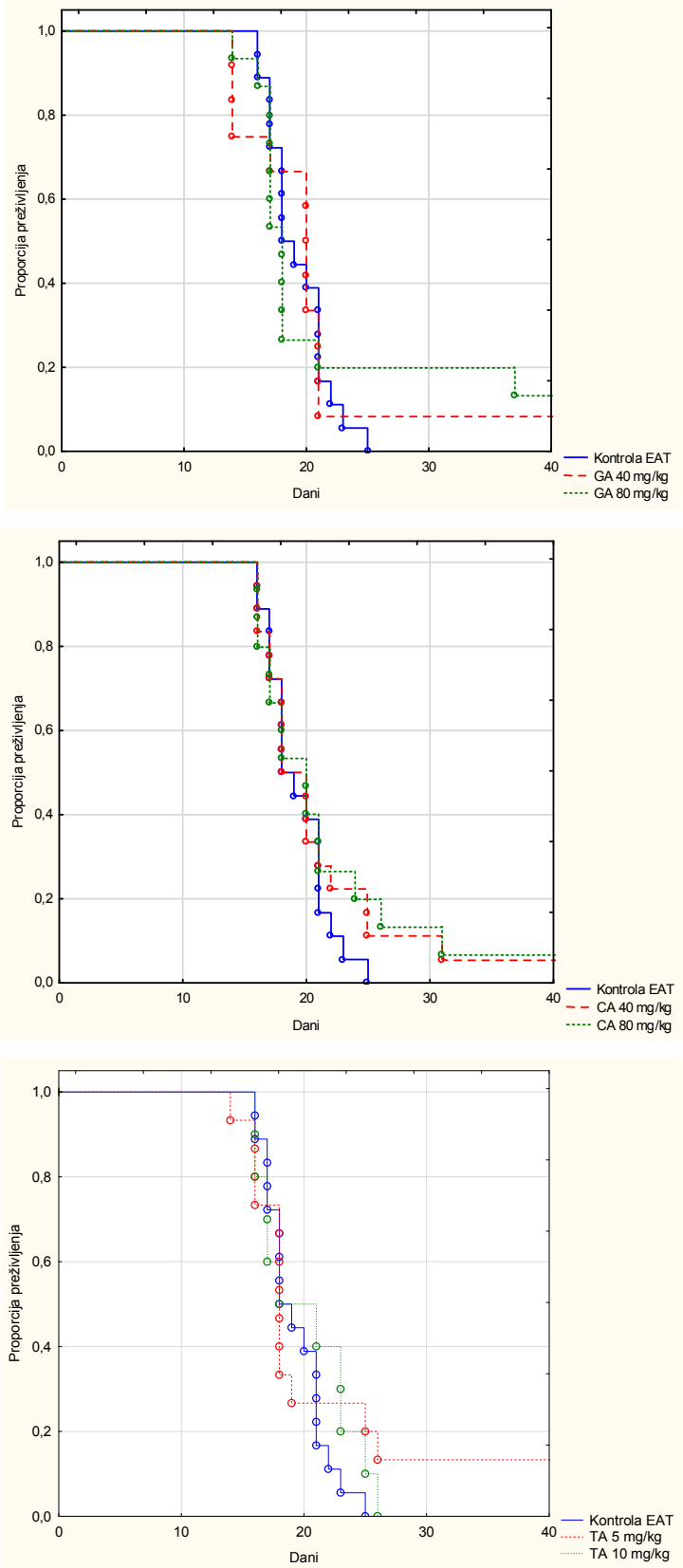
Skupina [a]	Raspon preživljenja (dani)	Srednja vrijednost preživljenja (dani)	% T/C [b]	% ILS [c]	Broj preživjelih životinja
EAT kontrola	16-25	19,29	/	/	0
GA 40 mg/kg	14-67	22,42	116,23	16,23	1
GA 80 mg/kg	14-60	25,13	130,32	30,27	2
CA 40 mg/kg	16-67	22,5	116,67	16,64	1
CA 80 mg/kg	16-44	21,67	112,35	12,32	1
TA 5 mg/kg	14-67	23,93	124,10	24,05	1
TA 10 mg/kg	16-26	20,20	104,74	4,72	0

[a] Miševi (N=10-15) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana.

[b] $\% \frac{T}{C} = \left(\frac{T}{C}\right) x\ 100\ \%$; **T** - srednja vrijednost vremena preživljenja obrađene skupine životinja; **C** - srednja vrijednost vremena preživljenja kontrolne skupine životinja.

[c] $\% ILS = \left(\frac{T-C}{C}\right) x\ 100\ \%$; postotak povećanja životnog vijeka (% ILS); T - srednja vrijednost vremena preživljenja obrađene skupine životinja; **C** - srednja vrijednost vremena preživljenja kontrolne skupine životinja.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina.



Slika 39. Kaplan-Meyer krivulje preživljenja miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=10-15) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$)

obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina.

Tablica 19. Preživljenje miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon obrade s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan.

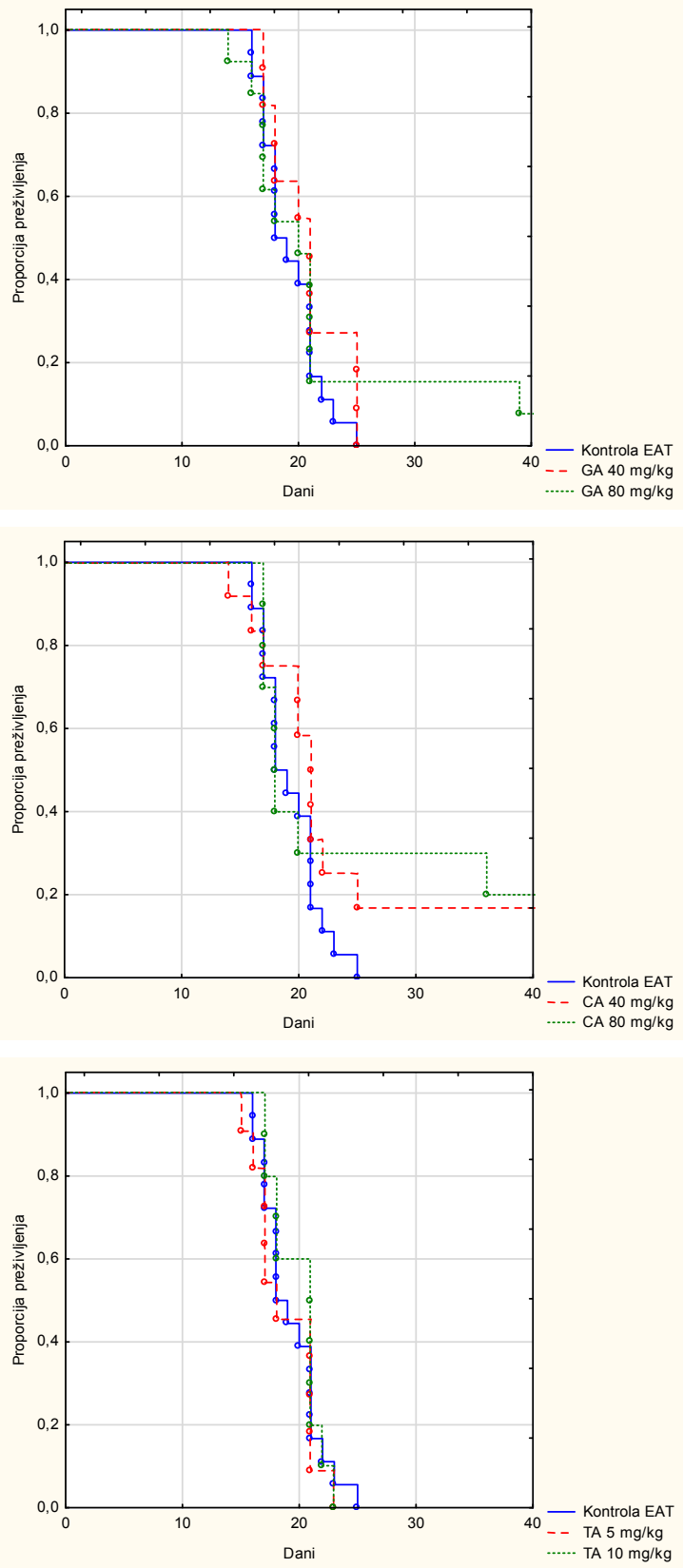
Skupina [a]	Raspon preživljenja (dani)	Srednja vrijednost preživljenja (dani)	% T/C [b]	% ILS [c]	Broj preživjelih životinja
EAT kontrola	16-25	19,29	/	/	0
GA 40 mg/kg	17-25	20,73	107,47	7,47	0
GA 80 mg/kg	14-56	22,92	118,86	18,82	0
CA 40 mg/kg	14-67	27,08	140,40	40,38	2
CA 80 mg/kg	17-67	29,50	152,96	52,93	2
TA 5 mg/kg	15-23	18,82	97,58	-2,44	0
TA 10 mg/kg	17-23	19,90	103,19	3,16	0

[a] Miševi (N=10-15) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg od 5. dana svaki drugi dan.

[b] $\% \frac{T}{C} = \left(\frac{T}{C}\right) x\ 100\ \%$; T - srednja vrijednost vremena preživljenja obrađene skupine životinja; **C** - srednja vrijednost vremena preživljenja kontrolne skupine životinja.

[c] $\%\ ILS = \left(\frac{T-C}{C}\right) x\ 100\ \%$; postotak povećanja životnog vijeka (% ILS); T - srednja vrijednost vremena preživljenja obrađene skupine životinja; **C** - srednja vrijednost vremena preživljenja kontrolne skupine životinja.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina.



Slika 40. Kaplan-Meyer krivulje preživljenja miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=10-15) nakon unosa EAT stanica

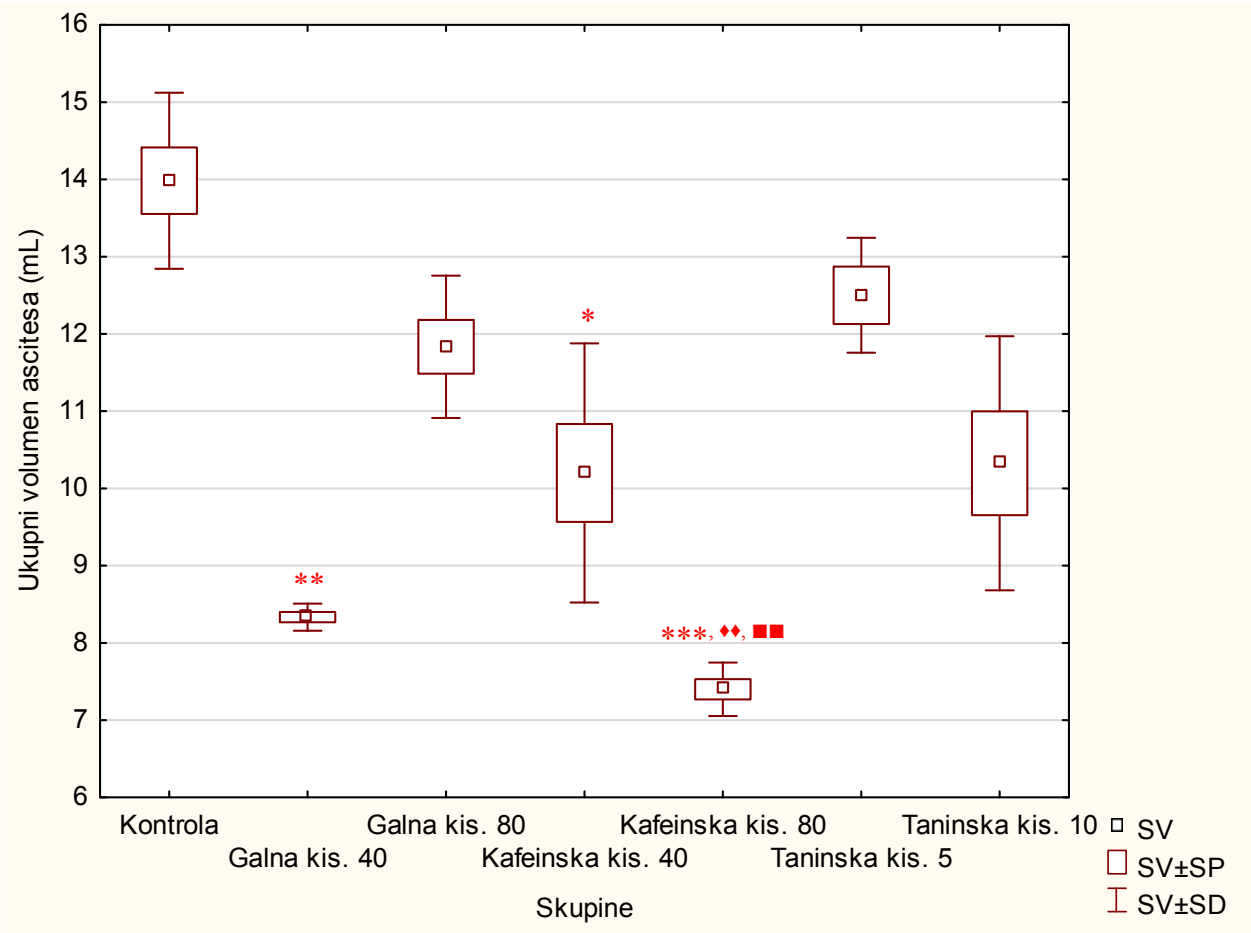
($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg od 5. dana svaki drugi dan. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina.

4.1.3. Ukupni volumen peritonealne tekućine

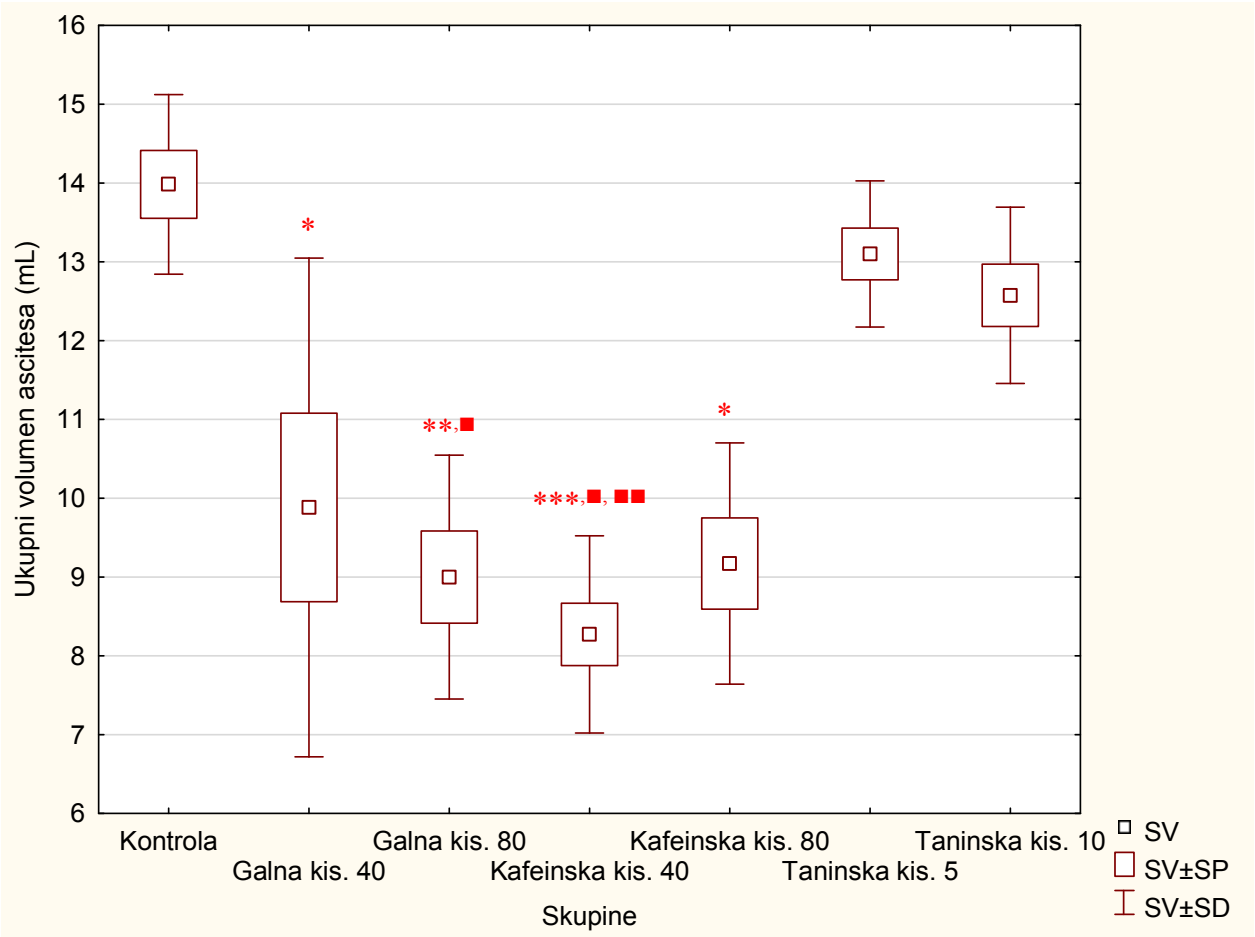
Prilikom analize volumena ascitesa vidljivo je da je došlo do njegovog smanjenja u peritonealnoj šupljini kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu koje su obrađene tijekom 10 dana, s time da je najveća redukcija peritonealne tekućine kod skupine obrađene s CA 80 mg/kg ($P < 0,01$), zatim kod GA 40 mg/kg ($P < 0,01$) i CA 40 mg/kg ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu (Slika 41), dok je najmanje smanjenje volumena peritonealne tekućine kod životinja koje su obrađene s TA 5 mg/kg tijekom 10 dana. Također, statističke razlike utvrđene su i između obrađenih skupina: CA 80 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,01$) i TA 5 mg/kg ($P < 0,01$) tijekom uzastopne obrade životinja.

S druge strane, najveće smanjenje volumena peritonealne tekućine kod životinja koje su obrađene s fenolnim kiselinama počevši od 5. dana svaki drugi dan pokazala je primjena CA 40 mg/kg ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolu, iako je i kod drugih obrađenih skupina vidljiva statistička značajnost u odnosu na kontrolu: GA 80 mg/kg ($P < 0,01$) te GA 40 mg/kg i CA 80 mg/kg ($P < 0,05$). I kod ovog načina obrade životinja vidljivo je da postoje razlike i između samih obrađenih skupina: GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) i CA 40 mg/kg ($P < 0,01$) u odnosu na TA 5 mg/kg te CA 40 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 42).



Slika 41. Ukupni volumen ascitesa u peritonealnoj šupljini miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: CA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$); CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (***$P < 0{,}001$) i između obrađenih skupina: CA 80 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦♦$P < 0{,}01$); CA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■■$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



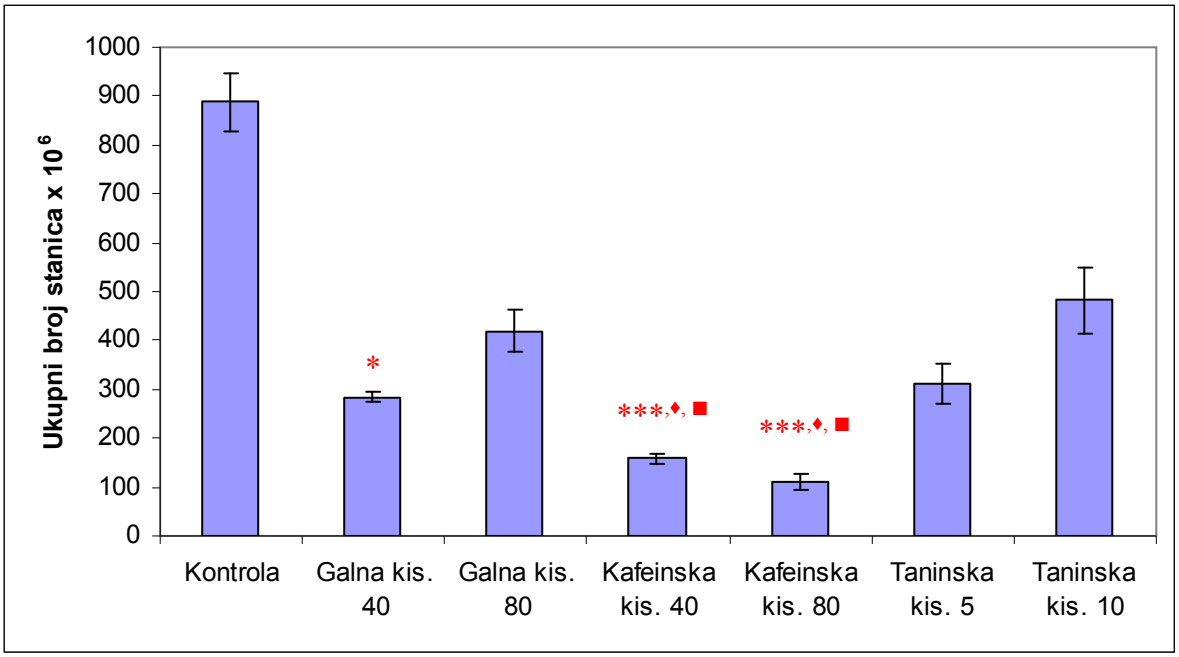
Slika 42. Ukupni volumen ascitesa u peritonealnoj šupljini miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (**P* < 0,05); CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (**P* < 0,05); GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (***P* < 0,01); CA 40 mg/kg *vs* KONTR. (****P* < 0,001) i između obrađenih skupina: GA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■*P* < 0,05); CA 40 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■*P* < 0,05); CA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■■*P* < 0,01).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.1.4. Ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini

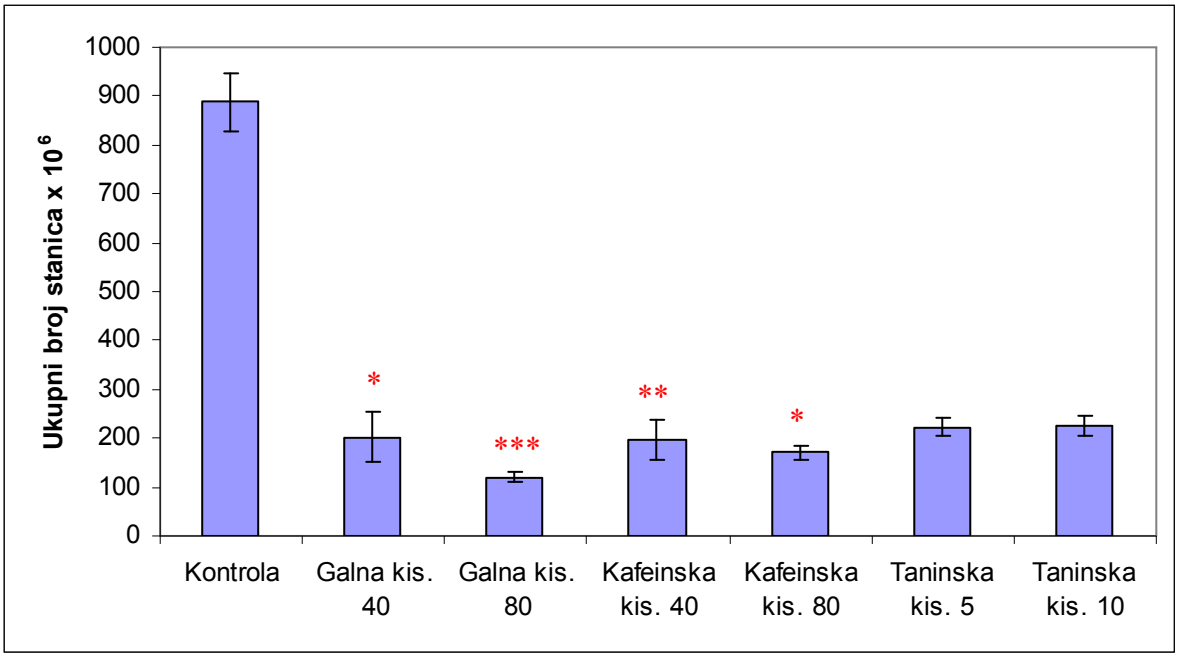
Analiza određivanja ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini ukazuje da je srednja vrijednost broja stanica statistički značajno smanjena kod primjene doza GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) te CA 40 mg/kg i CA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 43) tijekom 10 dana obrade miševa. Statistički značajne razlike postoje i između obrađenih skupina gdje CA 40 mg/kg i CA 80 mg/kg imaju značajno manje stanica od GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 10 mg/kg ($P < 0,05$).

Smanjenje broja stanica u peritonealnoj šupljini kod obrađenih skupina podudara se sa smanjenjem volumena peritonealne tekućine. Statistički značajne razlike kod obrade životinja u uznapredovaloj fazi rasta tumora postoje i prilikom smanjenja broja stanica u peritonealnoj šupljini u odnosu na kontrolu kod skupina GA 40 mg/kg, CA 80 mg/kg ($P < 0,05$); zatim kod CA 40 mg/kg ($P < 0,01$) te GA 80 mg/kg ($P < 0,001$) kao što je prikazano u Slici 44.



Slika 43. Ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=5-7) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); CA 40 mg *vs* KONTR.; CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (***$P < 0{,}001$) i između obrađenih skupina CA 40 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg; CA 80 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$); CA 40 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg; CA 80 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



Slika 44. Ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=5-7) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 40 mg/kg *vs* KONTR.; CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); CA 40 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$); GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (***$P < 0{,}001$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.1.5. Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine

Diferencijalnom analizom stanica iz peritonealne tekućine miševa nositelja EAT nisu uočene statističke značajne razlike u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) u postotnom udjelu tumorskih stanica, limfocita, neutrofila i eozinofila. Uočeno je povećanje stanica makrofaga kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu, s time da je najveće povećanje broja makrofaga i statistički značajno ($P < 0,05$) vidljivo kod primjene GA 80 mg/kg tijekom 10 dana (Tablica 20, Slika 45). Međutim, broj bazofila smanjuje se kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu, s time da je statistički značajno smanjenje uočeno kod primjene TA 5 mg/kg i TA 10 mg/kg tijekom 10 dana. Značajno povećanje postotnog udjela makrofaga u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) došlo je prilikom obrade miševa s TA 5 mg/kg. U Tablici 21, Slici 46 prikazani su rezultati diferencijalne analize stanica iz peritonealne tekućine dobiveni obradom miševa od 5. dana svaki drugi dan. Tu je vidljivo da manji broj obrađenih skupina ima povećanje broja stanica makrofaga u odnosu na kontrolu, ali je zato njihovo povećanje u pravilu znatno veće nego kod obrade tijekom 10 dana. Najveće povećanje postotnog udjela makrofaga nalazi se kod skupine GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu. Značajno povećanje postotnog udjela makrofaga uočeno je kod skupine TA 5 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$). Statistički značajno povećanje broja tumorskih stanica uočeno je kod CA 40 mg/kg u odnosu na CA 80 mg/kg i GA 40 mg/kg ($P < 0,05$), dok je kod svih ostalih skupina uočeno njihovo smanjenje u odnosu na kontrolu. Kod skupina GA 80 mg/kg i TA 5 mg/kg uočeno je smanjenje postotnog udjela makrofaga u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$). Statistički značajno povećanje broja neutrofila zapaženo je kod TA 5 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,01$).

Tablica 20. Učinak fenolnih kiselina na diferencijalnu analizu stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja EAT-a obrađenih 10X svaki dan.

Skupine[a]	Diferencijalna analiza stanica u ascitesu (X ± SP)					
	Tumorske stanice (%)	Limfociti (%)	Makrofagi (%)	Neutrofili (%)	Bazofili (%)	Eozinofili (%)
EAT kontrola	73,75±3,57	0,38±0,24	11,00±1,79	12,50±3,34	2,00±0,54	0,38±0,24
GA 40 mg/kg	66,63±9,58	0,38±0,24	12,63±2,95	18,63±9,73	1,13±0,66	0,63±0,31
GA 80 mg/kg	55,63±4,74	0,63±0,47	37,53±4,59*	5,25±1,45	0,38±0,24	0,63±0,24
CA 40 mg/kg	60,63±4,84	0,75±0,25	24,38±6,56	10,13±4,79	0,63±0,24	2,75±0,83
CA 80 mg/kg	66,63±5,25	0,63±0,24	24,13±6,96	5,00±3,39	0,75±0,48	2,88±0,52
TA 5 mg/kg	64,75±3,71	0,25±0,25	12,00±0,91♦	20,75±3,82	0,00±0,00*	0,50±0,50
TA 10 mg/kg	74,14±3,71	0,21±0,15	14,14±1,10	10,43±3,02	0,07±0,07*	1,00±1,00

[a] Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP.

* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (*$P < 0{,}05$);

♦ Statistički značajno različito u odnosu na GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SD** – standardna pogreška.

Tablica 21. Učinak fenolnih kiselina na diferencijalnu analizu stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja EAT-a obrađenih 4X svaki drugi dan.

Skupine[a]	Diferencijalna analiza stanica u ascitesu (X ± SP)					
	Tumorske stanice (%)	Limfociti (%)	Makrofagi (%)	Neutrofili (%)	Bazofili (%)	Eozinofili (%)
EAT kontrola	73,75±3,57	0,38±0,24	11,00±1,79	12,50±3,34	2,00±0,54	0,38±0,24
GA 40 mg/kg	50,63±3,78	0,25±0,14	44,50±3,61*	6,25±2,32	0,25±0,14	1,50±0,46
GA 80 mg/kg	71,00±3,69	0,38±0,24	10,13±2,01♦	17,00±3,90	0,75±0,32	0,75±0,32
CA 40 mg/kg	76,00±1,68♦,▲	0,00±0,00	12,50±1,74	11,13±2,07	0,25±0,14	0,13±0,13
CA 80 mg/kg	49,88±6,03	0,75±0,60	33,50±8,13	13,00±6,06	1,50±0,65	1,38±0,90
TA 5 mg/kg	56,81±4,12	0,44±0,20	10,94±1,92♦	31,31±2,92♦♦	0,25±0,13	0,25±0,19
TA 10 mg/kg	55,31±3,61	0,69±0,38	21,38±3,28	21,44±4,13	0,56±0,33	0,63±0,63

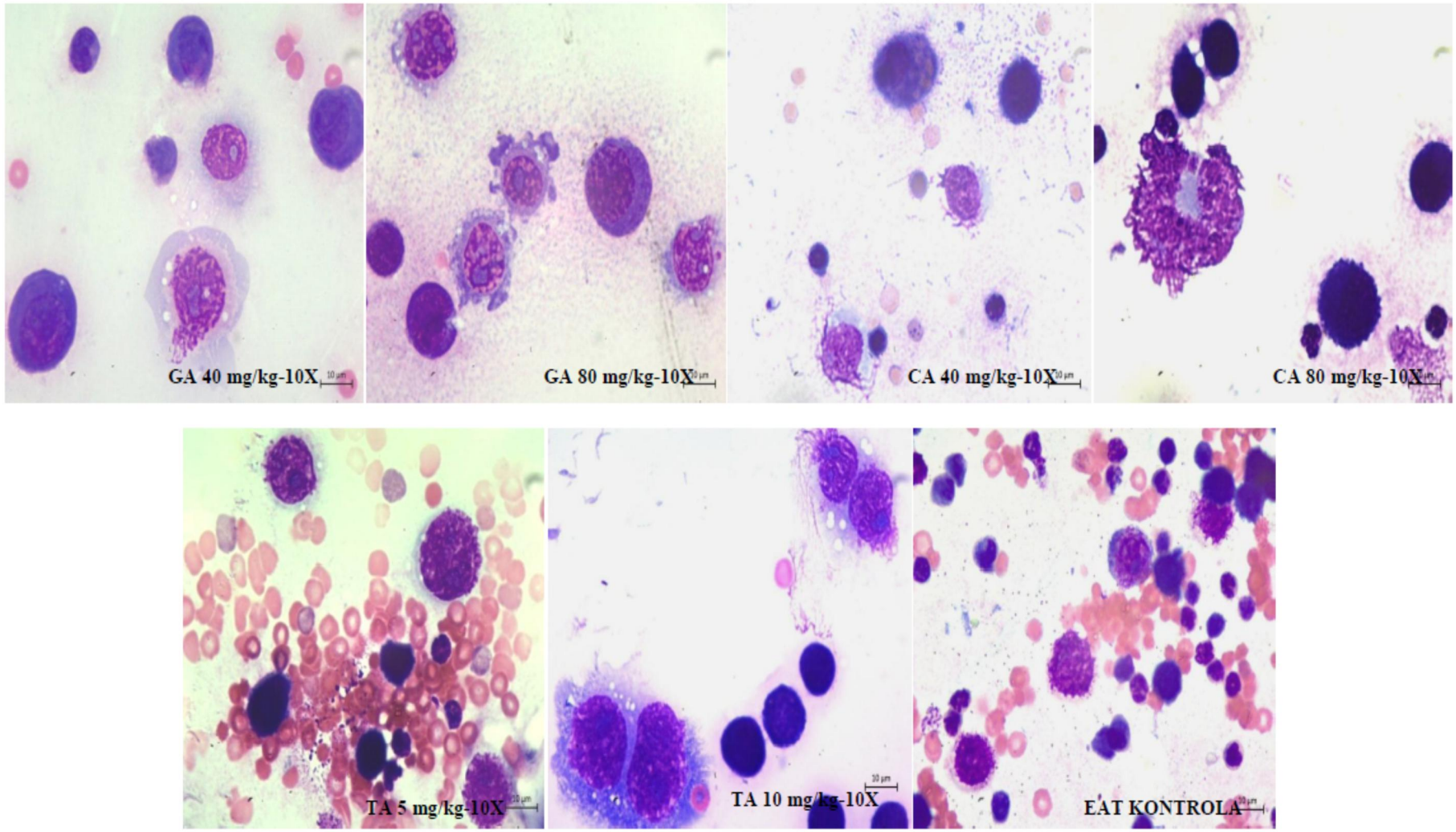
[a] Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP.

* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (*$P < 0{,}05$);

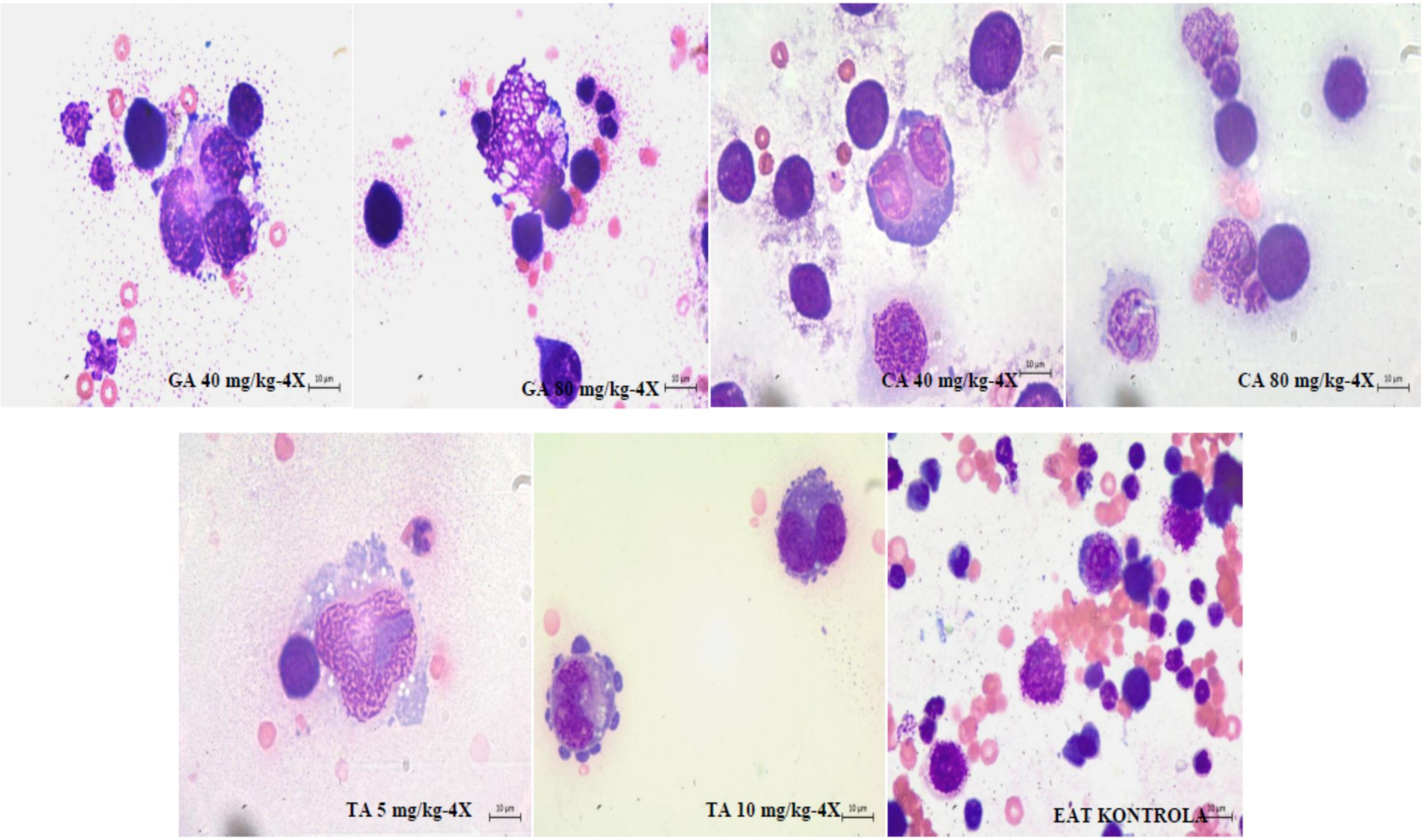
▲Statistički značajno različito u odnosu na CA 80 mg/kg (▲$P < 0{,}05$);

♦ Statistički značajno različito u odnosu na GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$; ♦♦$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SD** – standardna pogreška.



Slika 45. Diferencijalna analiza stanica u peritonealnoj tekućini miša nositelja EAT-a (kontrola) i obrađenih skupina (GA 40 mg/kg i 80 mg/kg; CA 40 mg/kg i 80 mg/kg; TA 5 mg/kg i 10 mg/kg) tijekom 10 dana (May Grünwald i Giemsa 1 000 X)



Slika 46. Diferencijalna analiza stanica u peritonealnoj tekućini miša nositelja EAT-a (kontrola) i obrađenih skupina (GA 40 mg/kg i 80 mg/kg; CA 40 mg/kg i 80 mg/kg; TA 5 mg/kg i 10 mg/kg) nakon 5. dana svaki drugi dan (May Grünwald i Giemsa 1 000 X)

4.2. PROTUUPALNI UČINAK FENOLNIH KISELINA

Upalni procesi često su povezani s kroničnim oboljenjima kod ljudi i životinja među koje između ostalog ubrajamo i pojavu raka i njegovu sposobnost metastaziranja budući da dolazi do narušavanja ravnoteže između oksidacijskog stresa izazvanog sve većom proizvodnjom reaktivnih vrsta kisika i/ili dušika i antioksidativne zaštite koju nam pružaju prirodni spojevi polifenola. Takvi spojevi ne samo da smanjuju trenutni upalni proces u organizmu, već dugoročno gledano sudjeluju u prevenciji brojnih drugih bolesti ponašajući se kao važni biološki imunomodulatori. Važna značajka polifenolnih sastavnica je njihovo imunomodulacijsko djelovanje, posebice nespecifična aktivacija makrofaga te pojačano lučenje različitih citokina kojima štite organizam u cijelosti kako od gubitka homeostaze tako i od pojave malignih oboljenja. Smatra se da lučenjem litičkih enzima, reaktivnih oblika kisika (H_2O_2) i dušika (NO) te čimbenika tumorske nekroze (TNF-α) izravno citotoksično djeluju prema tumorskim stanicama. Prema dosadašnjim istraživanjima polifenolne sastavnice uzrokuju proliferaciju splenocita, povećavaju izražaj IFN-γ, IL-2 i IL-6 u splenocitima, stimuliraju proizvodnju NO i TNF-α u peritonealnim makrofazima te povećavaju sposobnost fagocitiranja. Uz makrofage, limfociti također mogu lučiti protutumorske citokine poput TNF-α, IFN-γ kako bi inhibirali proliferaciju tumorskih stanica i inducirali njihovu apoptozu. Citokini IFN-γ, IL-12, te interferon-inducibilni protein 10 (IP-10) mogu inhibirati angiogenezu *in vivo* ili *in vitro*. IL-12 i IFN-γ također reguliraju izražaj VEGF tumora. Makrofagi su ključni regulatori imunosnog odgovora na tumor te svojim citokinima aktiviraju pomoćničke i citotoksične limfocite T koji oslobađanjem svojih citokina potiču aktivnost ne samo ostalih makrofaga već i stanica NK, te limfocita T i B.
Također, u brojnim kancerogenim stanjima pokazalo se je da postoji pojačano lučenje enzima COX-2 čijom se inhibicijom smanjuju simptomi upale i boli.

Stoga će nam kao pokazatelji upalnog odnosno protuupalnog učinka fenolnih kiselina u angiogenezi poslužiti analize mjerenja hematoloških i biokemijskih parametara u punoj krvi i serumu, uključujući broj leukocita, diferencijalne analize stanica u krvi, C-reaktivnog proteina i enzima, zatim mjerenje razine Th1/Th2/Th17 citokina dobivenih iz nadtaloga tumorskih stanica, praćenjem promjene koncentracije COX-2 u stimuliranim i nestimuliranim makrofagima ascitesa te stanicama tumora kao i mjerenje mase unutarnjih organa (bubrega, jetre i slezene) nakon žrtvovanja.

4.2.1. Hematološki pokazatelji u krvi

Analizom hematoloških i biokemijskih parametara krvi miševa koji su obrađeni s fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana te nakon 5. dana svaki drugi dan htjeli smo usporediti koji način obrade miševa više dovodi do promjena u sastavu krvi, ali i pojave stvaranja reaktivnih i toksičnih metabolita nakon primjene odgovarajućih doza. Od hematoloških parametara odredili smo ukupan broj eritrocita (**E**), leukocita (**L**) u perifernoj krvi uzetoj iz pazdušnog spleta krvnih žila, zatim hemoglobin (**Hgb)**, hematokrit (**Hct**), prosječni volumen eritrocita (**MCV**), prosječnu količinu hemoglobina u eritrocitima (**MCH**), prosječnu koncentraciju hemoglobina u eritrocitima (**MCHC)**, raspodjelu eritrocita po veličini (**RDW**), broj trombocita (**Trc)** te prosječan volumen trombocita (**MPV**) (Tablice 22-23). Također je određen i udio svih leukocitnih stanica (monocita/makrofaga, limfocita, neutrofila, eozinofila i bazofila).

Kod obrade miševa s fenolnim kiselinama tijekom 10 dana uočeno je da kod svih obrađenih skupina dolazi do povećanja broja eritrocita, osim kod skupine obrađene s TA 5 mg/kg gdje je vidljivo statistički značajno smanjenje broja eritrocita u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) (Tablica 22). To smanjenje broja eritrocita kod skupine TA 5 mg/kg podudara se sa statističkim značajnim smanjenjem udjela hemoglobina ($P < 0,01$) i hematokrita ($P < 0,05$) u odnosu na GA 40 mg/kg. Statistički značajno smanjenje prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitima vidljivo je kod skupine TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Što se tiče promjene broja leukocita kod obrađenih skupina nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ili između obrađenih skupina, ali vidljivo je da gotovo kod svih skupina dolazi do njihovog povećanja u odnosu na kontrolu, osim kod skupine CA 40 mg/kg gdje dolazi do smanjenja broja leukocita. U Tablici 23 prikazani su rezultati obrade miševa fenolnim kiselinama 4 puta svaki drugi dan gdje zapravo nije uočena nikakva statistička značajnost iako je vidljivo povećanje broja leukocita, eritrocita, hemoglobina i hematokrita kod obrađenih skupina. Kod analize diferencijalne krvne slike miševa obrađenih 10 puta uočeno je statističko smanjenje broja eozinofila kod TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Tablica 24), dok kod obrade miševa 4 puta svaki drugi dan nisu uočene nikakve statistički značajne razlike (Tablica 25). Nadalje, u svim obrađenim skupinama životinja vidljivo je povećanje apsolutnog broja limfocita i monocita tijekom obrade 10 dana (Slika 47), dok je kod obrade životinja svaki drugi dan vidljivo povećanje broja neutrofila (Slika 48) iako u oba slučaja ne postoje statistički značajne razlike.

Tablica 22. Učinak fenolnih kiselina na hematološke pokazatelje u krvi miševa nositelja EAT-a obrađenih 10X svaki dan.

Skupine[a]	Hematološki pokazatelji (X ± SP)									
	L (10^9/ L)	E (10^{12}/ L)	Hgb (g /L)	Hct (L/ L)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g /L)	RDW (%)	Trc (10^9 /L)	MPV (fL)
EAT kontrola	5,48±2,95	7,08±0,39	112,95±5,20	0,37±0,02	104,75±0,46	31,95±0,34	610,50±5,32	14,23±0,56	1262,50±240,70	8,70±3,33
GA 40 mg/kg	13,77±2,64	9,05±0,45	144,45±7,15	0,48±0,02	105,40±1,38	32,00±0,29	606,50±5,50	13,80±0,68	1461,00±26,71	12,78±4,10
GA 80 mg/kg	8,33±3,36	7,58±0,43	121,40±7,40	0,40±0,02	106,30±1,17	32,00±0,42	602,00±4,32	15,00±0,37	1081,00±319,15	5,63±0,40
CA 40 mg/kg	4,82±0,77	7,62±0,38	120,85±5,64	0,40±0,02	105,15±0,85	31,75±0,25	603,50±4,99	14,25±1,39	1115,00±297,39	5,49±0,17
CA 80 mg/kg	18,40±5,66	7,77±1,08	121,80±15,81	0,41±0,05	106,30±1,63	31,45±0,31	592,00±4,83	17,15±1,24	1397,50±154,37	8,97±3,48
TA 5 mg/kg	19,90±5,21	5,90±0,44♦	85,00±6,45♦♦	0,32±0,02♦	107,60±0,98	28,75±0,30	535,00±8,23*	11,20±0,35	743,50±105,56	6,25±0,31
TA 10 mg/kg	6,75±1,61	7,98±0,32	126,75±5,19	0,42±0,02	104,60±1,18	31,80±0,22	608,50±4,92	13,70±0,23	1234,50±139,14	5,36±0,24

[a] Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP.
* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (*$P < 0{,}05$);
♦ Statistički značajno različito u odnosu na GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$); (♦♦$P < 0{,}01$).

Kratice: GA – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **L** – leukociti; **E** – eritrociti; **Hgb** – hemoglobin; **Hct** – hematokrit; **MCV** – prosječni volumen eritrocita; **MCH** – prosječna količina hemoglobina u eritrocitima; **MCHC** – prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; **RDW** – raspodjela eritrocita po veličini; **Trc** –trombociti; **MPV** – prosječan volumen trombocita; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

Tablica 23. Učinak fenolnih kiselina na hematološke pokazatelje u krvi miševa nositelja EAT-a obrađenih 4X svaki drugi dan.

Skupine[a]	Hematološki pokazatelji (X ± SP)									
	L (10^9/ L)	E (10^{12}/ L)	Hgb (g /L)	Hct (L/ L)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g /L)	RDW (%)	Trc (10^9 /L)	MPV (fL)
EAT kontrola	5,48±2,95	7,08±0,39	112,95±5,20	0,37±0,02	104,75±0,46	31,95±0,34	610,50±5,32	14,23±0,56	1262,50±240,70	8,70±3,33
GA 40 mg/kg	13,35±7,01	8,80±0,26	137,70±3,47	0,45±0,02	102,30±1,90	31,35±0,36	613,00±16,66	15,20±1,70	1560,50±120,08	5,86±0,10
GA 80 mg/kg	7,08±3,25	8,58±0,26	135,80±4,85	0,45±0,01	104,00±0,79	31,65±0,21	608,50±4,43	13,80±0,61	1735,00±232,92	9,06±3,64
CA 40 mg/kg	5,52±1,29	8,12±0,38	127,80±5,40	0,42±0,02	104,15±1,95	31,45±0,40	605,50±3,86	13,78±0,59	1922,00±179,08	5,36±0,14
CA 80 mg/kg	6,75±2,32	7,73±0,78	121,50±10,49	0,40±0,03	103,85±2,05	31,65±0,66	608,50±0,96	14,43±0,94	1929,00±270,81	8,04±2,68
TA 5 mg/kg	4,79±1,42	7,47±0,48	120,80±7,46	0,40±0,02	107,40±2,16	32,40±0,31	602,67±7,51	14,70±0,81	1676,00±64,84	9,48±3,91
TA 10 mg/kg	9,17±2,62	8,42±0,23	134,45±4,15	0,44±0,01	104,40±0,47	31,95±0,22	611,50±2,50	14,95±0,41	1325,50±193,10	9,20±3,94

[a] Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: GA – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **L** – leukociti; **E** – eritrociti; **Hgb** – hemoglobin; **Hct** – hematokrit; **MCV** – prosječni volumen eritrocita; **MCH** – prosječna količina hemoglobina u eritrocitima; **MCHC** – prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; **RDW** – raspodjela eritrocita po veličini; **Trc** –trombociti; **MPV** – prosječan volumen trombocita; **SV** – srednja vrijednost; **SP** –standardna pogreška.

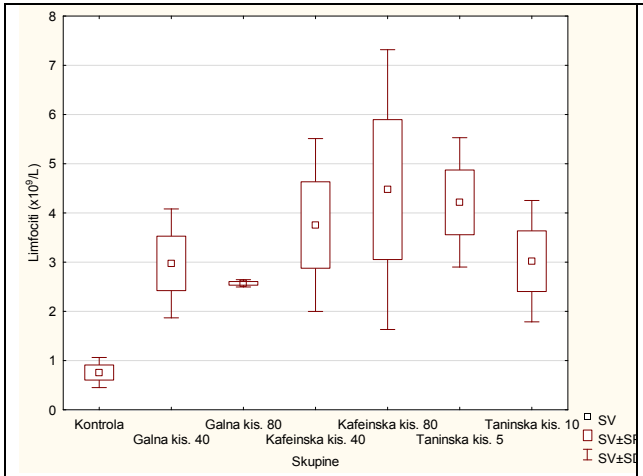
Tablica 24. Učinak fenolnih kiselina na diferencijalnu krvnu sliku u miševa nositelja EAT-a obrađenih 10X svaki dan.

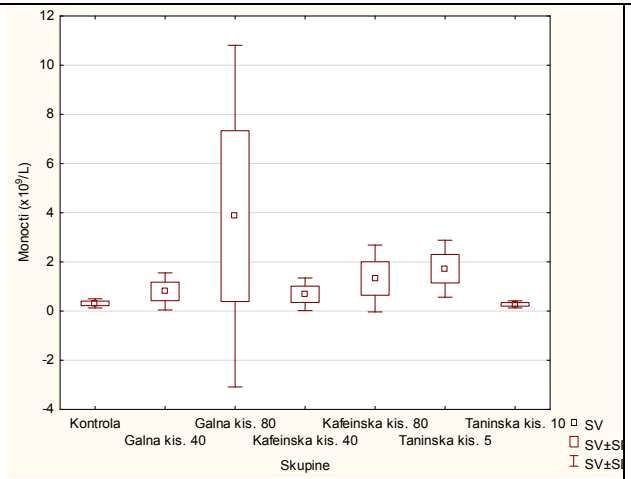
Skupine[a]	Diferencijalna krvna slika (X ± SP)				
	Limfociti (%)	Monociti (%)	Neutrofili (%)	Bazofili (%)	Eozinofili (%)
EAT kontrola	36,80±17,60	10,33±4,83	47,11±22,61	2,94±1,10	2,79±1,25
GA 40 mg/kg	24,38±5,50	5,13±1,78	68,90±4,19	1,09±0,47	0,51±0,09
GA 80 mg/kg	46,78±14,17	27,08±17,80	22,79±13,54	1,98±1,02	1,41±0,39
CA 40 mg/kg	76,00±8,26	16,47±8,01	4,68±2,07	1,41±1,09	1,44±0,13
CA 80 mg/kg	31,48±13,24	6,61±1,96	60,70±12,70	0,79±0,22	0,43±0,15
TA 5 mg/kg	25,55±5,63	11,38±5,98	62,80±9,81	0,03±0,03	0,25±0,16*
TA 10 mg/kg	50,05±9,91	5,58±3,01	40,83±13,76	2,14±1,26	1,40±0,20

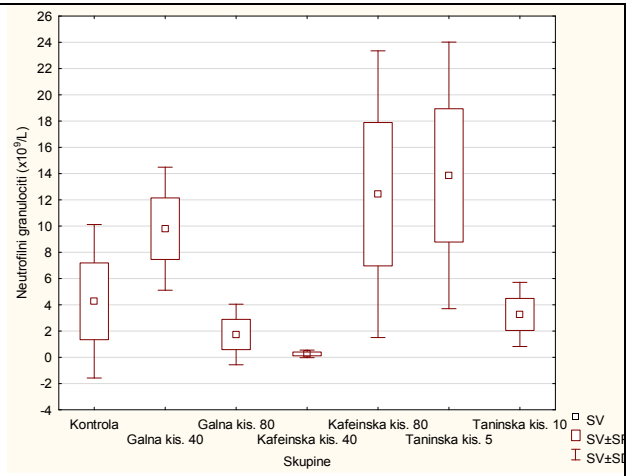
[a] Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP.

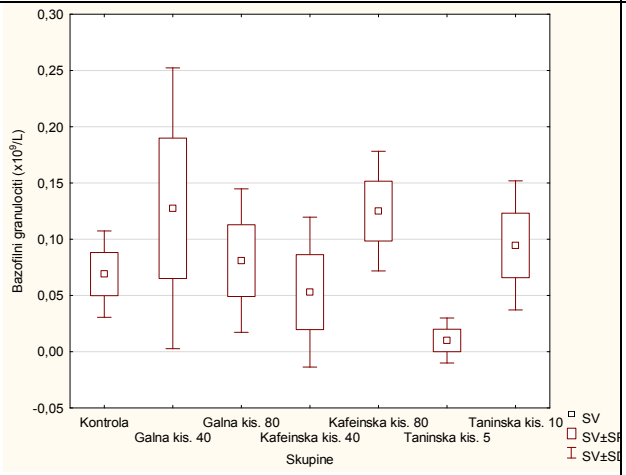
* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (*$P < 0{,}05$).

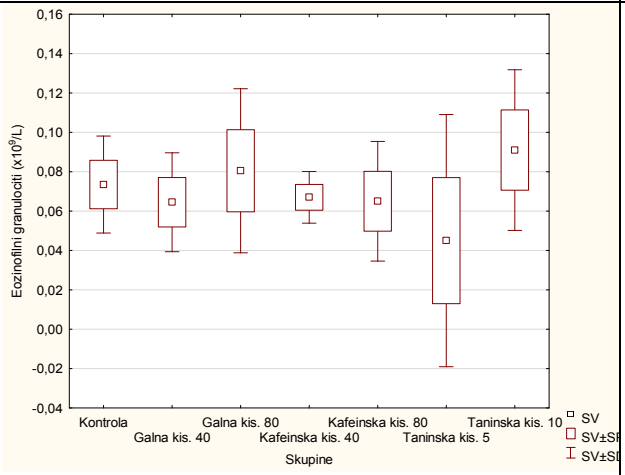
Kratice: GA – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.











Slika 47. Učinak fenolnih kiselina na apsolutni broj pojedinih leukocitnih stanica krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih 10X svaki dan.

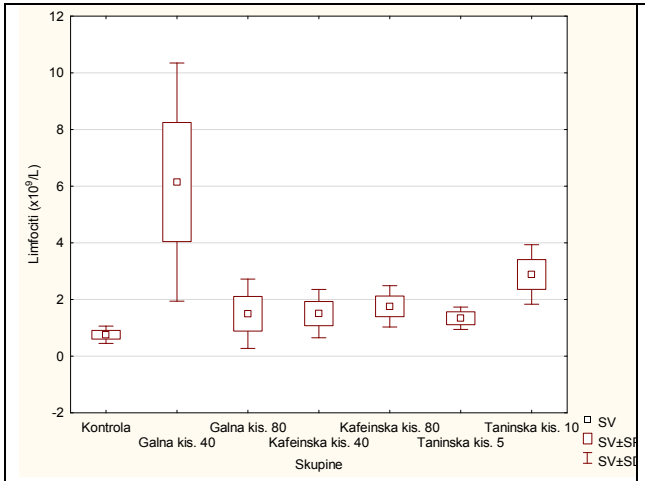
Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SD.

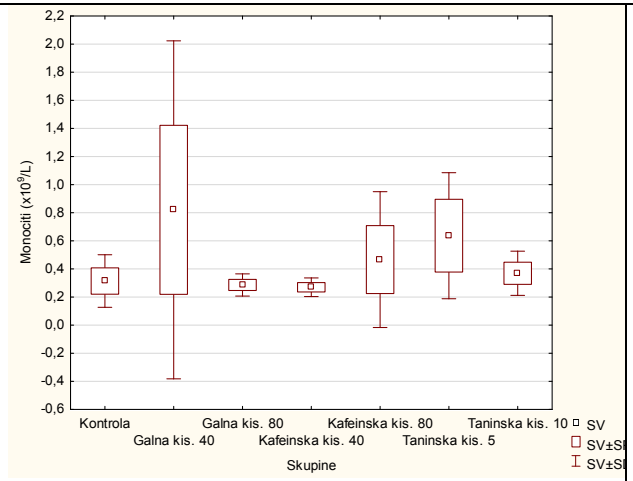
Tablica 25. Učinak fenolnih kiselina na diferencijalnu krvnu sliku u miševa nositelja EAT-a obrađenih 4X svaki drugi dan.

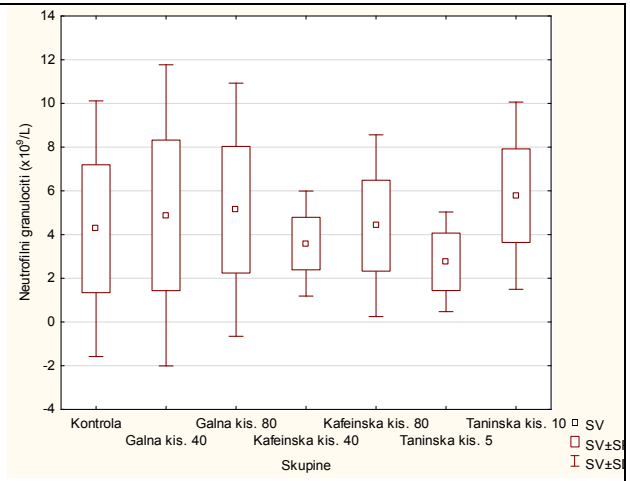
Skupine[a]	Diferencijalna krvna slika (X ± SP)				
	Limfociti (%)	Monociti (%)	Neutrofili (%)	Bazofili (%)	Eozinofili (%)
EAT kontrola	36,80±17,60	10,33±4,83	47,11±22,61	2,94±1,10	2,79±1,25
GA 40 mg/kg	61,28±17,25	4,07±1,62	28,32±15,55	5,71±3,48	0,61±0,24
GA 80 mg/kg	30,33±17,76	5,72±1,33	59,87±19,56	2,03±1,05	2,05±0,84
CA 40 mg/kg	33,93±13,25	6,37±2,37	55,41±17,44	1,76±0,42	2,52±1,83
CA 80 mg/kg	36,55±15,68	8,47±4,42	52,15±17,38	1,54±1,15	1,32±0,40
TA 5 mg/kg	34,10±13,32	15,35±7,26	49,06±20,41	0,15±0,08	1,34±0,29
TA 10 mg/kg	42,23±14,21	5,54±1,92	50,40±16,47	0,74±0,33	1,08±0,55

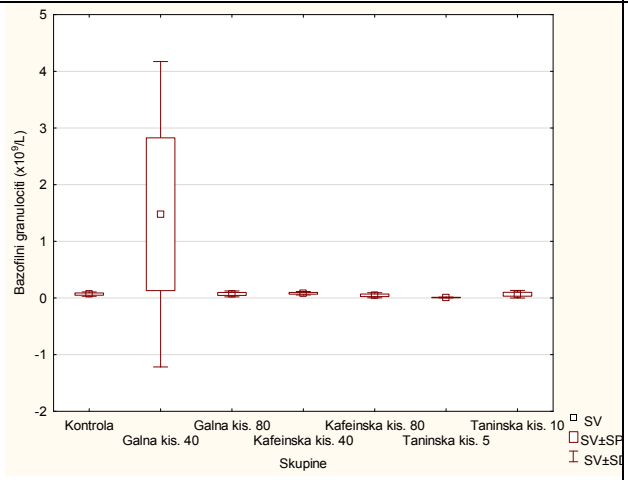
[a] Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

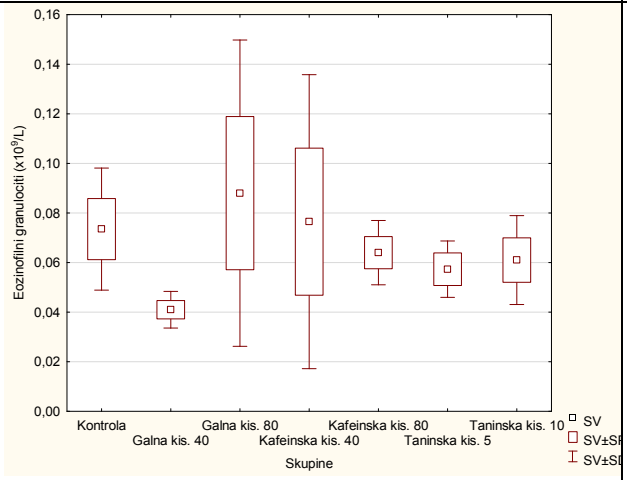
Kratice: GA – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.











Slika 48. Učinak fenolnih kiselina na apsolutni broj pojedinih leukocitnih stanica krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih 4X svaki drugi dan.

Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SD.

4.2.2. Biokemijski pokazatelji u serumu

Od biokemijskih parametara analizirali smo sljedeće enzime: aspartat aminotransferazu (**AST**), alanin aminotransferazu (**ALT**), laktat dehidrogenazu (**LDH**) i amilazu (**AMS**) (Tablice 26-27), zatim od proteina, metabolita i supstrata odredili smo C-reaktivni protein (**CRP)**, glukozu (**GLU**), ureju i ukupni bilirubin (Tablice 28-29).

Prateći biokemijske parametre utvrdili smo da nema statistički značajne razlike u aktivnosti enzima u krvi kod obrađenih skupina tijekom 10 dana u odnosu na kontrolu iako je kod većine obrađenih skupina došlo do povećanja koncentracije aspartat aminotransferaze, a istovremeno do smanjenja koncentracije alanin aminotransferaze, laktat dehidrogenaze i amilaze u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 26). Kod obrade miševa nakon 5. dana svaki drugi dan također nisu uočene statističke značajne razlike, iako je vidljivo da kod većeg broja obrađenih skupina dolazi do povećanja koncentracija većine enzima u odnosu na kontrolu (Tablica 27). Kod biokemijske analize proteina, metabolita i supstrata također nisu uočene statističke značajne razlike niti kod jednog načina obrade životinja (Tablice 28-29).

Tablica 26. Učinak fenolnih kiselina na enzimske biokemijske pokazatelje u krvi miševa nositelja EAT-a obrađenih 10X svaki dan.

Skupine[a]	Biokemijski pokazatelji-enzimi (X ± SP)			
	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	Amilaza (U/L)
EAT kontrola	421,25±43,27	381,25±109,02	12672,50±1865,48	3077,50±142,16
GA 40 mg/kg	416,25±66,75	286,25±113,27	9345,00±1808,70	2733,75±197,87
GA 80 mg/kg	480,00±134,09	160,00±42,75	9819,00±3564,51	2458,00±143,67
CA 40 mg/kg	416,67±83,48	269,17±138,81	8249,17±3156,50	2970,83±152,25
CA 80 mg/kg	476,67±85,85	276,67±138,60	10348,33±2690,87	2950,00±371,36
TA 5 mg/kg	461,25±87,66	665,00±157,99	10827,50±2327,21	2410,00±31,82
TA 10 mg/kg	484,62±88,53	231,15±48,90	6426,54±405,92	2838,08±136,95

[a] Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: GA – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **AST** – aspartat aminotransferaza; **ALT** – alanin aminotransferaza; **LDH** – laktat dehidrogenaza; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

Tablica 27. Učinak fenolnih kiselina na enzimske biokemijske pokazatelje u krvi miševa nositelja EAT-a obrađenih 4X svaki drugi dan.

Skupine[a]	Biokemijski pokazatelji-enzimi (X ± SP)			
	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	Amilaza (U/L)
EAT kontrola	421,25±43,27	381,25±109,02	12672,50±1865,48	3077,50±142,16
GA 40 mg/kg	598,75±132,07	922,50±151,72	12773,75±2824,48	3132,50±365,00
GA 80 mg/kg	545,00±174,24	1338,75±632,80	17973,75±8338,11	3095,00±568,94
CA 40 mg/kg	392,50±86,81	406,25±281,45	8118,75±3206,97	3320,00±79,69
CA 80 mg/kg	431,67±121,81	451,67±361,67	9480,00±4747,43	3531,67±352,72
TA 5 mg/kg	593,75±68,29	1221,25±221,42	14648,75±1457,53	2516,25±301,26
TA 10 mg/kg	475,00±78,61	683,75±193,20	10385,00±1787,02	3335,00±223,55

[a] Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: GA – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **AST** – aspartat aminotransferaza; **ALT** – alanin aminotransferaza; **LDH** – laktat dehidrogenaza; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

Tablica 28. Učinak fenolnih kiselina na metabolite, proteine i supstrate u krvi miševa nositelja EAT-a obrađenih 10X svaki dan.

Skupine[a]	Biokemijski pokazatelji – proteini, metaboliti i supstrati (X ± SP)			
	CRP (mg/ L)	GLU (mmol/ L)	UREJA (mmol/L)	Ukupni bilirubin (mmol /L)
EAT kontrola	0,38±0,13	4,00±0,58	5,50±0,35	0,00±0,00
GA 40 mg/kg	0,75±0,60	5,25±1,45	4,13±0,38	0,00±0,00
GA 80 mg/kg	0,00±0,00	4,10±0,37	7,00±0,50	1,00±1,00
CA 40 mg/kg	0,25±0,11	7,67±1,53	4,83±0,67	0,83±0,83
CA 80 mg/kg	0,00±0,00	3,67±0,44	6,83±0,33	1,67±1,67
TA 5 mg/kg	0,38±0,13	4,75±0,32	6,25±0,75	1,25±1,25
TA 10 mg/kg	0,31±0,07	4,54±0,49	6,00±0,78	2,31±0,72

[a] Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: GA – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **CRP** – C-reaktivni protein; **GLU** – glukoza; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

Tablica 29. Učinak fenolnih kiselina na metabolite, proteine i supstrate u krvi miševa nositelja EAT-a obrađenih 4X svaki drugi dan.

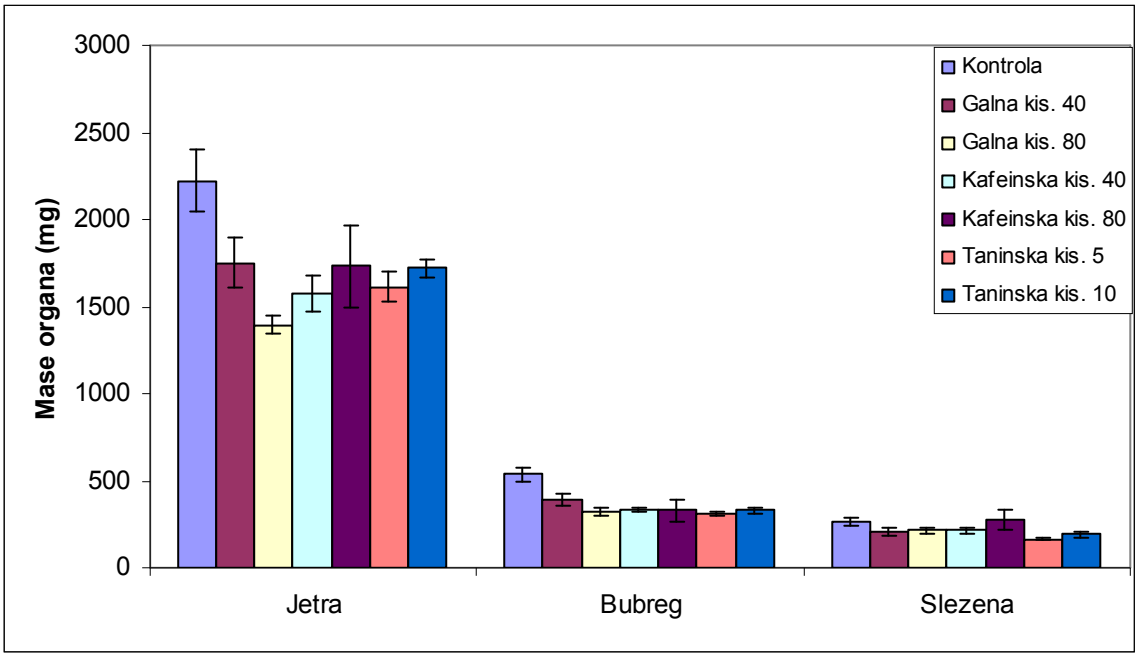
Skupine[a]	Biokemijski pokazatelji – proteini, metaboliti i supstrati (X ± SP)			
	CRP (mg/L)	GLU (mmol/L)	UREJA (mmol/L)	Ukupni bilirubin (mmol/L)
EAT kontrola	0,38±0,13	4,00±0,58	5,50±0,35	0,00±0,00
GA 40 mg/kg	0,38±0,13	8,13±0,90	6,88±0,90	1,25±1,25
GA 80 mg/kg	0,38±0,13	4,88±1,39	6,38±1,77	1,25±1,25
CA 40 mg/kg	0,38±0,13	8,13±2,19	6,50±0,79	1,25±1,25
CA 80 mg/kg	0,33±0,17	9,00±3,06	6,17±0,93	3,33±1,67
TA 5 mg/kg	0,25±0,14	4,25±0,95	7,50±0,74	3,75±2,39
TA 10 mg/kg	0,38±0,13	3,25±0,25	5,75±0,92	2,50±1,44

[a] Miševi (N = 4) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: GA – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **CRP** – C-reaktivni protein; **GLU** – glukoza; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

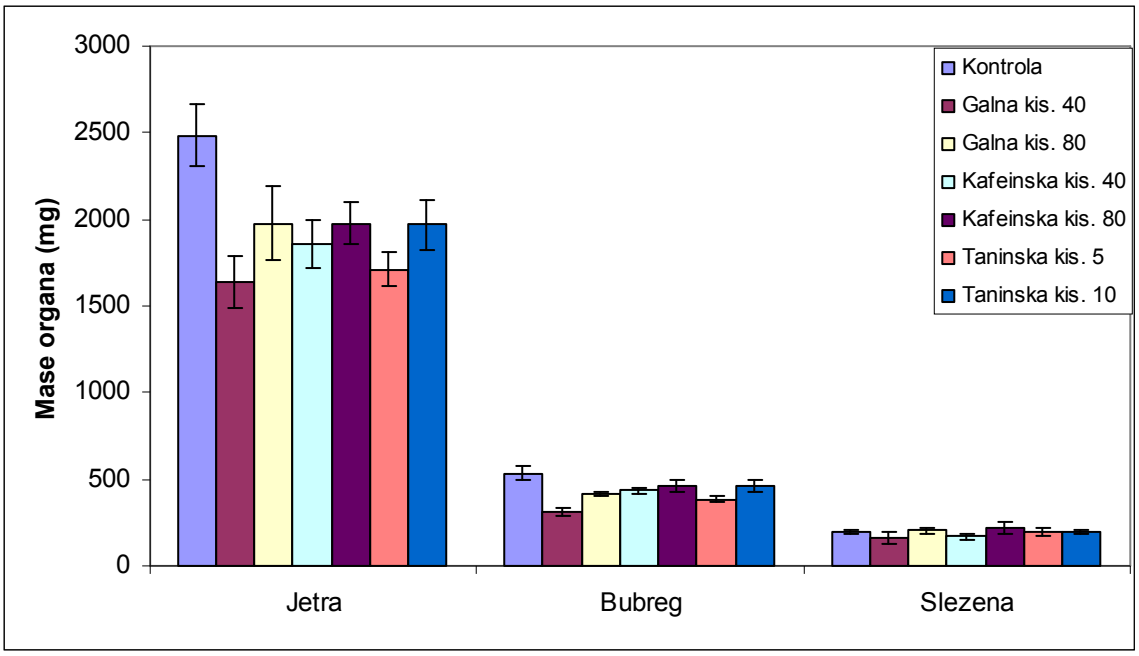
4.2.3. Promjena mase unutarnjih organa

Praćenjem promjene mase organa bubrega, jetre i slezene kod skupina obrađenih tijekom 10 dana uočeno je njihovo smanjenje u odnosu na kontrolu, s time da je ta pojava najviše izražena kod jetre, a najmanje kod slezene (Slika 51). Statistički značajno smanjenje mase bubrega u odnosu na kontrolu uočeno je kod CA 80 mg/kg ($P < 0,05$), a kod jetre i slezene kod GA 80 mg/kg ($P < 0,05$). Slična pojava smanjenja mase organa vidljiva je i kod miševa koji su obrađeni fenolnim kiselinama od 5. dana svaki drugi dan (Slika 52). Najveće smanjenje mase svih organa vidljivo je kod skupine GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu kod obrade životinja svaki drugi dan, dok se kod obrade životinja tijekom 10 dana to odnosi na skupinu GA 80 mg/kg za jetru te TA 5 mg/kg za bubreg i slezenu.



Slika 49. Promjene mase organa (bubreg, jetra i slezena) nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: bubreg CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$); jetra GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$); slezena GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$) i između obrađenih skupina: slezena CA 40 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦♦$P < 0,01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.



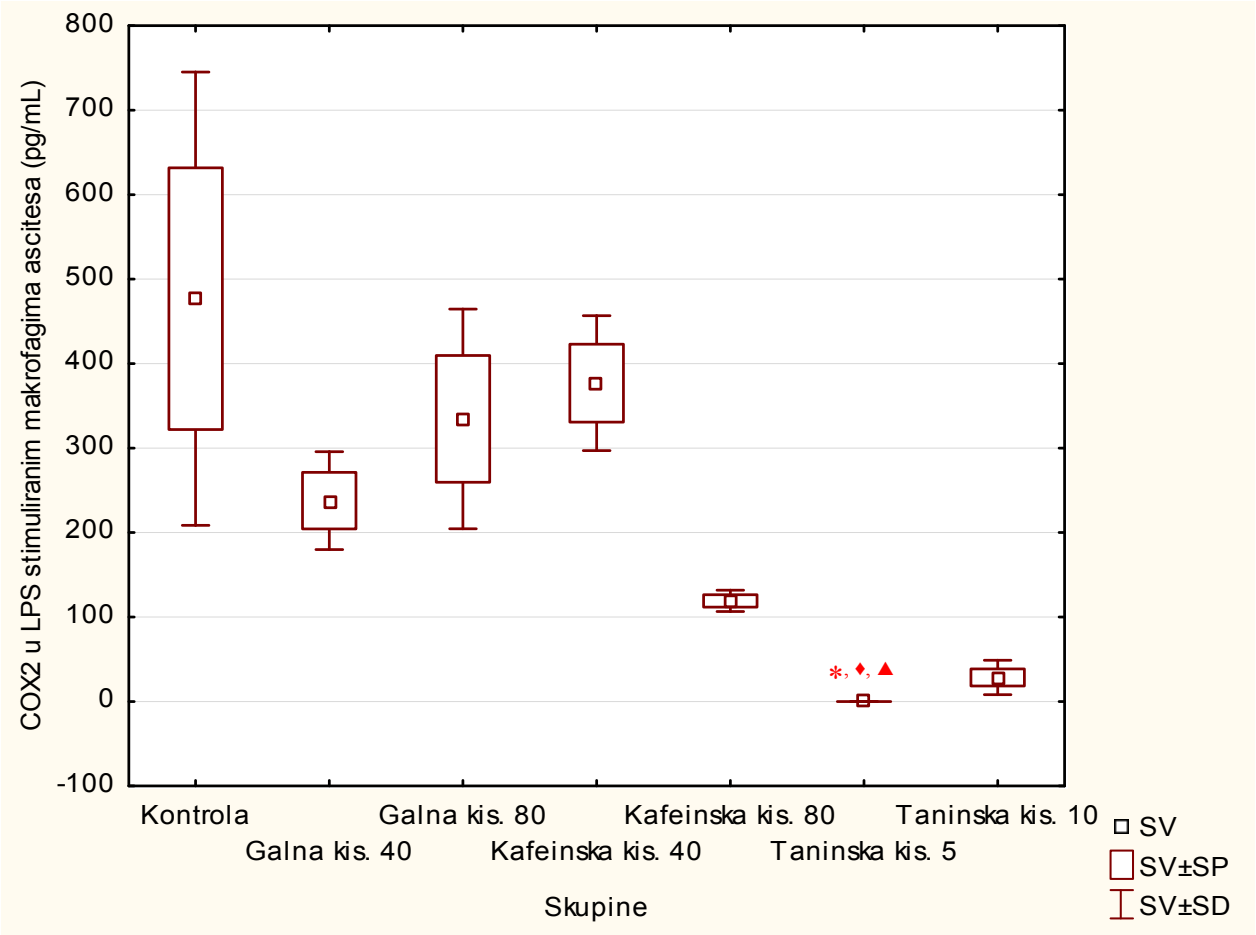
Slika 50. Promjene mase organa (bubreg, jetra i slezena) nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: bubreg GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: bubreg CA 80 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$); bubreg CA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$); jetra CA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$); slezena CA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

4.2.4. Koncentracija ciklooksigenaze 2 (COX-2) u uzorcima

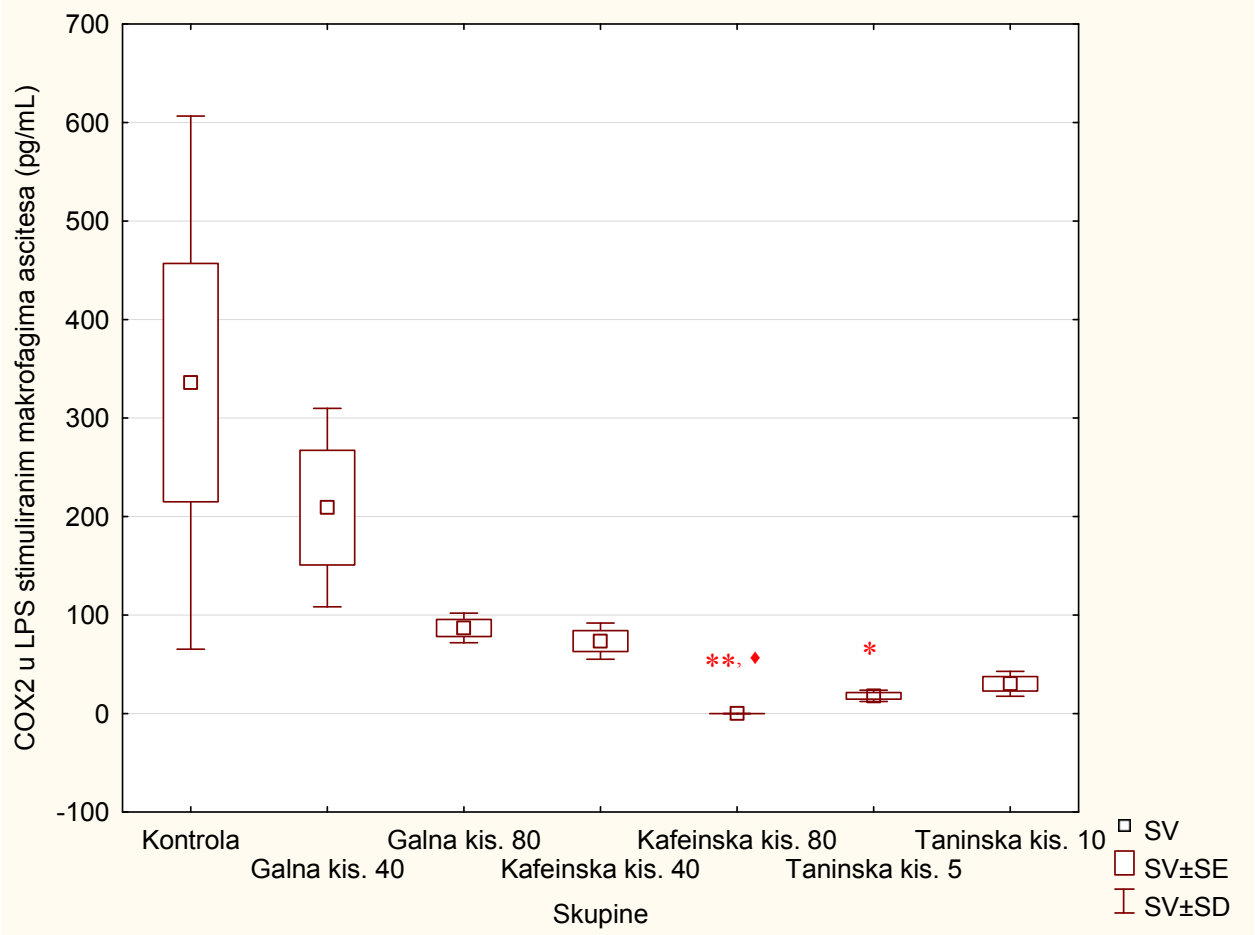
4.2.4.1. Koncentracija COX-2 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa

Rezultati određivanja koncentracije COX-2 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa pokazuju značajno smanjenje koncentracije COX-2 kod TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), kod TA 5 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 5 mg/kg u odnosu na CA 40 mg/kg ($P < 0,05$) tijekom 10 dana obrade tumora (Slika 51) premda je i kod ostalih obrađenih skupina zamijećeno smanjenje koncentracije COX-2 u odnosu na kontrolu. Slično opažanje uočeno je i prilikom obrade životinja 4X svaki drugi dan gdje je značajno niža koncentracija COX-2 uočena kod TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) i CA 80 mg/kg ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolu te između obrađenih skupina CA 80 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) što je prikazano u Slici 52.



Slika 51. Koncentracija COX-2 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$), TA 5 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg (▲$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

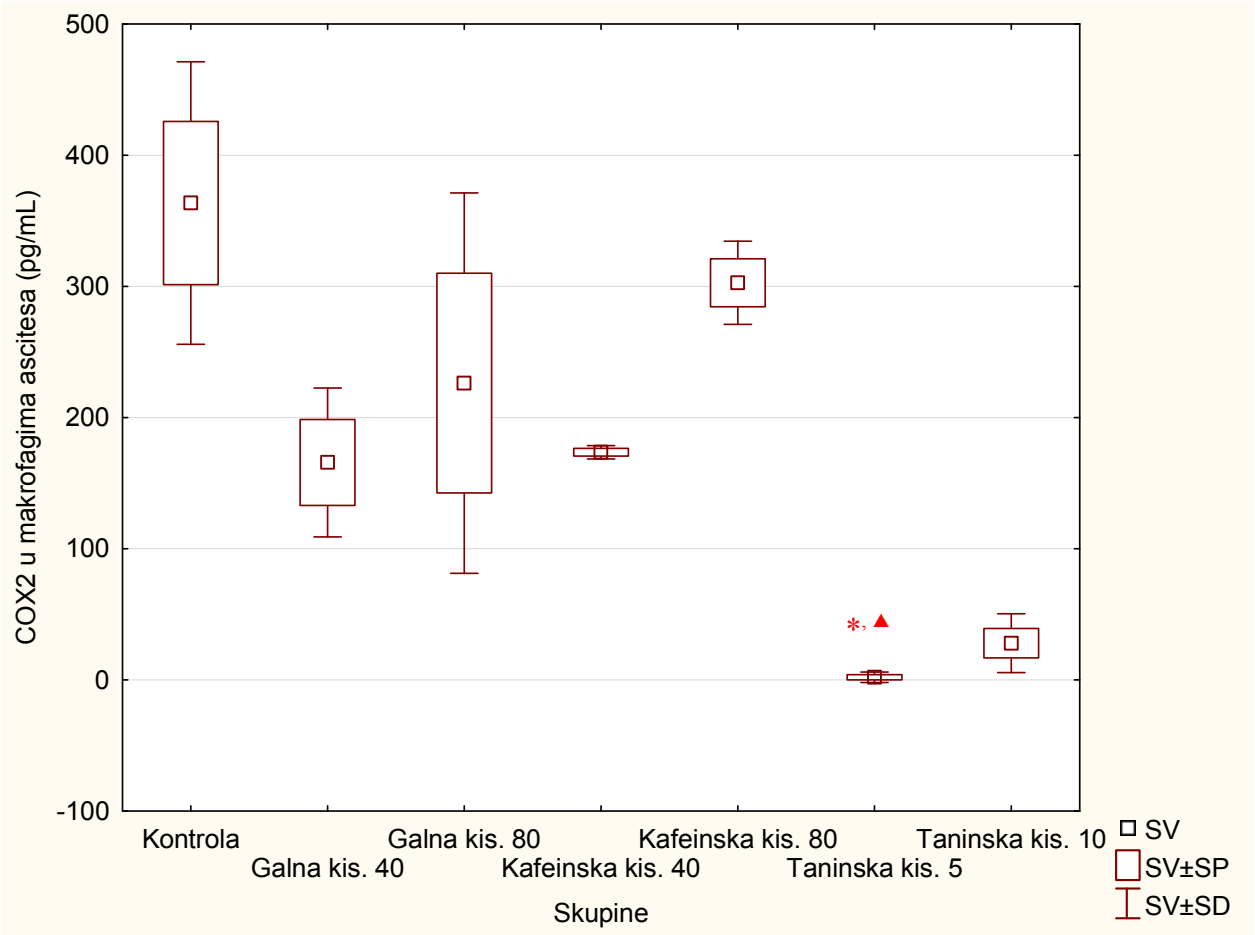


Slika 52. Koncentracija COX-2 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$) i između obrađenih skupina: CA 80 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

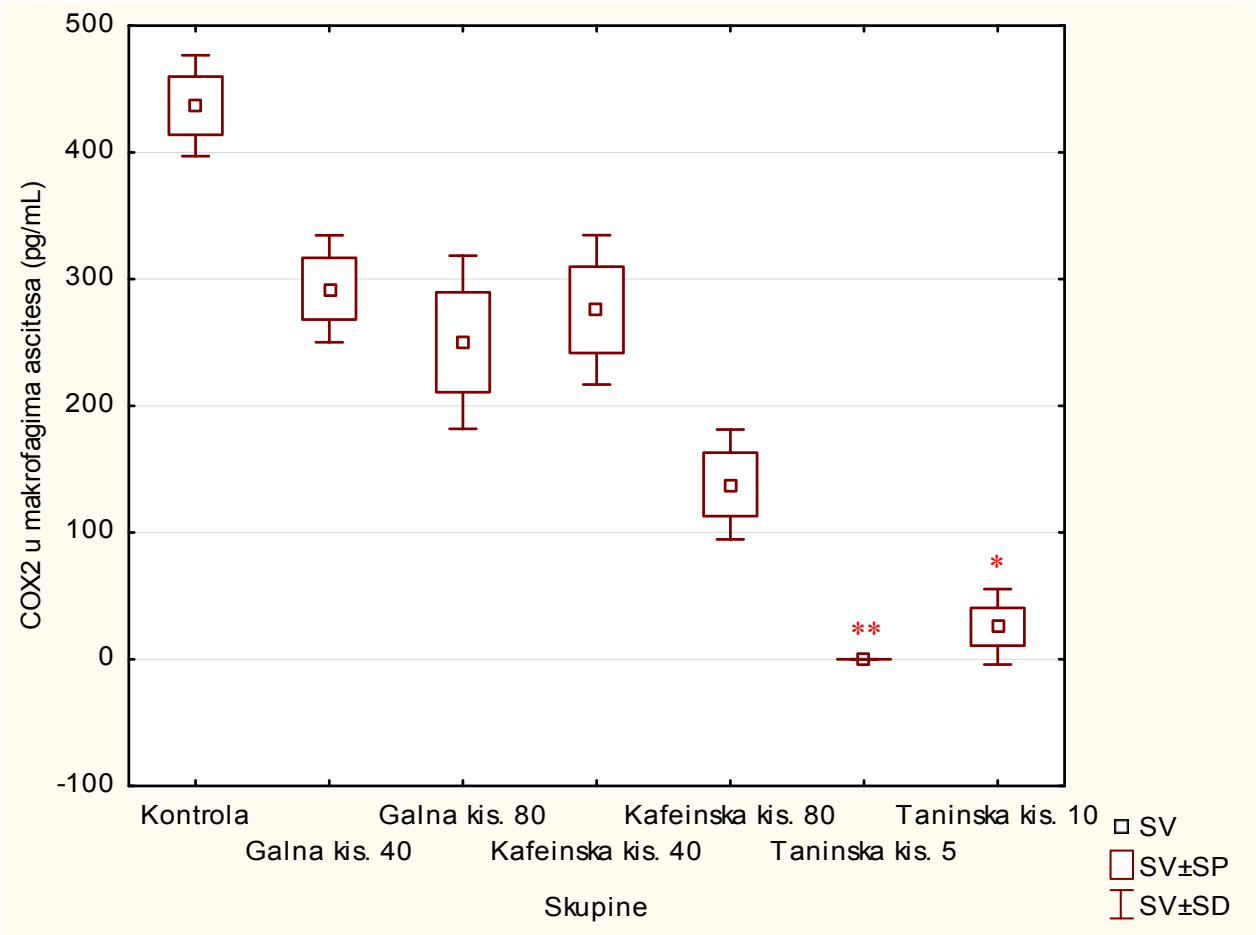
4.2.4.2. Koncentracija COX-2 u nestimuliranim makrofagima ascitesa

U uzorcima nestimuliranih makrofaga ascitesa određena je koncentracija COX-2 ELISA metodom iz čega je vidljivo da dolazi do smanjenja koncentracije COX-2 kod TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) te TA 5 mg/kg u odnosu na CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) nakon dugotrajne obrade tumora (10X) (Slika 53). Vrijednosti koncentracija COX-2 smanjene su i prilikom obrade tumora 4X svaki drugi dan kod svih obrađenih skupina, s time da je statistički značajno smanjenje koncentracije COX-2 vidljivo jedino kod TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 5 mg/kg ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolu što je prikazano na Slici 54.



Slika 53. Koncentracija COX-2 u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* CA 80 mg/kg (▲$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

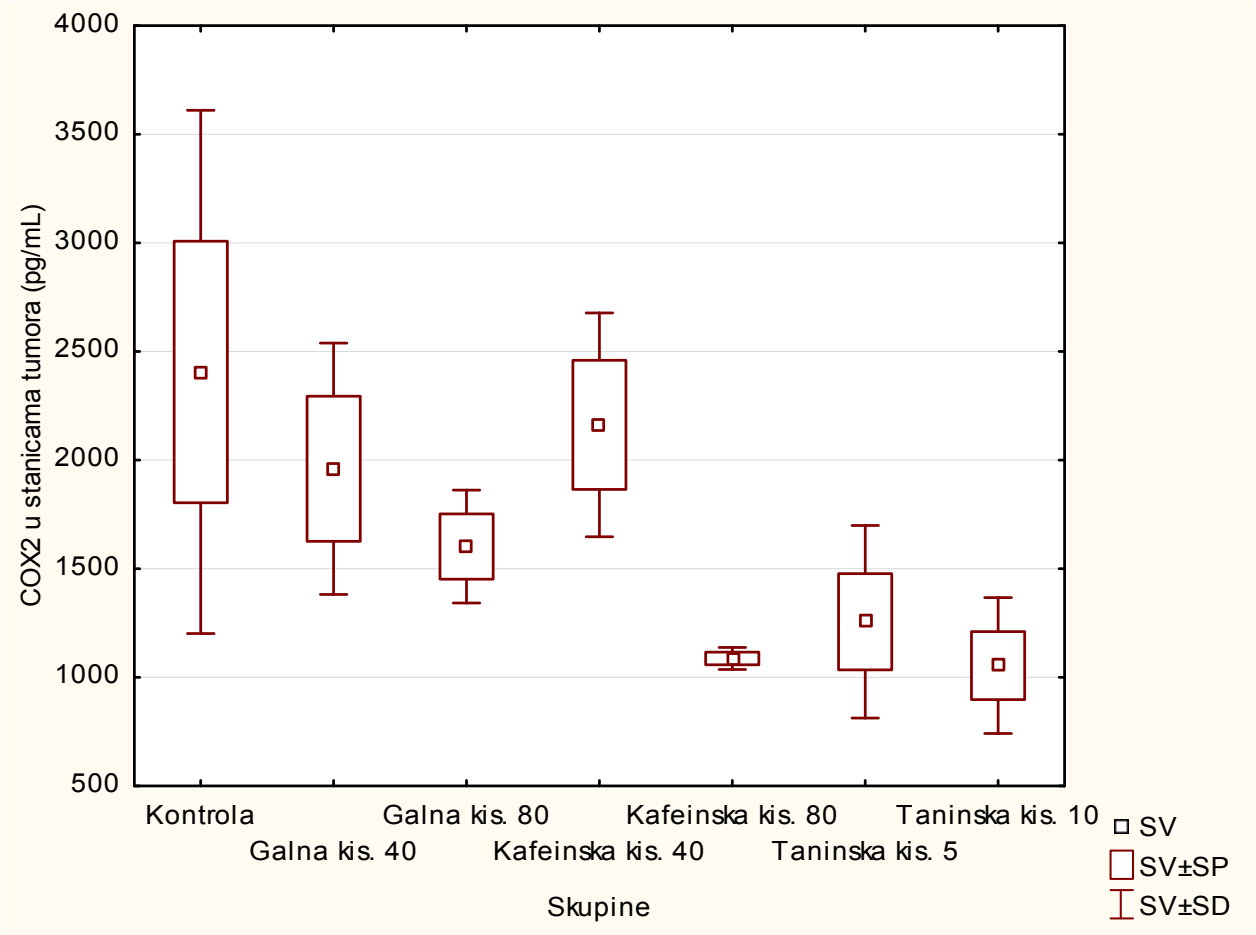


Slika 54. Koncentracija COX-2 u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.2.4.3. Koncentracija COX-2 u tumorskim stanicama

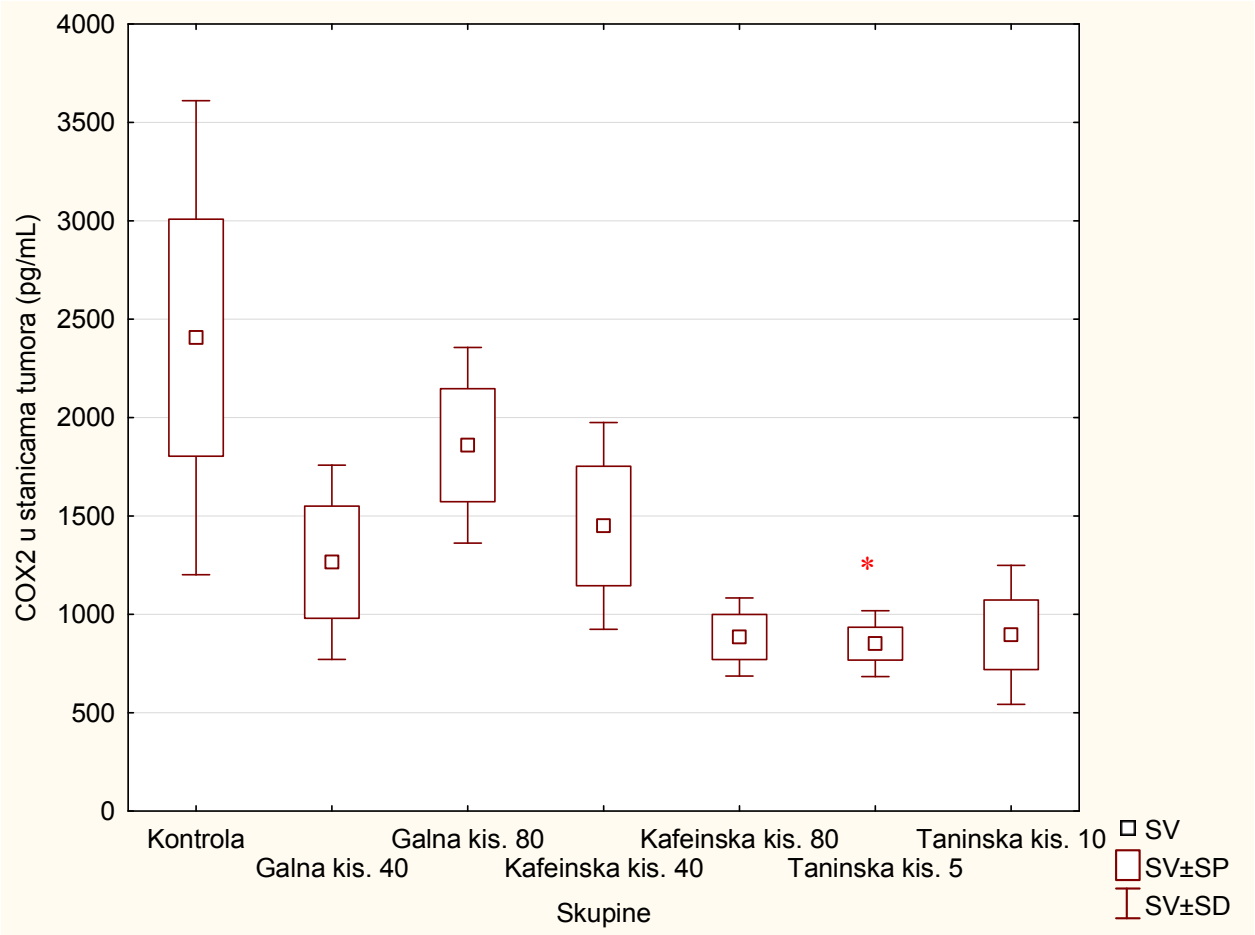
Na Slici 55 prikazani su rezultati mjerenja koncentracije COX-2 u tumorskih stanicama izoliranim iz ascitesa iz kojih je vidljivo da ne postoje nikakve značajne razlike između kontrole i obrađenih skupina iako dolazi do smanjenja koncentracije COX-2 u obrađenim skupinama u odnosu na kontrolu. Prilikom obrade miševa 4X svaki drugi dan uočeno je da dolazi do značajnog smanjenja koncentracije COX-2 u tumorskim stanicama kod TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 56).



Slika 55. Koncentracija COX-2 u stanicama tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

.

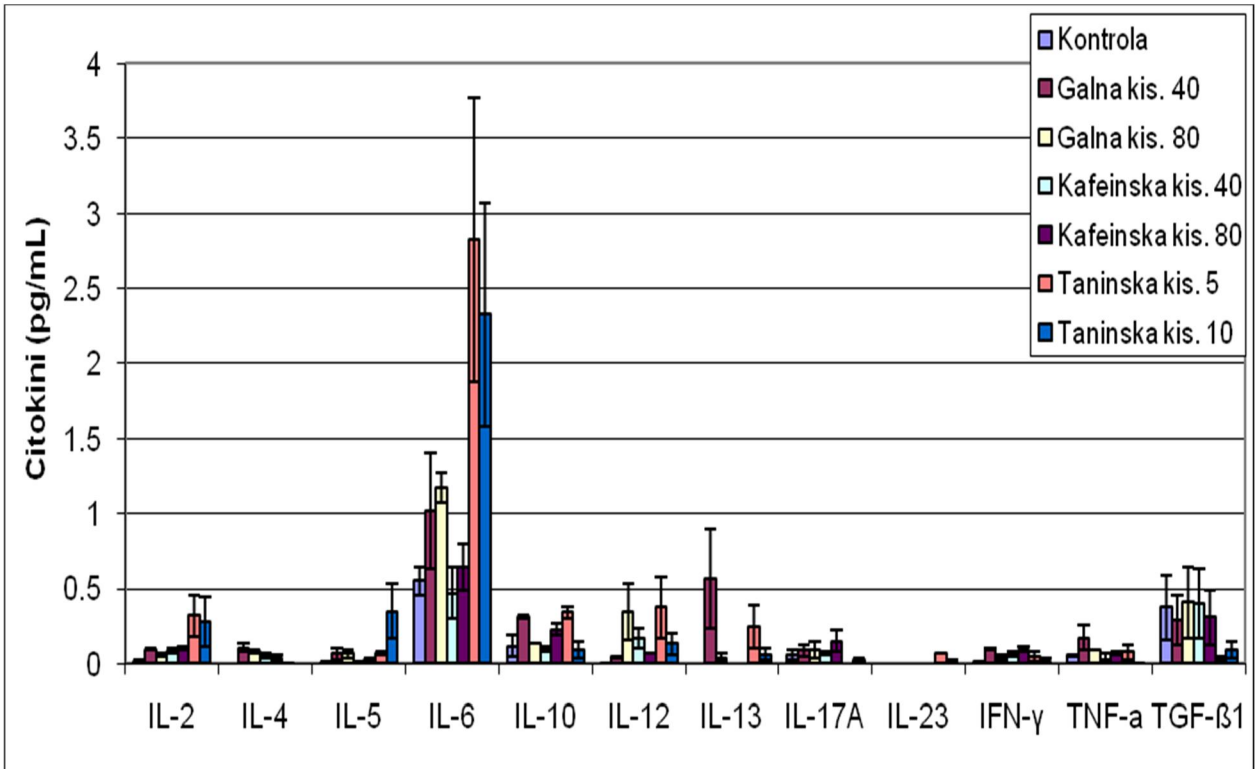


Slika 56. Koncentracija COX-2 u stanicama tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.2.5. Koncentracija Th1/Th2/Th17 citokina u nadtalogu tumorskih stanica

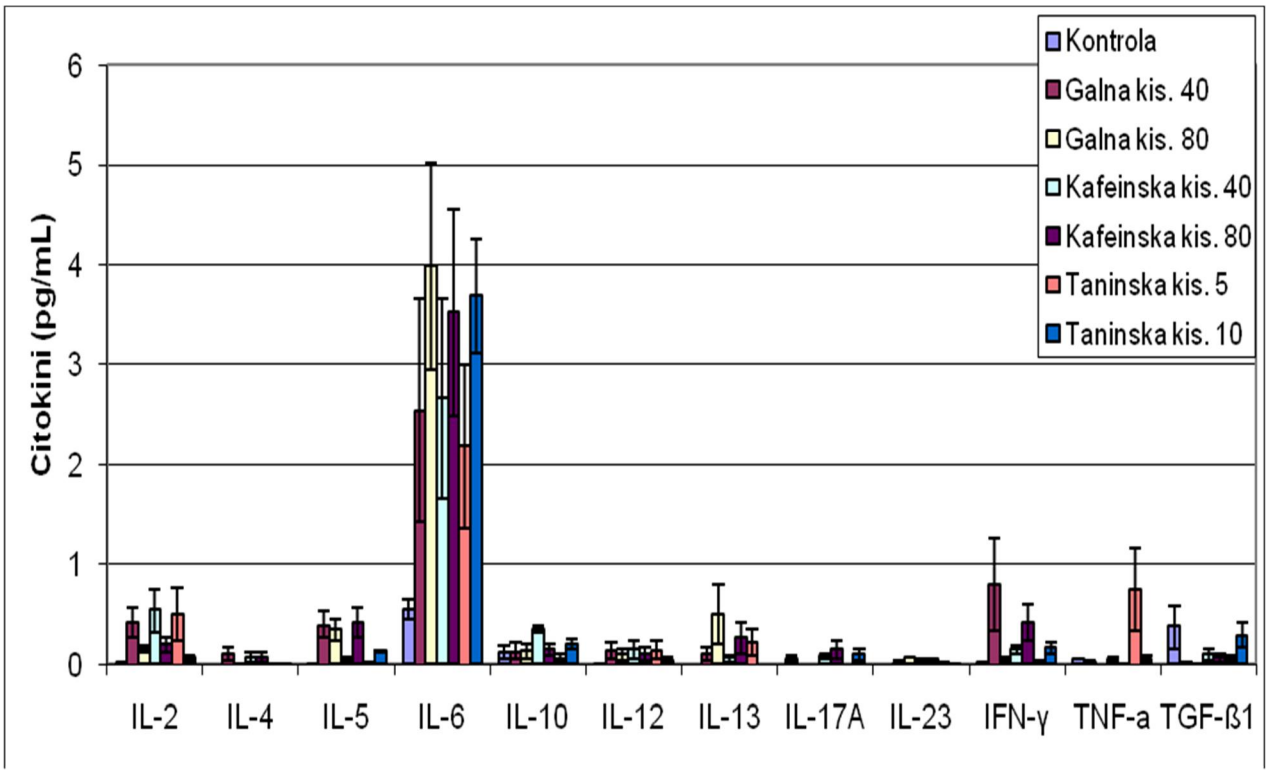
Izmjerene vrijednosti koncentracije Th1/Th2/Th17 citokina u uzorcima nadtaloga tumorskih stanica ukazuju na značajno smanjenje koncentracije interleukina 6 (IL-6) kod skupine obrađene s CA 40 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) kao i interleukina 10 (IL-10) kod skupine obrađene s CA 40 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) tijekom 10 dana obrade životinja (Slika 57).



Slika 57. Koncentracije Th1/Th2/Th17 citokina u nadtalogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV ± SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: **IL-6** za CA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (▪$P < 0,05$); **IL-10** za CA 40 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0,05$); **IL-10** za CA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (▪$P < 0,05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **IL** – interleukin; **IFN-γ** – interferon γ; **TNF-α** – čimbenik tumorske nekroze α; **TGF-β1** – transformirajući čimbenik rasta β1; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

S druge strane, vidljivo je veći broj statistički značajnih promjena u koncentracijama Th1/Th2/Th17 citokina kod skupina koje su krenule s obradom od 5. dana i tretirane su svaki drugi dan. Tako je uočeno povećanje razine interleukina 2 (IL-2) kod skupina GA 40 mg/kg i CA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), zatim povećanje razine interleukina 5 (IL-5) kod skupina GA 40 mg/kg, GA 80 mg/kg i CA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), povećanje razine interleukina 6 (IL-6) kod skupine GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) te interleukina 23 (IL-23) kod skupine GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,01$) (Slika 58). Također, uočeno je značajno smanjenje razine IL-23 kod skupine TA 5 i 10 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) kao i smanjenje razine TNF-α za GA 80 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg ($P < 0,05$).



Slika 58. Koncentracije Th1/Th2/Th17 citokina u nadtalogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: **IL-2** za GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$); **IL-2** za CA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$); **IL-5** za GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$); **IL-5** za GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$); **IL-5** za CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$); **IL-6** za GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$);

IL-23 za GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0,01$) i između obrađenih skupina: **IL-10** za TA 5 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg (▲$P < 0,05$); **IL-23** za TA 5 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0,05$); **IL-23** za TA 10 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0,05$); **TNF-α** za GA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0,05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **IL** – interleukin; **IFN-γ** – interferon γ; **TNF-α** – čimbenik tumorske nekroze α; **TGF-β1** – transformirajući čimbenik rasta β1; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

4.3. GENOTOKSIČNI UČINAK FENOLNIH KISELINA

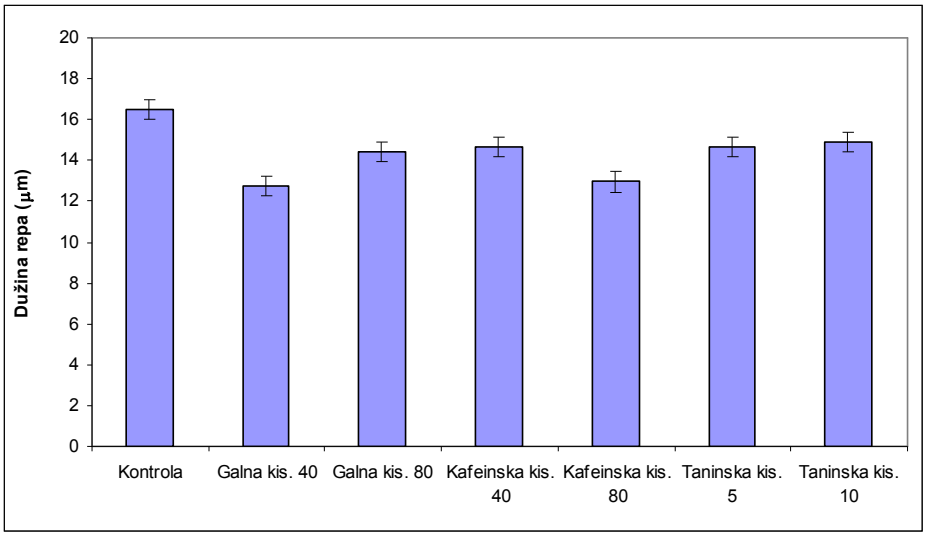
Neravnoteža između stvaranja i uklanjanja reaktivnih vrsta kisika i dušika (ROS/RNS) ima za posljedicu nekontroliranu diobu stanica i nastanak tumora koji je uglavnom induciran nestabilnošću samog genoma. Najčešća oštećenja koja se pritom javljaju u organizmu, a mogu biti uzrokovana vanjskim ili unutarnjim čimbenicima vezana su za molekulu DNA budući da ona predstavlja jedinstvenu i trajnu kopiju staničnog genoma. Stoga oštećenja koja se javljaju na molekuli DNA imaju znatno veće posljedice nego na drugim biološkim makromolekulama: RNA, proteinima, lipidima ili ugljikohidratima. Od vanjskih čimbenika koji mogu uzrokovati oštećenja DNA su štetna zračenja (ionizirajuće i UV) te izloženost raznim kemikalijama, dok unutarnji čimbenici su greške koje se javljaju prilikom replikacije DNA, oksidacijski stres te spontani gubitak baze. U najvećem broju slučaja stanica sama rješava nagomilana oštećenja na molekuli DNA tako što aktivira stanično samouništenje zvano apoptoza. Stoga su mehanizmi popravka molekule DNA veoma značajni budući da se njima osigurava cjelovitost genoma i vijabilnost stanice. U tomu važnu ulogu mogu imati fenolne kiseline kroz svoje antioksidativno i protuupalno djelovanje čime sprječavaju pojavu brojnih bolesti, uključujući i rak.

Temeljem navedenog, genotoksični učinak fenolnih kiselina pratili smo mjerenjem razine oštećenja DNA u limfocitima periferne krvi i tumorskim stanicama primjenom alkalnog komet testa te u limfocitima periferne krvi primjenom mikronukleus testa.

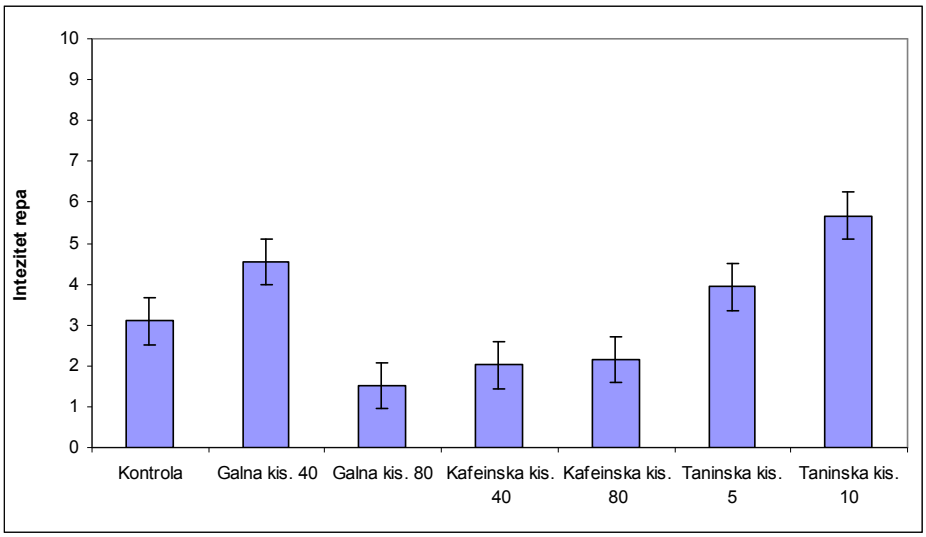
4.3.1. Analiza komet testa

Prilikom analize uzoraka leukocita iz periferne krvi životinja i tumorskih stanica iz ascitesne tekućine metodom standardnog alkalnog komet testa izmjerili smo vrijednosti dužine repa (udaljenost odlomljenih ulomaka DNA), intenzitet repa (% DNA koja je migrirala u rep) i repni moment koji se definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu.
Na leukocitima periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10 puta svaki dan uočili smo smanjenje dužine repa kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 59 a), s time da je najveća dužina repa uočena kod GA 80 mg/kg, CA 40 mg/kg te TA 5 i 10 mg/kg, a najmanja dužinu repa (udaljenost najduljih odlomljenih ulomaka DNA) kod GA 40 mg/kg i CA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu.
Analize intenziteta repa odnosno postotka migrirane DNA u repu pokazuje statistički značajno povećanje kod obrađenih skupina GA 40 mg/kg i TA 10 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$; $P < 0,001$), dok je kod skupine obrađene s GA 80 mg/kg vidljivo značajno smanjenje postotka DNA u repu u odnosu na kontrolu ($P < 0,01$) (Slika 59 b). Obrada miševa s TA 10 mg/kg pokazuje najveći repni moment u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 59 c). Statističke značajnosti između pojedinih eksperimentalnih skupina prikazane su u Tablicama 31-33, gdje je vidljivo da je obrada s TA 10 mg/kg polučila najveće statističke promjene.

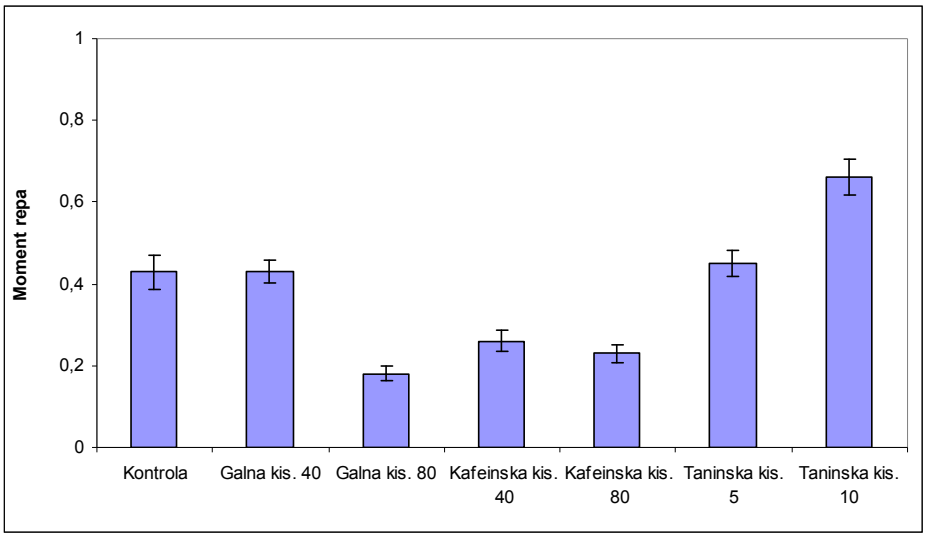
Vrijednost dužine repa na stanicama tumora kod životinja koje su obrađene s GA 40 mg/kg tijekom 10 dana značajno je smanjena u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 60 a), dok je intenzitet repa (% migrirane DNA u repu) kod skupine obrađene s GA 80 mg/kg značajno smanjen ($P < 0,001$), a kod TA 5 mg/kg i TA 10 mg/kg značajno povećan u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 60 b). Rezultati analize repnog momenta na tumorskim stanicama pokazuju da je najmanji repni moment kod skupine obrađene s GA 80 mg/kg ($P < 0,001$), dok je najveći repni moment vidljiv kod skupina obrađenim s TA 5 i 10 mg/kg ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu (Slika 60 c). I u ovom slučaju vidljivo je da je najveće statističke razlike između pojedinih skupina pokazala primjena TA 5 i 10 mg/kg što je prikazano u Tablicama od 34-36.



A



B



C

Slika 59. Rezultati komet test na leukocitima periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg

tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. A) dužina repa; B) intenzitet repa; C) moment repa.

Kratice: SV – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

Tablica 31. Statistički pokazatelji rezultata dužine repa leukocita periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	$P < 0{,}001$						
GA 80 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$					
CA 40 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ				
CA 80 mg/kg	$P < 0{,}001$	NZ	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$			
TA 5 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ	NZ	$P < 0{,}001$		
TA 10 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ	NZ	$P < 0{,}001$	NZ	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

Tablica 32. Statistički pokazatelji rezultata intenziteta repa leukocita periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	$P < 0,05$						
GA 80 mg/kg	$P < 0,01$	$P < 0,001$					
CA 40 mg/kg	NZ	$P < 0,001$	NZ				
CA 80 mg/kg	NZ	$P < 0,001$	NZ	NZ			
TA 5 mg/kg	NZ	NZ	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,01$		
TA 10 mg/kg	$P < 0,001$	NZ	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,01$	

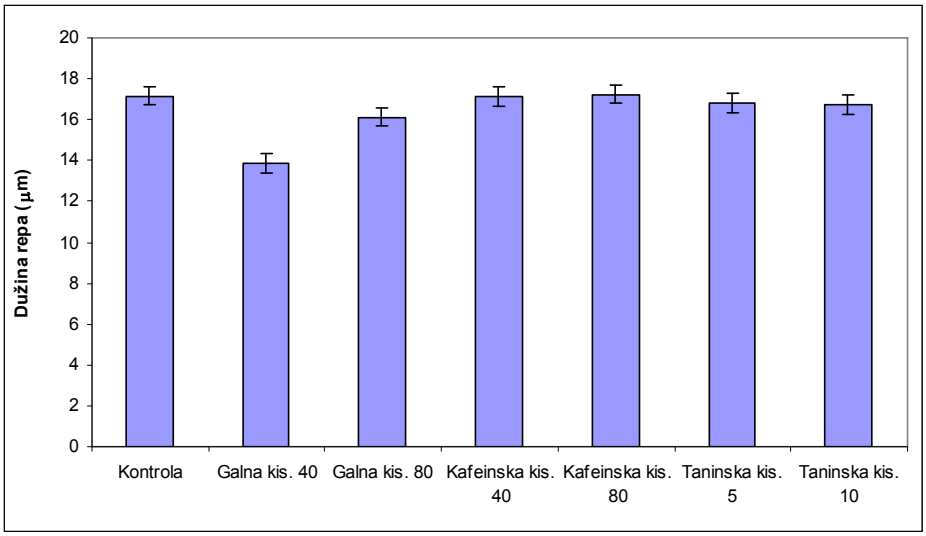
Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

Tablica 33. Statistički pokazatelji rezultata repnog momenta leukocita periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan.

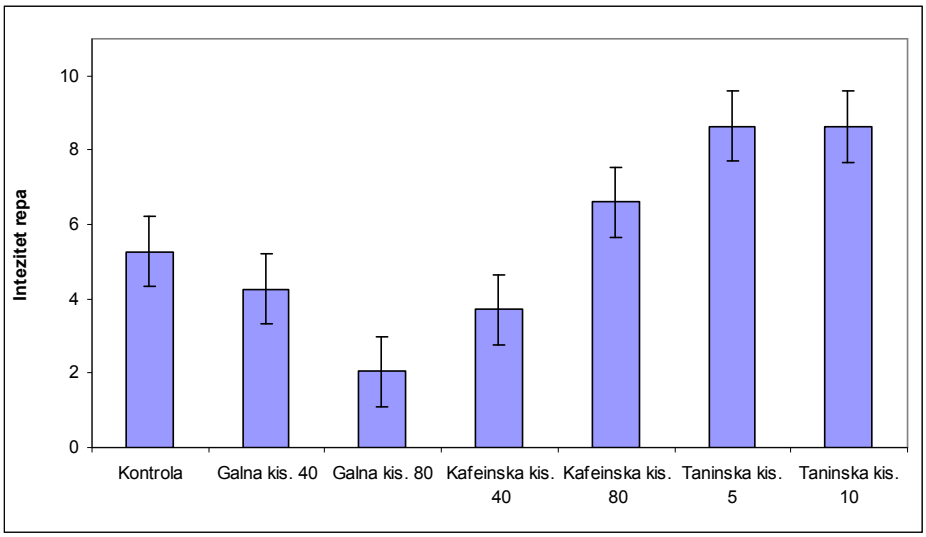
Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	NZ						
GA 80 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$					
CA 40 mg/kg	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}05$	NZ				
CA 80 mg/kg	$P < 0{,}01$	$P < 0{,}01$	NZ	NZ			
TA 5 mg/kg	NZ	NZ	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}01$	$P < 0{,}001$		
TA 10 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}01$	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

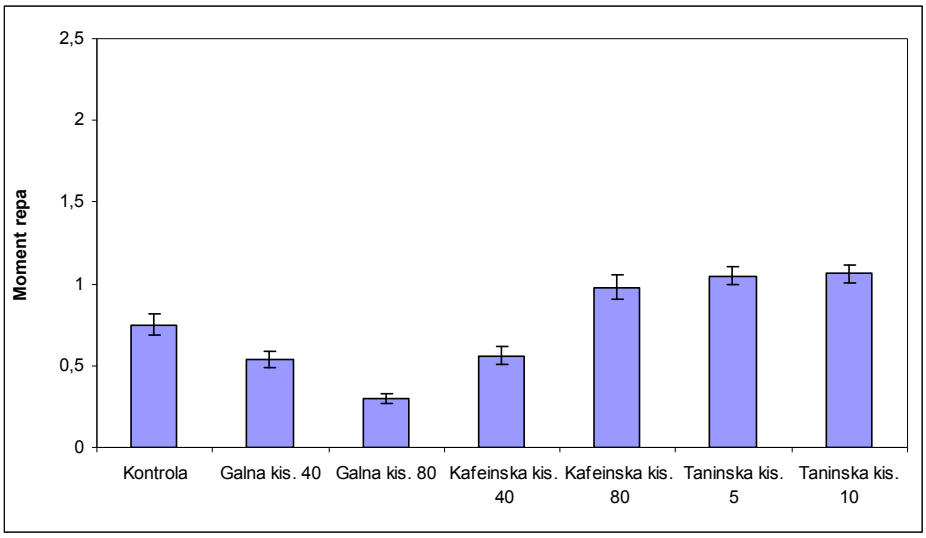
A



B



C



Slika 60. Rezultati komet test na stanicama tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$)

obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. A) dužina repa; B) intenzitet repa; C) moment repa.

Kratice: SV – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

Tablica 34. Statistički pokazatelji rezultata dužine repa tumorsih stanica u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	$P < 0{,}001$						
GA 80 mg/kg	NZ	$P < 0{,}001$					
CA 40 mg/kg	NZ	$P < 0{,}001$	NZ				
CA 80 mg/kg	NZ	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}05$	NZ			
TA 5 mg/kg	NZ	$P < 0{,}001$	NZ	NZ	NZ		
TA 10 mg/kg	NZ	$P < 0{,}001$	NZ	NZ	NZ	NZ	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

Tablica 35. Statistički pokazatelji rezultata intenziteta repa tumorskih stanica u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	NZ						
GA 80 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}05$					
CA 40 mg/kg	NZ	NZ	NZ				
CA 80 mg/kg	NZ	$P < 0{,}01$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$			
TA 5 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}05$		
TA 10 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}05$	NZ	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

Tablica 36. Statistički pokazatelji rezultata repnog momenta tumorskih stanica u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan.

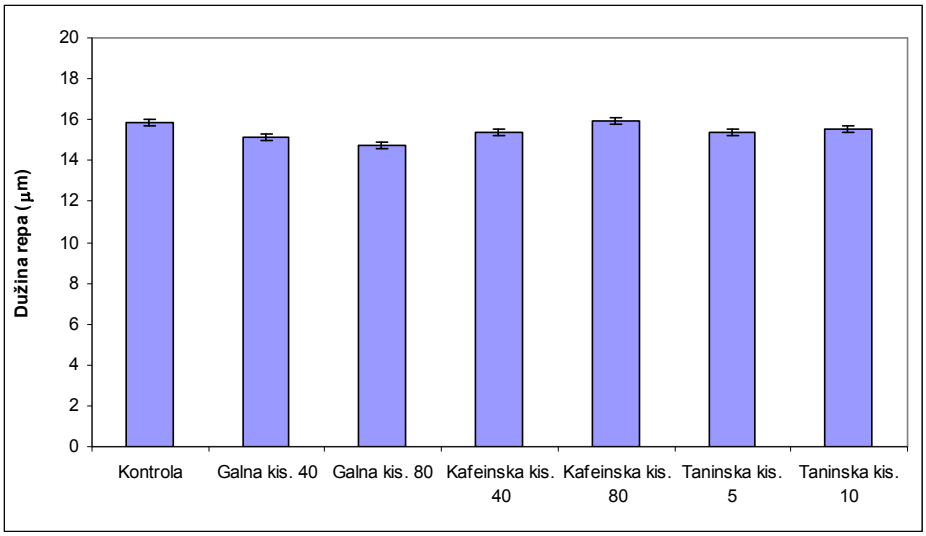
Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	NZ						
GA 80 mg/kg	$P < 0{,}001$	NZ					
CA 40 mg/kg	NZ	NZ	NZ				
CA 80 mg/kg	NZ	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$			
TA 5 mg/kg	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ		
TA 10 mg/kg	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ	NZ	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

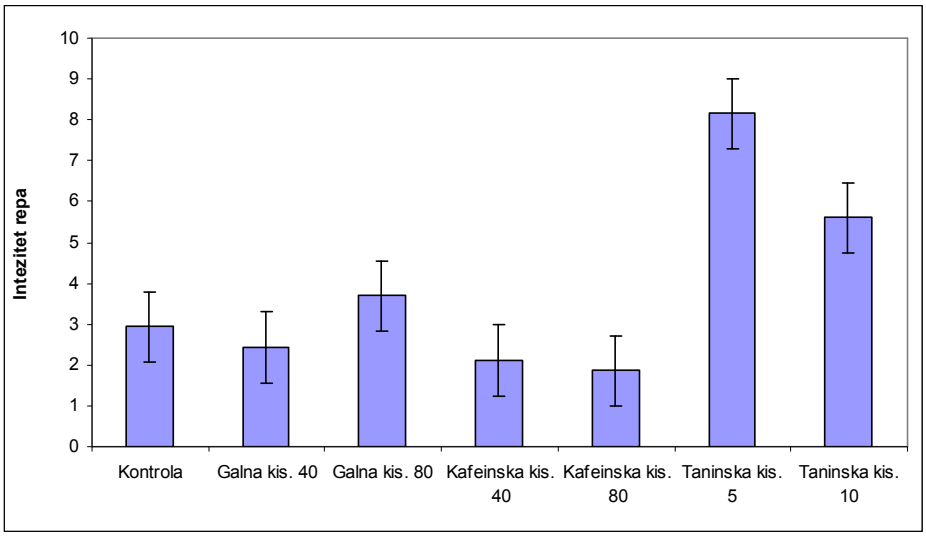
Rezultati komet testa na leukocitima periferne krvi u miševa nositelja EAT-a koji su obrađeni 4 puta svaki drugi dan počevši od 5. dana s fenolnim kiselinama pokazuju značajno smanjenje dužine repa kod GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$), dok kod ostalih obrađenih skupina nisu uočene nikakve značajne promjene u odnosu na kontrolu (Slika 61a, Tablica 37). Najveći intenzitet repa uočen je nakon obrade miševa s TA 5 i 10 mg/kg ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolu, dok je kod primjene galne i kafeinske kiseline u dozama od 40 i 80 mg/kg primijećeno smanjenje postotka DNA u repu u odnosu na taninsku kiselinu od 5 i 10 mg/kg ($P < 0,001$) (Slika 61 b, Tablica 38). Obrada miševa s taninskom kiselinom u dozama od 5 i 10 mg/kg pokazuje najveći repni moment u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 61 c, Tablica 39). Iz Tablica 38-39 vidljivo je da je primjena taninske kiseline u većoj i manjoj dozi dovela do najvećih značajnih razlika u odnosu na sve ostale eksperimentalne skupine na leukocitima periferne krvi miševa.

Kod analize komet testa na tumorskim stanicama uočeno je značajno smanjenje dužine repa u odnosu na kontrolu kod GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) te GA 40 mg/kg i CA 40 mg/kg ($P < 0,001$), dok je kod skupine TA 5 mg/kg uočeno značajno povećanje u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 62 a, Tablica 40). Statistički značajno smanjenje postotka DNA u repu u odnosu na kontrolu vidljivo je kod GA 80 mg/kg ($P < 0,05$), CA 40 mg/kg i CA 80 mg/kg ($P < 0,001$), dok je kod skupina TA 5 mg/kg i TA 10 mg/kg uočeno značajno povećanje u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 62 b, Tablica 41). Rezultati analize repnog momenta pokazuju značajno povećanje kod skupina obrađenih s TA 5 i 10 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,01$; $P < 0,05$), dok je kod skupina GA 80 mg/kg te CA 40 i 80 mg/kg vidljivo značajno smanjenje repnog momenta u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) (Slika 62 c, Tablica 42). I u ovom je slučaju intraperitonealna terapijska primjena taninske kiseline u dozi od 5 i 10 mg/kg polučila najviše statističkih razlika (Tablice 40-42).

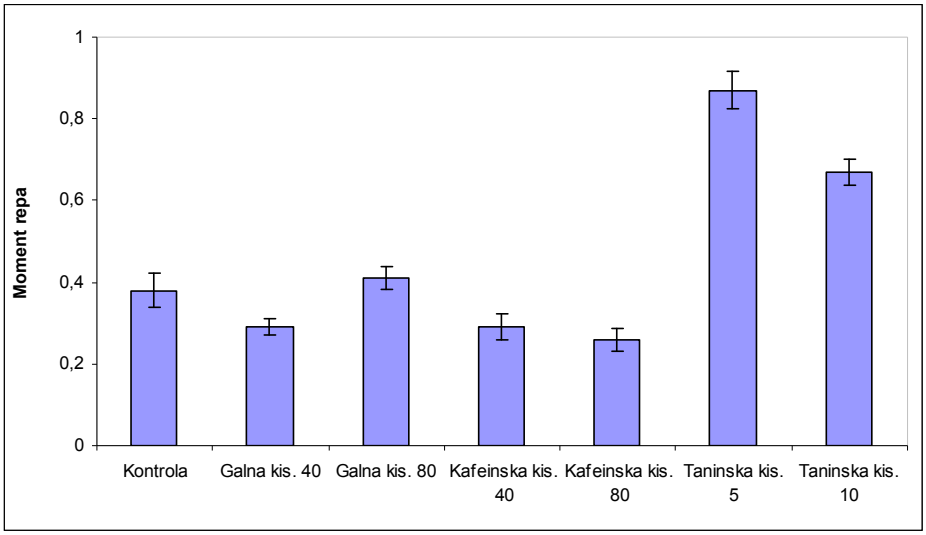
A



B



C



Slika 61. Rezultati komet test na leukocitima periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10

mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. A) dužina repa; B) intenzitet repa; C) moment repa.

Kratice: SV – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška.

Tablica 37. Statistički pokazatelji rezultata dužine repa leukocita periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	NZ						
GA 80 mg/kg	$P < 0,001$	NZ					
CA 40 mg/kg	NZ	NZ	NZ				
CA 80 mg/kg	NZ	$P < 0,05$	$P < 0,001$	NZ			
TA 5 mg/kg	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ		
TA 10 mg/kg	NZ	NZ	$P < 0,05$	NZ	NZ	NZ	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

Tablica 38. Statistički pokazatelji rezultata intenziteta repa leukocita periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	NZ						
GA 80 mg/kg	NZ	NZ					
CA 40 mg/kg	NZ	NZ	$P < 0,05$				
CA 80 mg/kg	NZ	NZ	$P < 0,01$	NZ			
TA 5 mg/kg	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$		
TA 10 mg/kg	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	

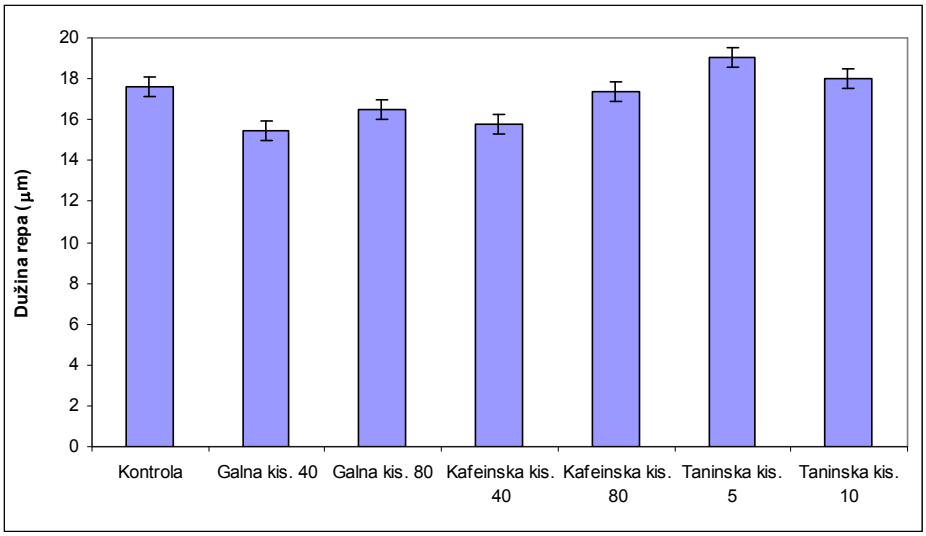
Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

Tablica 39. Statistički pokazatelji rezultata repnog momenta leukocita periferne krvi u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan.

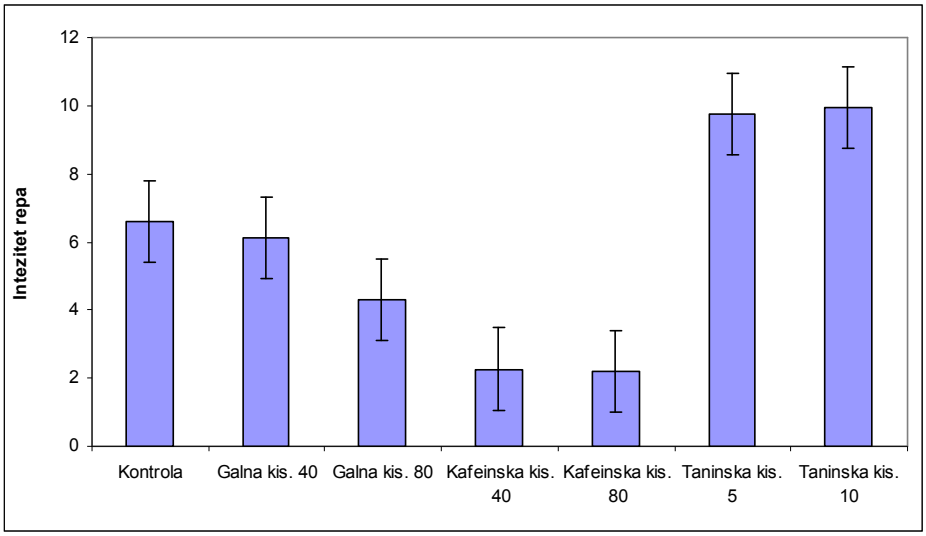
Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	NZ						
GA 80 mg/kg	NZ	NZ					
CA 40 mg/kg	NZ	NZ	NZ				
CA 80 mg/kg	NZ	NZ	NZ	NZ			
TA 5 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$		
TA 10 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}01$	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

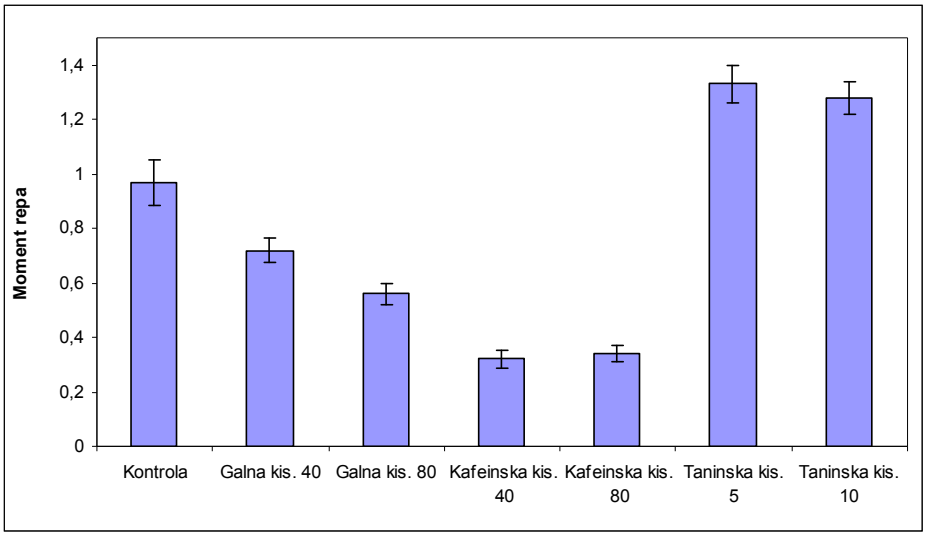
A



B



C



Slika 62. Rezultati komet test na stanicama tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan.

Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. A) dužina repa; B) intenzitet repa; C) moment repa.

Tablica 40. Statistički pokazatelji rezultata dužine repa tumorskih stanica u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	$P < 0,001$						
GA 80 mg/kg	$P < 0,05$	$P < 0,05$					
CA 40 mg/kg	$P < 0,001$	NZ	NZ				
CA 80 mg/kg	NZ	$P < 0,001$	NZ	$P < 0,001$			
TA 5 mg/kg	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$		
TA 10 mg/kg	NZ	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	NZ	NZ	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

Tablica 41. Statistički pokazatelji rezultata intenziteta repa tumorskih stanica u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	NZ						
GA 80 mg/kg	$P < 0,05$	NZ					
CA 40 mg/kg	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,05$				
CA 80 mg/kg	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,05$	NZ			
TA 5 mg/kg	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$		
TA 10 mg/kg	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	NZ	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

Tablica 42. Statistički pokazatelji rezultata repnog momenta tumorskih stanica u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan.

Skupine	**EAT kontrola**	**GA 40 mg/kg**	**GA 80 mg/kg**	**CA 40 mg/kg**	**CA 80 mg/kg**	**TA 5 mg/kg**	**TA 10 mg/kg**
EAT kontrola							
GA 40 mg/kg	NZ						
GA 80 mg/kg	$P < 0{,}001$	NZ					
CA 40 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ				
CA 80 mg/kg	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ	NZ			
TA 5 mg/kg	$P < 0{,}01$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$		
TA 10 mg/kg	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ	

Kratice: **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **NZ** – nije značajno.

4.3.2. Analiza mikronukleus testa

Mikronukleusi poznati još pod nazivom Howell–Jolly tjelešca su zaostali acentrični kromosomski ulomci ili cijeli kromosomi u anafazi tijekom diobe vidljivi kao dodatne male jezgre u citoplazmi stanice kćeri tijekom interfaze. Učestalost pojave mikronukleusa može se koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma u stanicama, u uvjetima *in vitro* i *in vivo* uslijed djelovanja različitih genotoksičnih tvari.

Rezultati analize mikronukleus testa *in vivo* koji su dobiveni iz sasušenih razmaza periferne krvi (leukocita) u miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan te 4X svaki drugi dan nisu pokazali nikakvu statističku značajnost kako u odnosu na kontrolu tako i između obrađenih skupina. Broj mikronukleusa u analiziranim retikulocitima (ukupno pregledano 2 000 retikulocita po svakom pojedinačnom uzorku) bio je zanemarujuće mali, te stoga rezultati nisu prikazani.

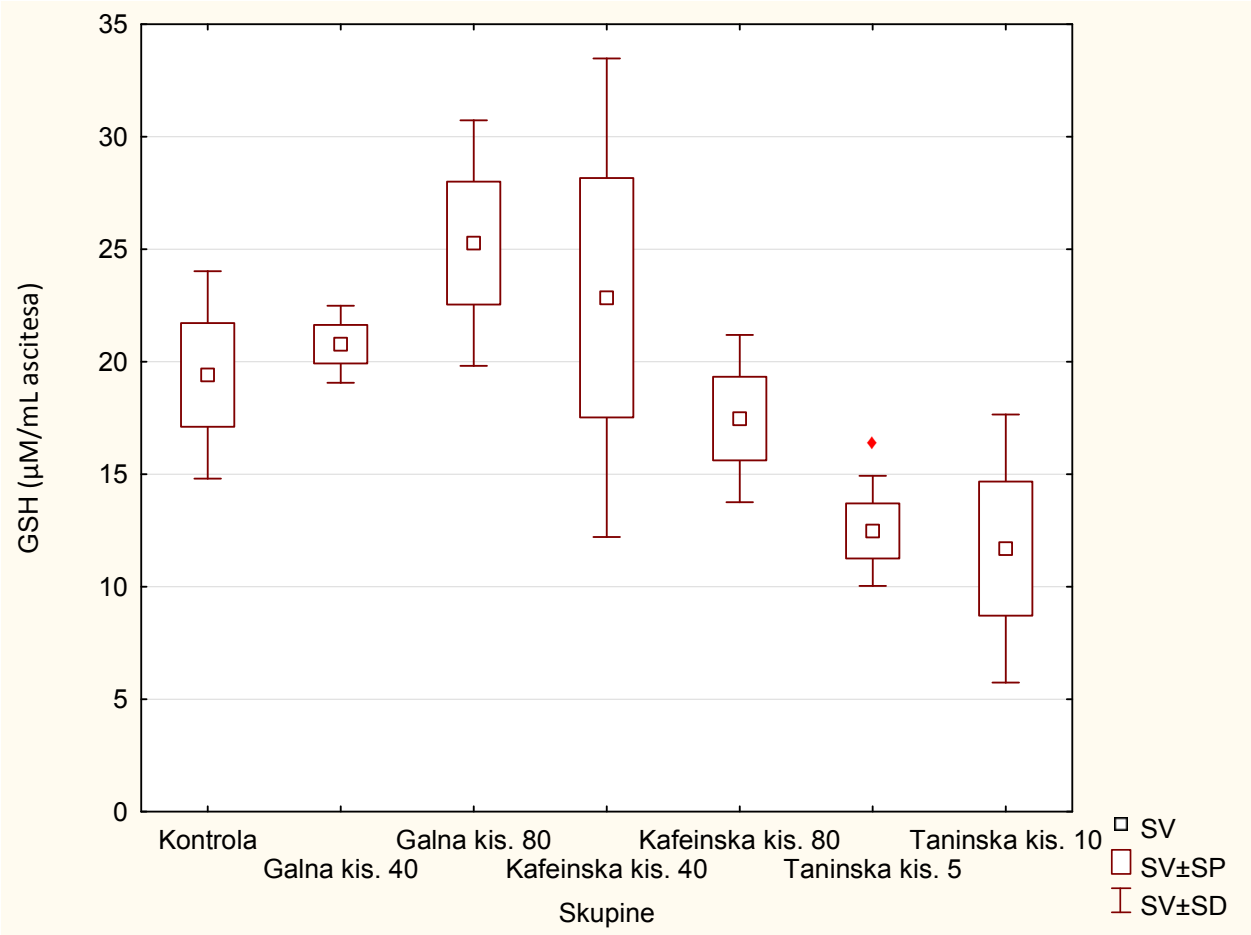
4.4. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK FENOLNIH KISELINA

Visoka koncentracija slobodnih radikala kisika i dušika remeti ravnotežu između antioksidativne zaštite i oksidacijskih procesa te dovode do narušavanja homeostaze organizma, pojave oksidacijskog stresa i nastanku brojni bolesti poput dijabetesa, ateroskleroze, hipertenzije, neurodegenerativnih bolesti te malignih oboljenja.
Epidemiološka istraživanja pokazala su da je visok unos voća i povrća koje obiluje antioksidansima povezan s manjom učestalosti nastanka raka. Dokazi ukazuju da neki antioksidansi inhibiraju rast malignih stanica, potiču apoptozu i inhibiraju aktivnosti MMP-a. Antioksidativni i endogenih redoks enzimi djeluju kao prva linija obrane protiv ROS-a u svim staničnim odjeljcima (organelima) i također izvan stanice. Najvažniji enzimi su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaze (GPX), katalaze (CAT) i peroksiredoksini (PRX). Specifična uloga ovih enzima u karcinogenezi je detoksifikacija ROS-a. Osim njih, važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti imaju i neke molekule kao što su glutation (GSH), vitamini A, C i E, albumini, mokraćna kiselina te karotenoidi koje zajedničkim djelovanjem sprječavaju stvaranje i/ili odstranjuju već stvorene slobodne radikale te ograničavaju stvaranje i širenje lančanih reakcija.

Antioksidativni učinak fenolnih kiselina pratili smo mjerenjem koncentracije ukupnog glutationa (GSH), enzimske aktivnosti katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD) kao i koncentracije lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima bubrega, jetre, slezene i ascitesa.

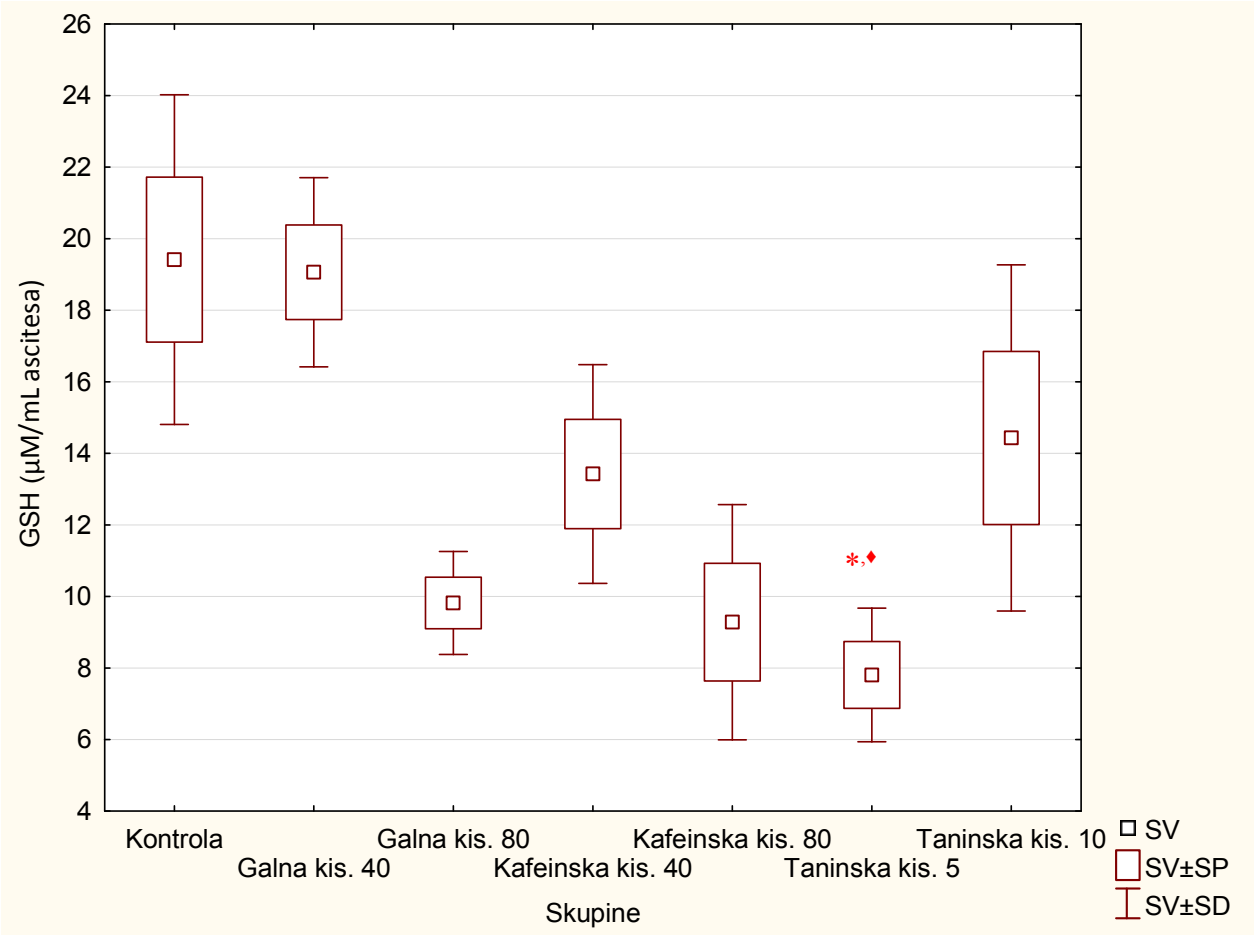
4.4.1. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima

Spektrofotometrijska analiza koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u ascitesnoj tekućini kod miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan pokazuje statistički značajne razlike samo kod skupine TA 5 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 63), dok je kod miševa koji su obrađeni 4X svaki drugi dan ta značajnost također uočena kod TA 5 mg/kg, ali u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) i GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 64). Kod određivanja koncentracije GSH u bubregu miševa koji su obrađeni 10X svaki dan uočena je statistička razlika kod skupine CA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) te između obrađenih skupina GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) i CA 40 mg/kg ($P < 0,001$) u odnosu na TA 10 mg/kg (Slika 65). Kod miševa koji su obrađeni 4X svaki drugi dan kod bubrega je uočena razlika kod TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu te između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 10 mg/kg ($P < 0,01$) u odnosu na TA 5 mg/kg (Slika 66). Jetra pokazuje statistički značajnu razliku samo kod skupine GA 80 mg/kg u odnosu na CA 40 mg/kg ($P < 0,05$) tijekom 10 dana trajanja obrade, dok kod obrade životinja 4X svaki drugi dan nisu uočene nikakve razlike (Slike 67 i 68). Slezena pokazuje statistički manju koncentraciju GSH kod GA 40 mg/kg u odnosu na CA 40 mg/kg ($P < 0,05$) tijekom 10 dana obrade životinja (Slika 69), a kod obrade miševa 4X svaki drugi dan vidljiva je manja koncentracija kod GA 40 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 70).



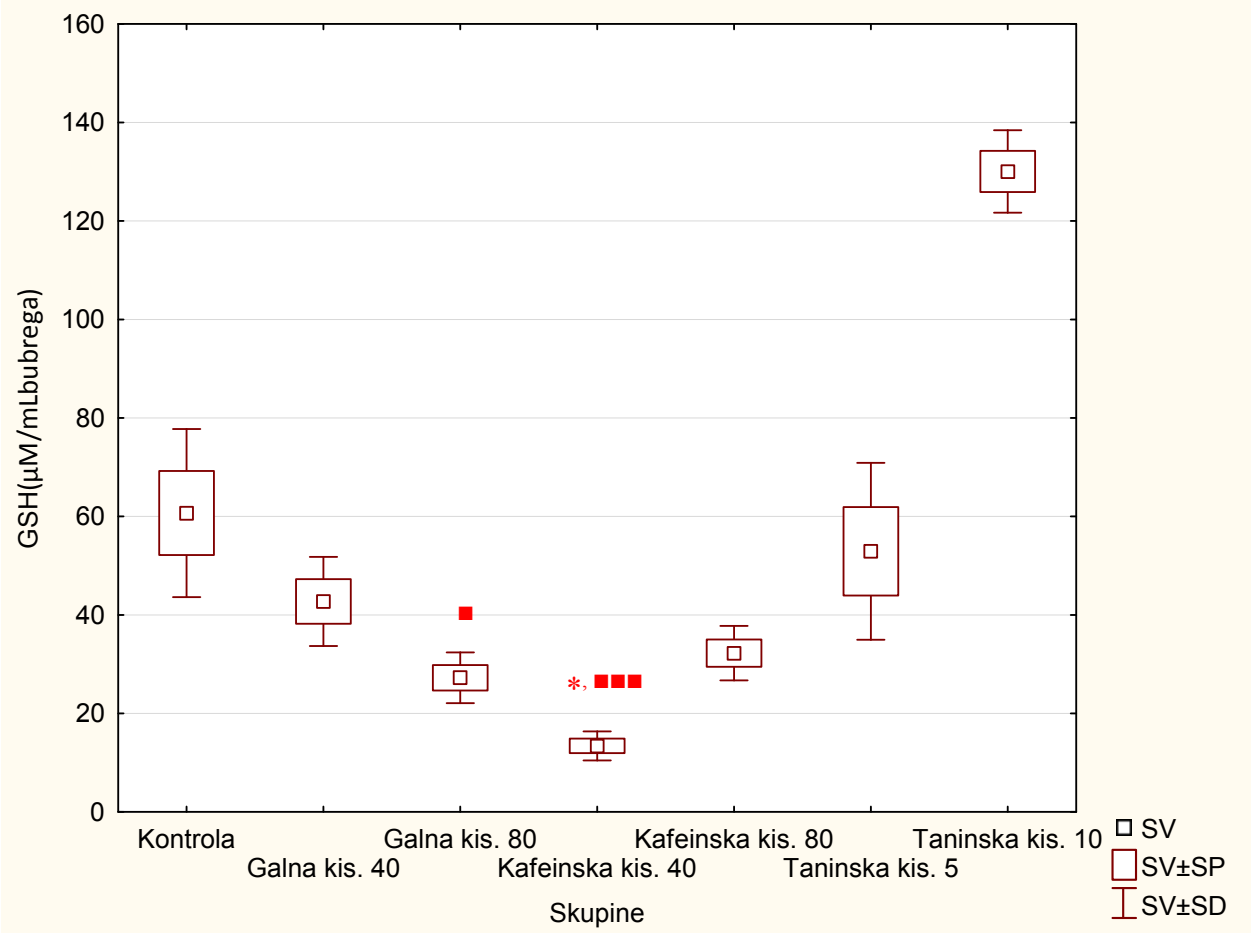
Slika 63. Koncentracija GSH u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



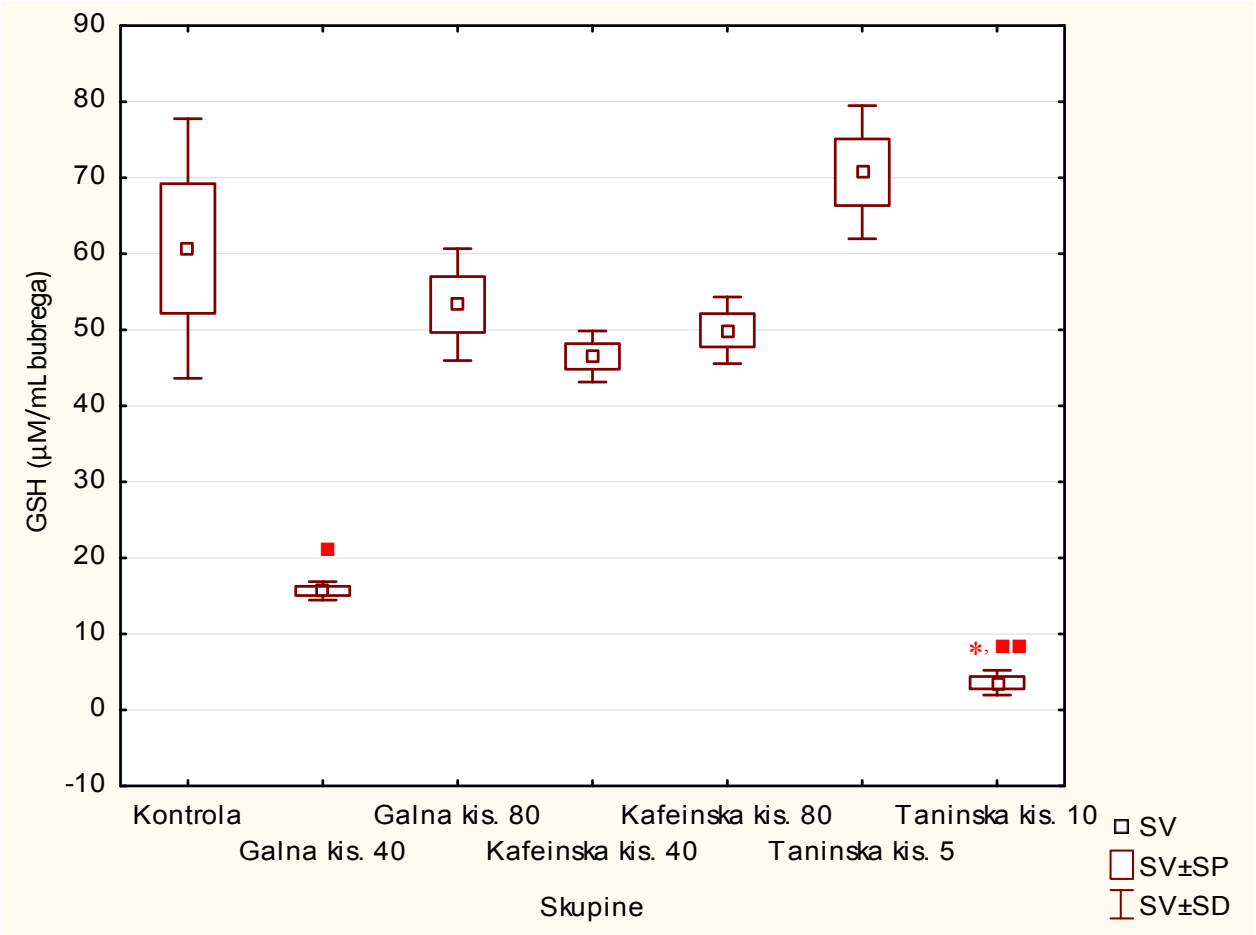
Slika 64. Koncentracija GSH u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



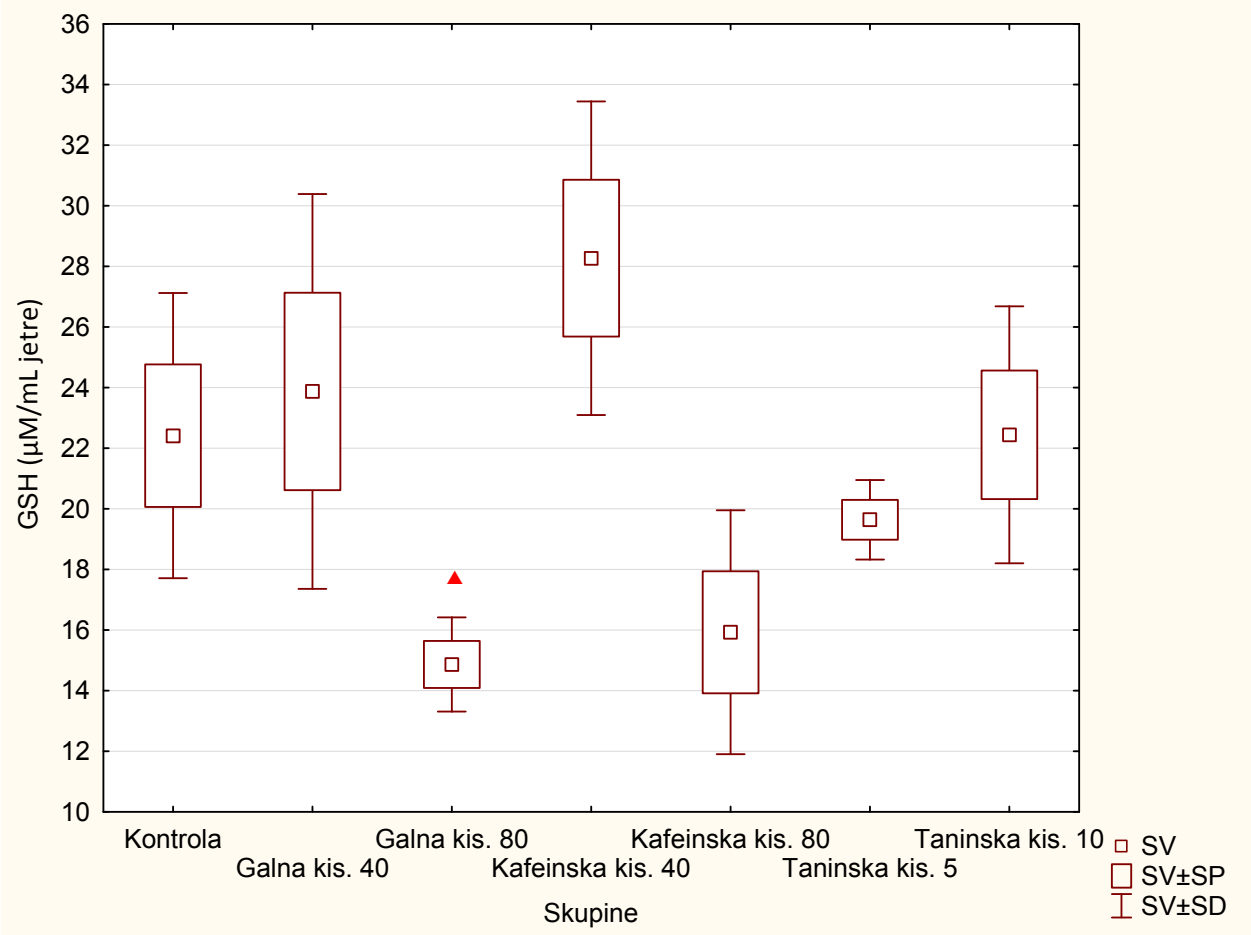
Slika 65. Koncentracija GSH u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: CA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: GA 80 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■$P < 0{,}05$); CA 40 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■■■$P < 0{,}001$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



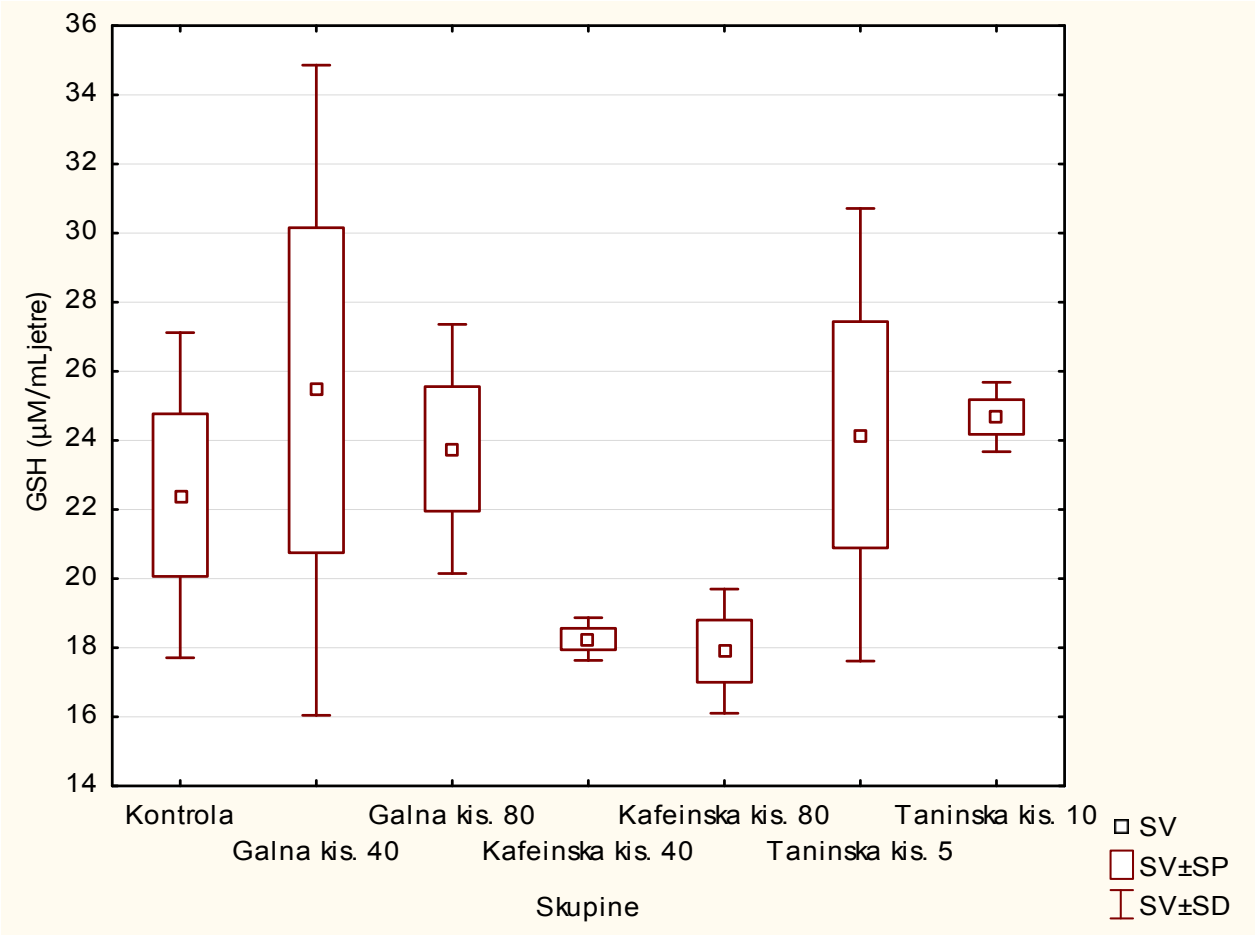
Slika 66. Koncentracija GSH u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$); TA 10 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■■$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



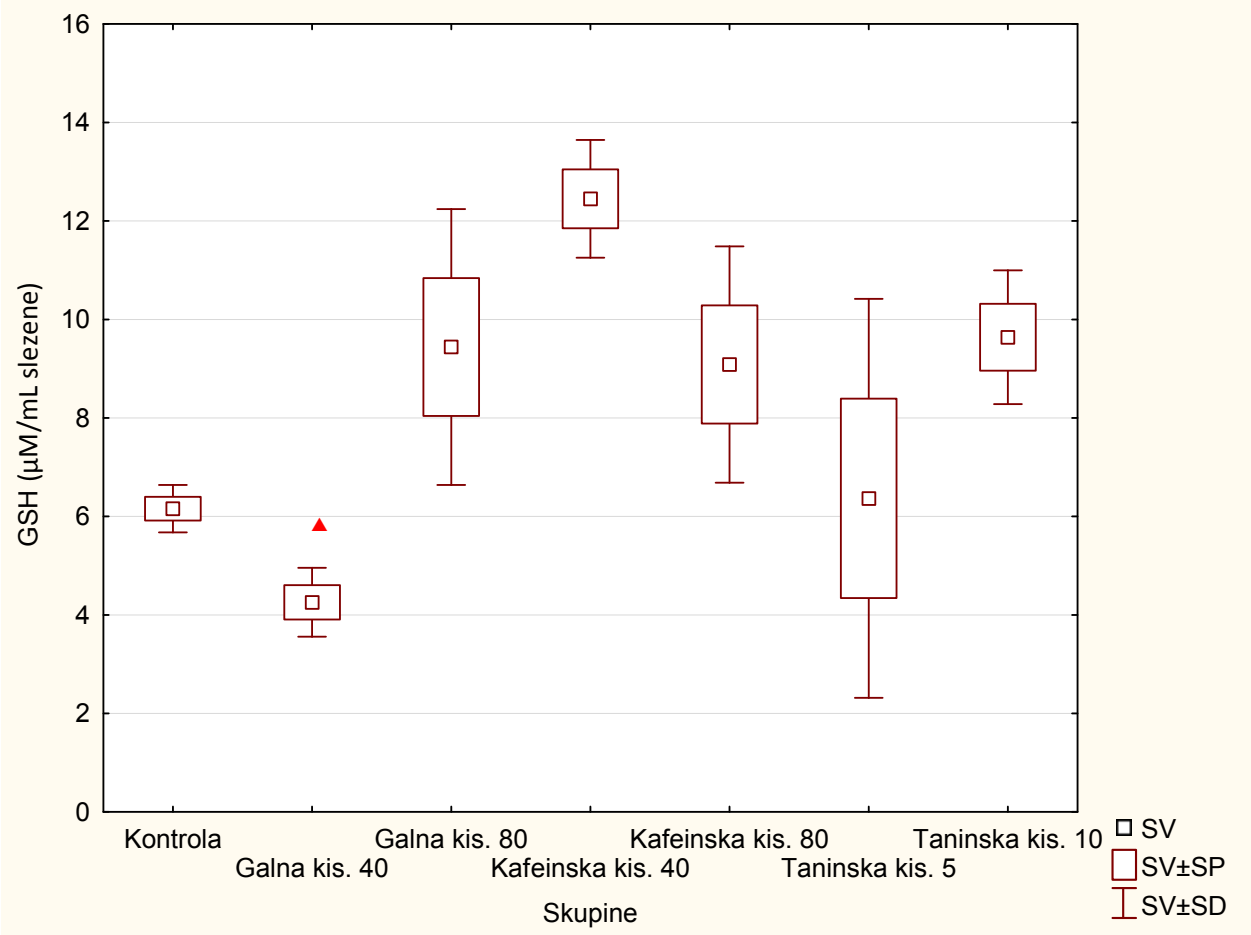
Slika 67. Koncentracija GSH u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 80 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg (▲$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



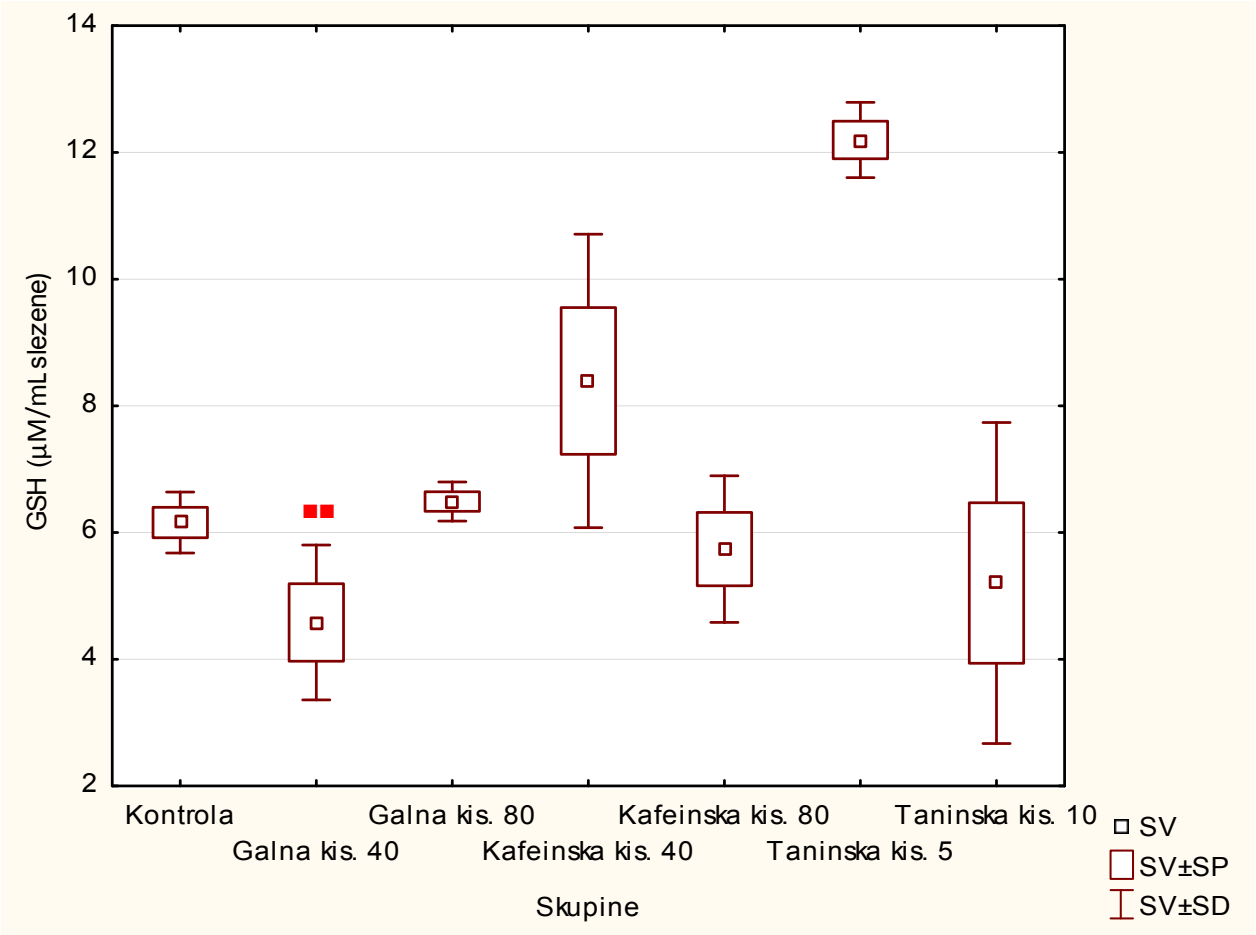
Slika 68. Koncentracija GSH u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



Slika 69. Koncentracija GSH u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg (▲$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

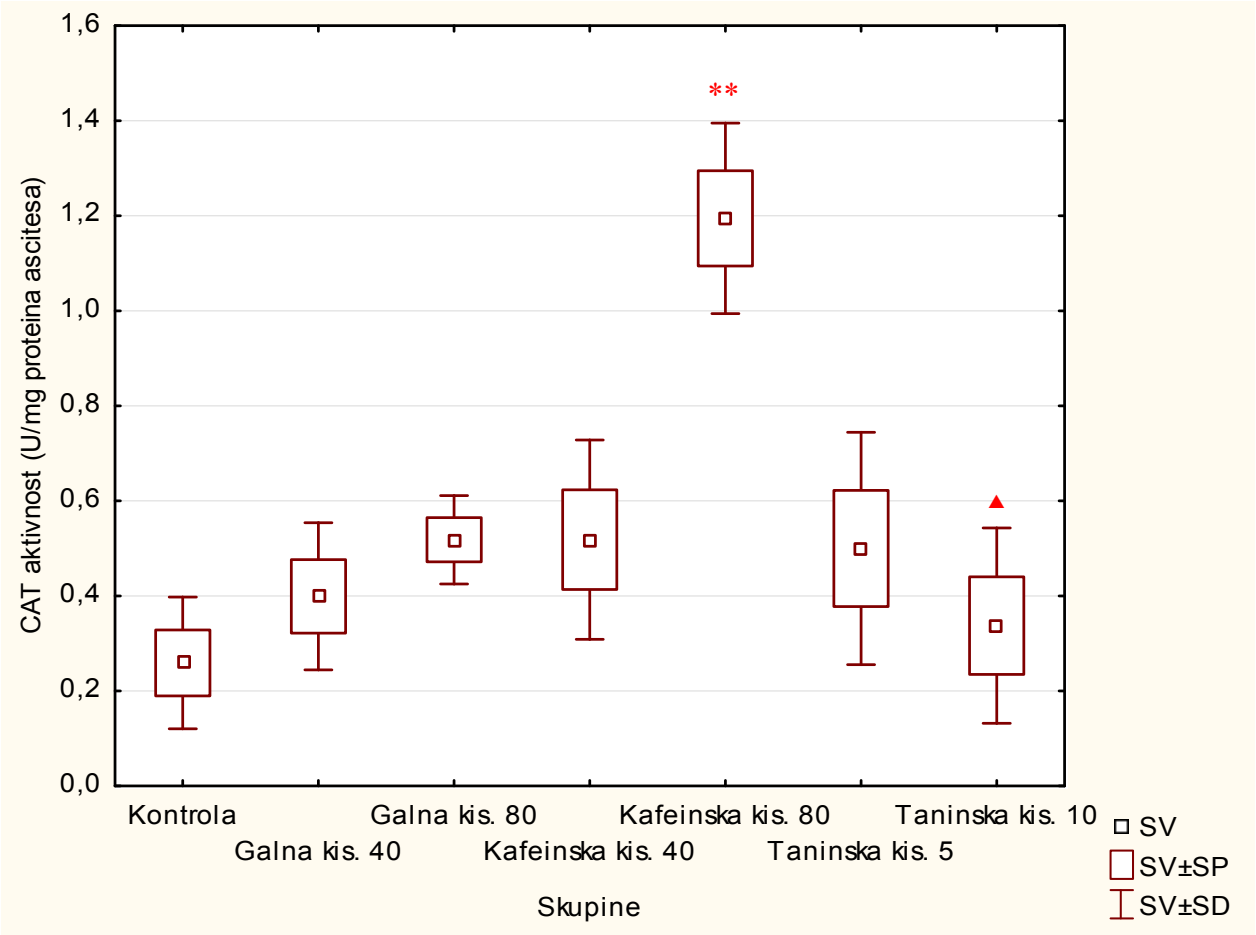


Slika 70. Koncentracija GSH u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■■$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

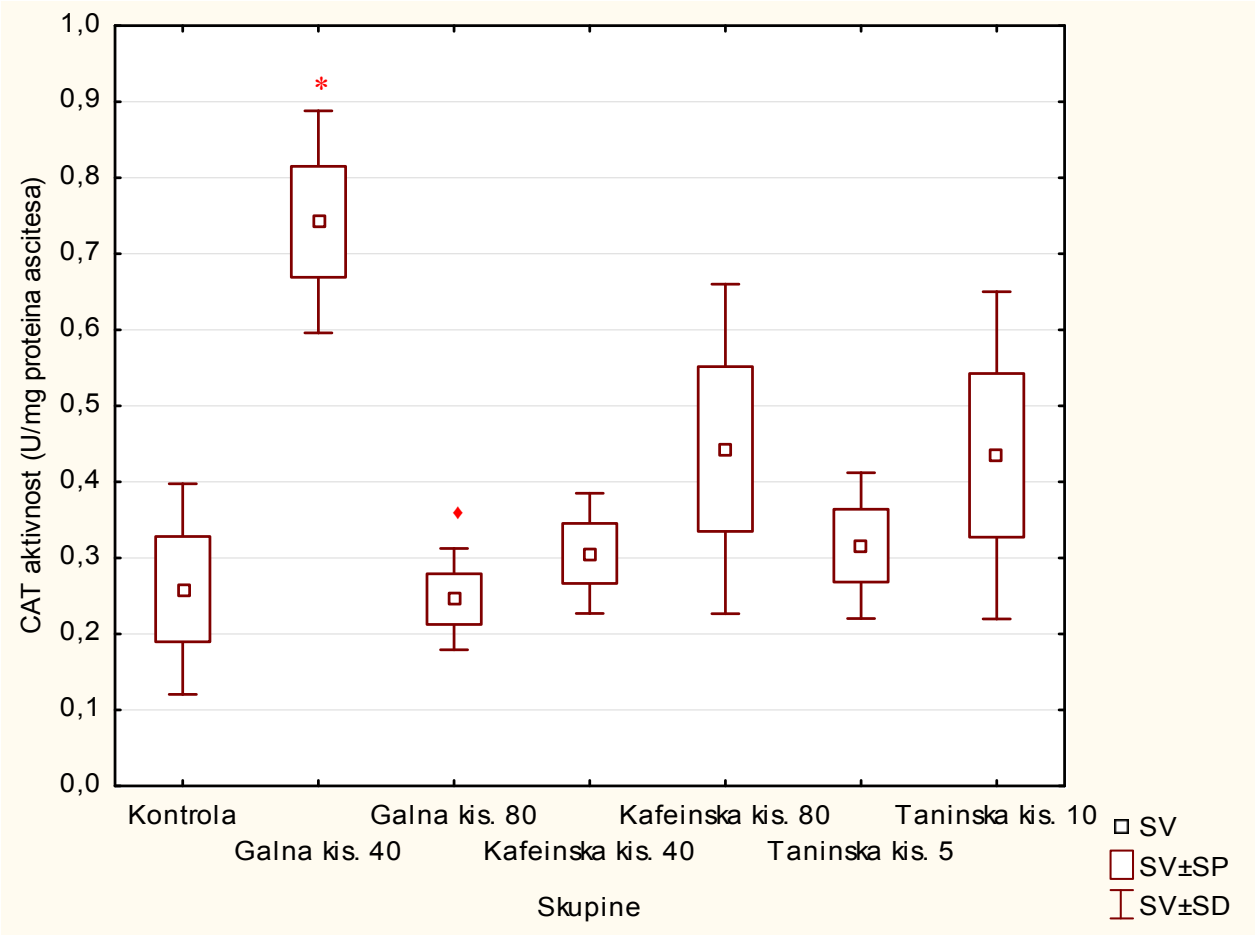
4.4.2. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima

Analiza rezultata aktivnosti katalaze (CAT) u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan ukazuje na povećanje aktivnosti CA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,01$) dok je kod TA 10 mg/kg vidljivo značajno smanjenje aktivnosti katalaze u odnosu na CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 71). Kod obrade životinja 4X svaki drugi dan rezultati aktivnosti katalaze u ascitesu ukazuju na povećanu aktivnost GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) te značajno smanjenje aktivnosti katalaze kod GA 80 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 72). U uzorku bubrega dolazi do smanjenja aktivnosti katalaze kod GA 40 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg, CA 40 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg kg ($P < 0,05$) te CA 40 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 73) kod obrade 10X, dok kod obrade 4X dolazi do smanjenja aktivnosti katalaze kod CA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) te GA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 74). Jetra pokazuje statistički značajno smanjenje samo kod životinja koje su obrađene 10X svaki dan i to kod skupina GA 80 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg, CA 40 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg te CA 80 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 75 i 76). Kod slezene je uočena statistički niža aktivnost katalaze kod CA 80 mg/kg u odnosu na CA 40 mg/kg ($P < 0,05$) te GA 80 mg/kg u odnosu na CA 40 mg/kg ($P < 0,01$) tijekom obrade 10 dana (Slika 77), dok je tijekom obrade 4X vidljiva statistički veća aktivnost katalaze kod GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 78).



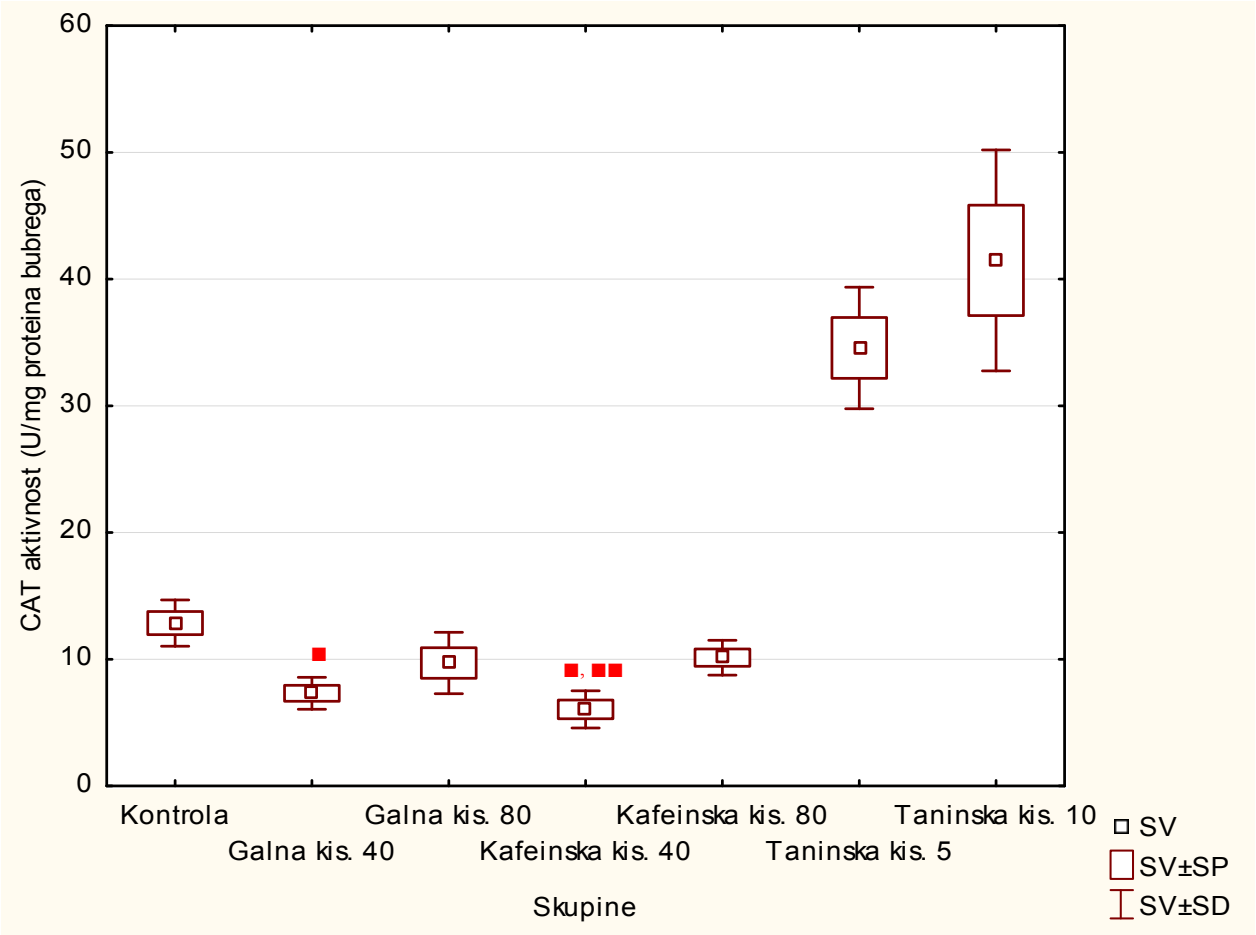
Slika 71. Aktivnost CAT u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$) i između obrađenih skupina: TA 10 mg/kg *vs* CA 80 mg/kg (▲$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



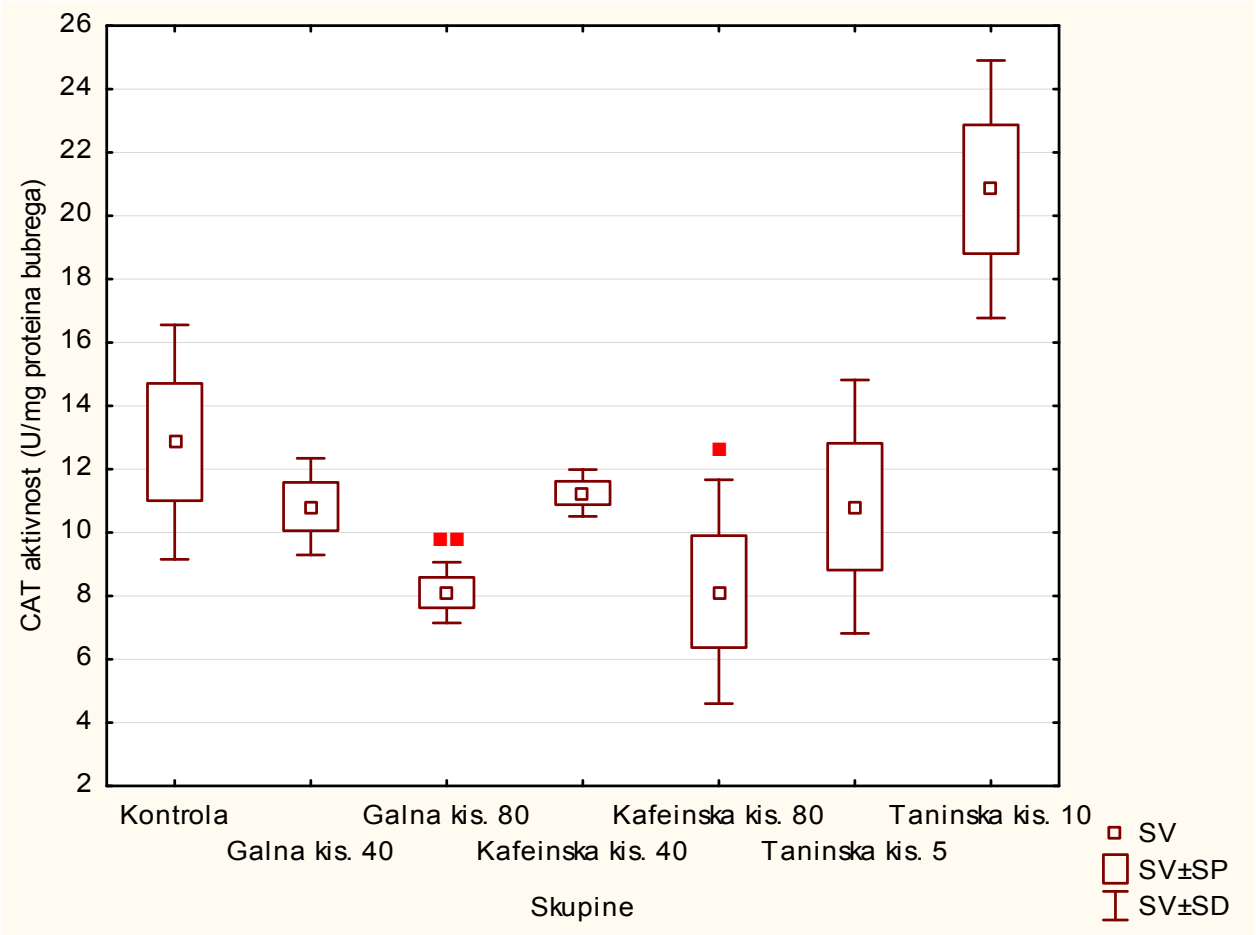
Slika 72. Aktivnost CAT u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: GA 80 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



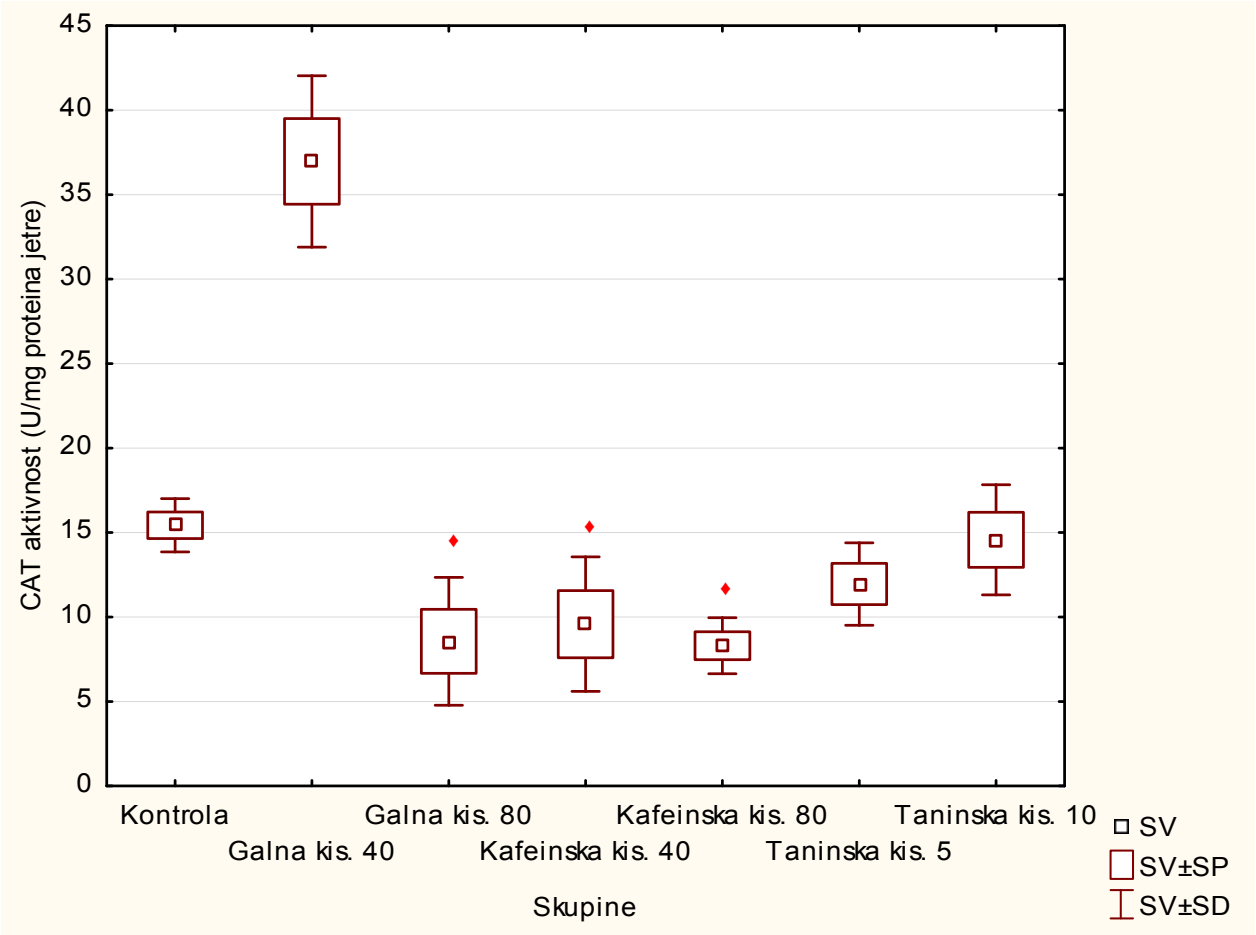
Slika 73. Aktivnost CAT u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg; CA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg kg (■$P < 0{,}05$); CA 40 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■■$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



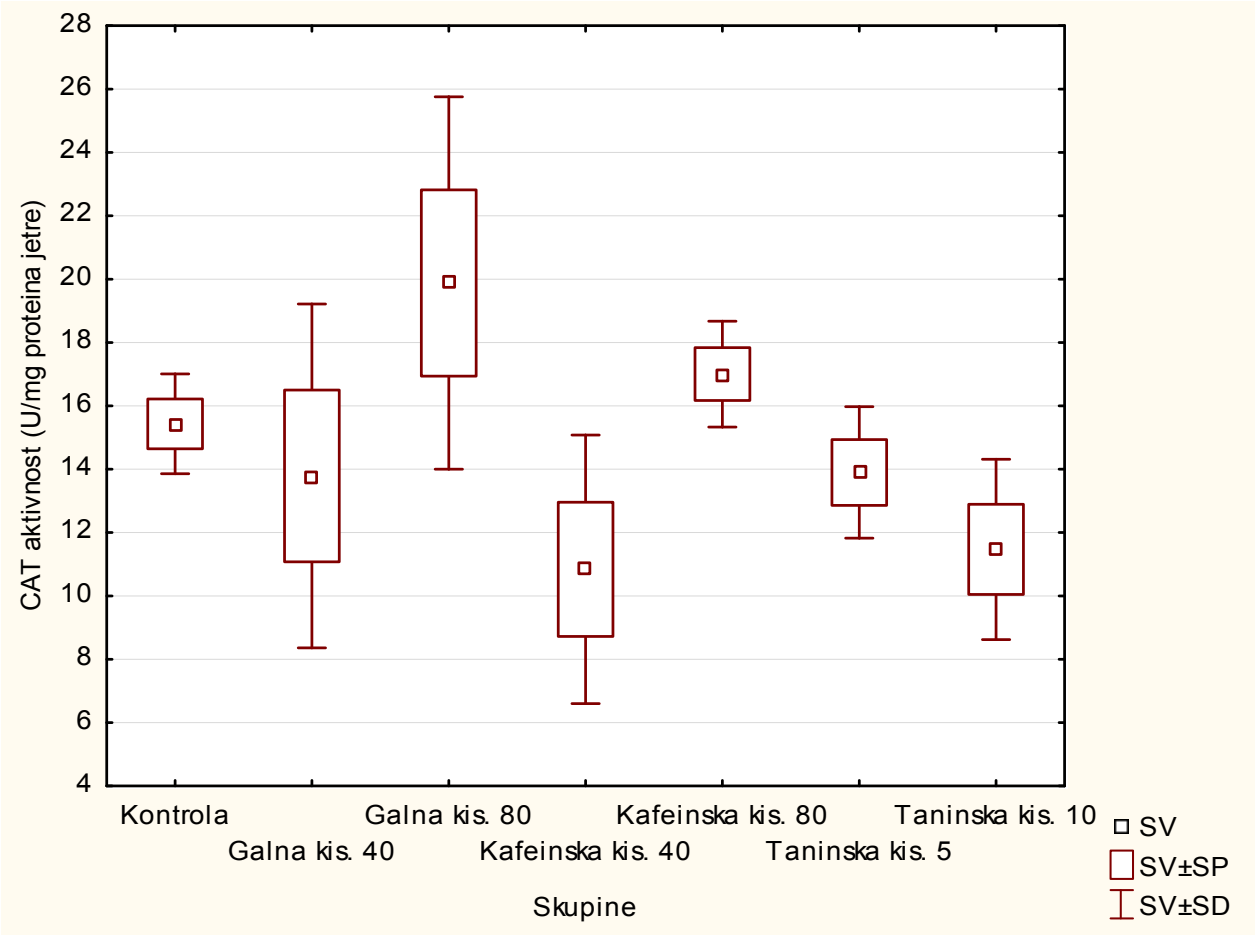
Slika 74. Aktivnost CAT u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: CA 80 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■$P < 0{,}05$); GA 80 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■■$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



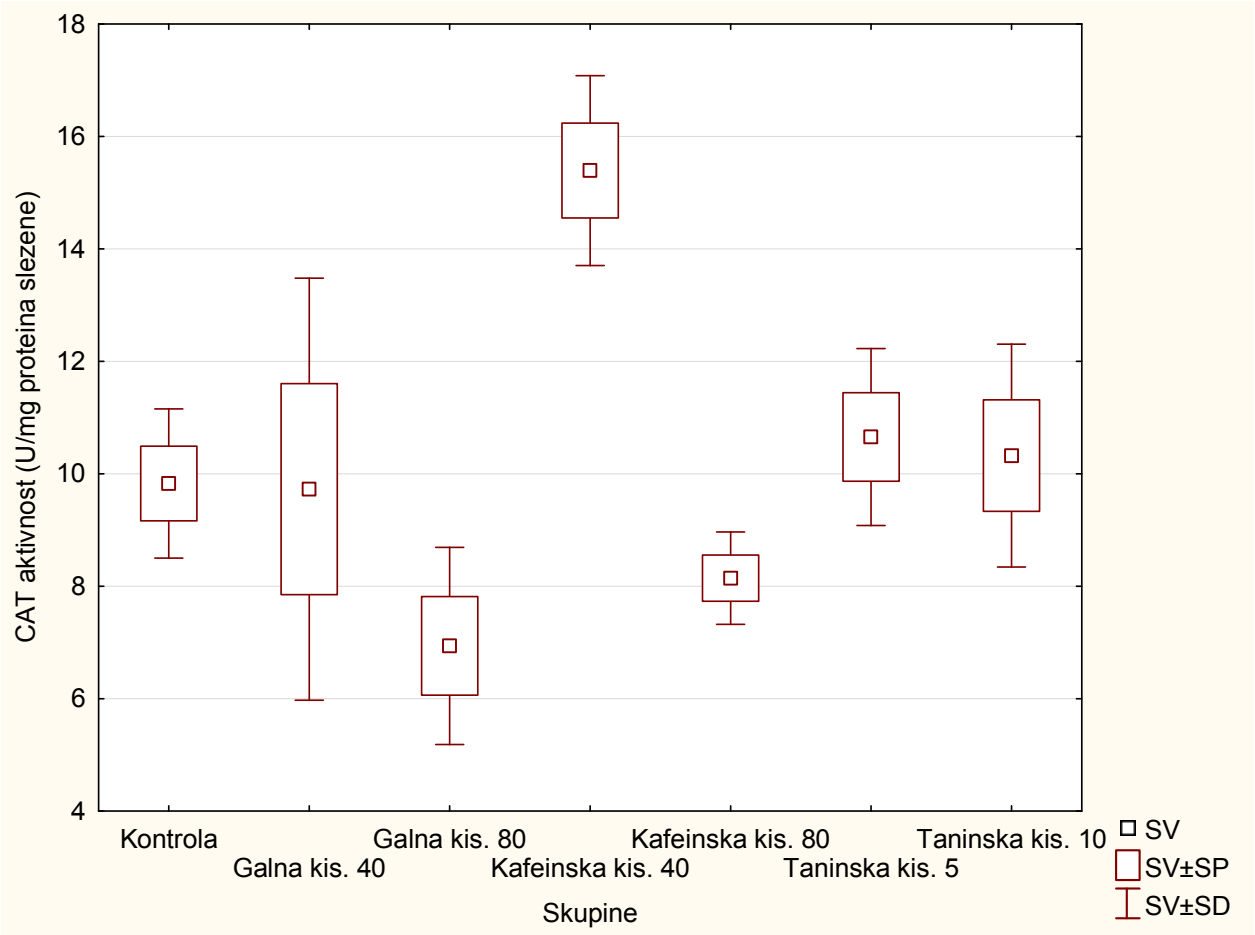
Slika 75. Aktivnost CAT u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 80 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg; CA 40 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg; CA 80 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



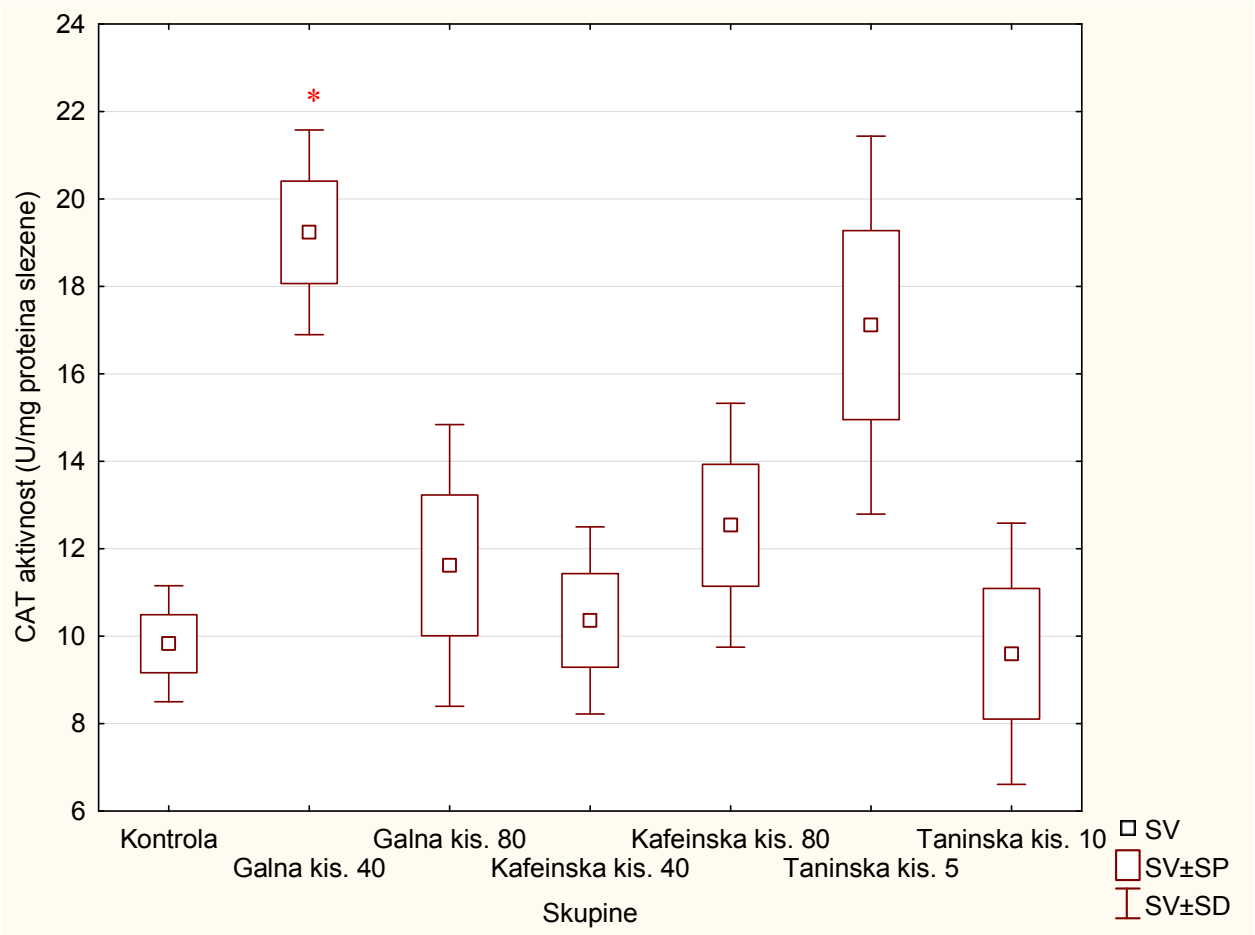
Slika 76. Aktivnost CAT u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



Slika 77. Aktivnost CAT u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: CA 80 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg (▲$P < 0{,}05$); GA 80 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg (▲▲$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

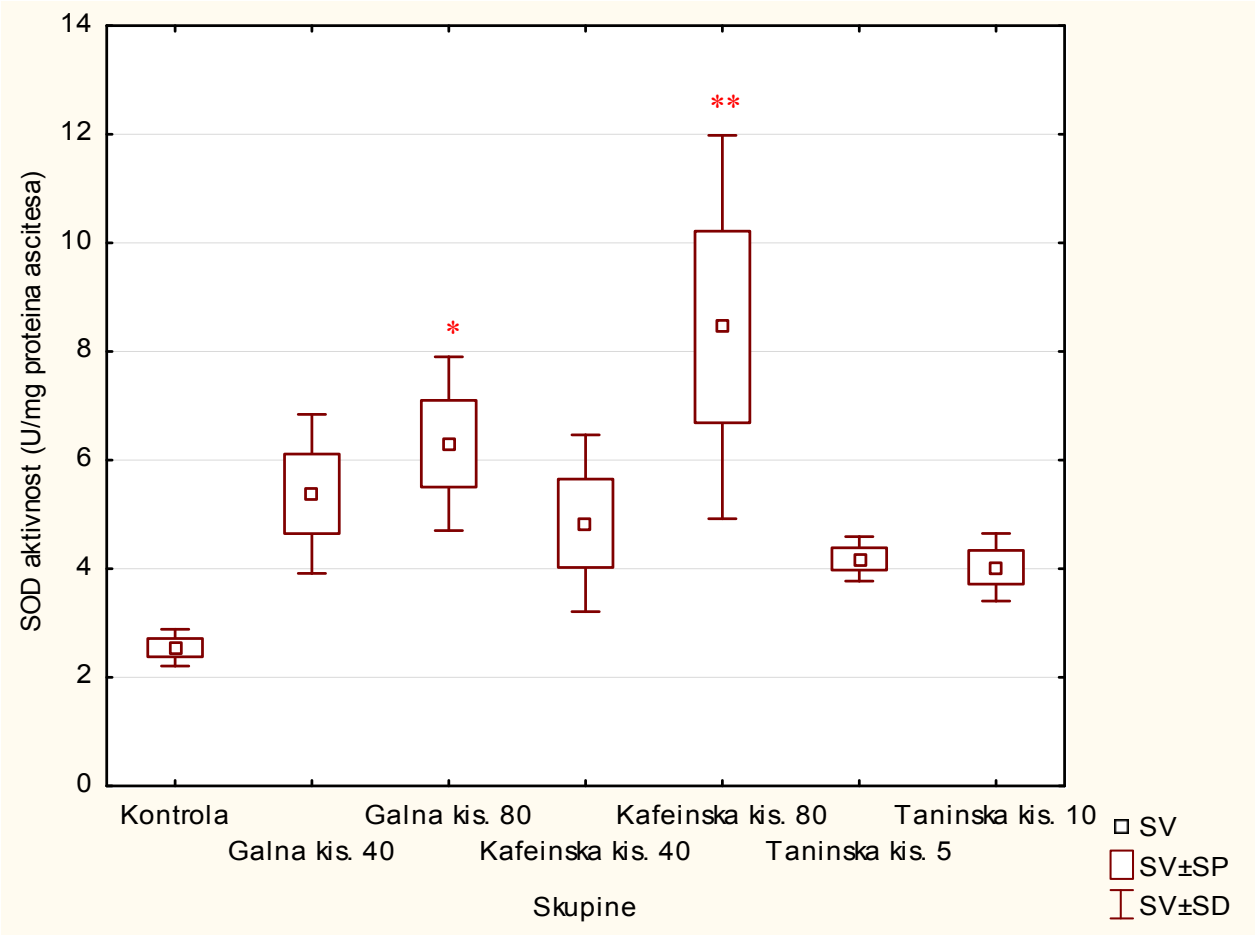


Slika 78. Aktivnost CAT u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

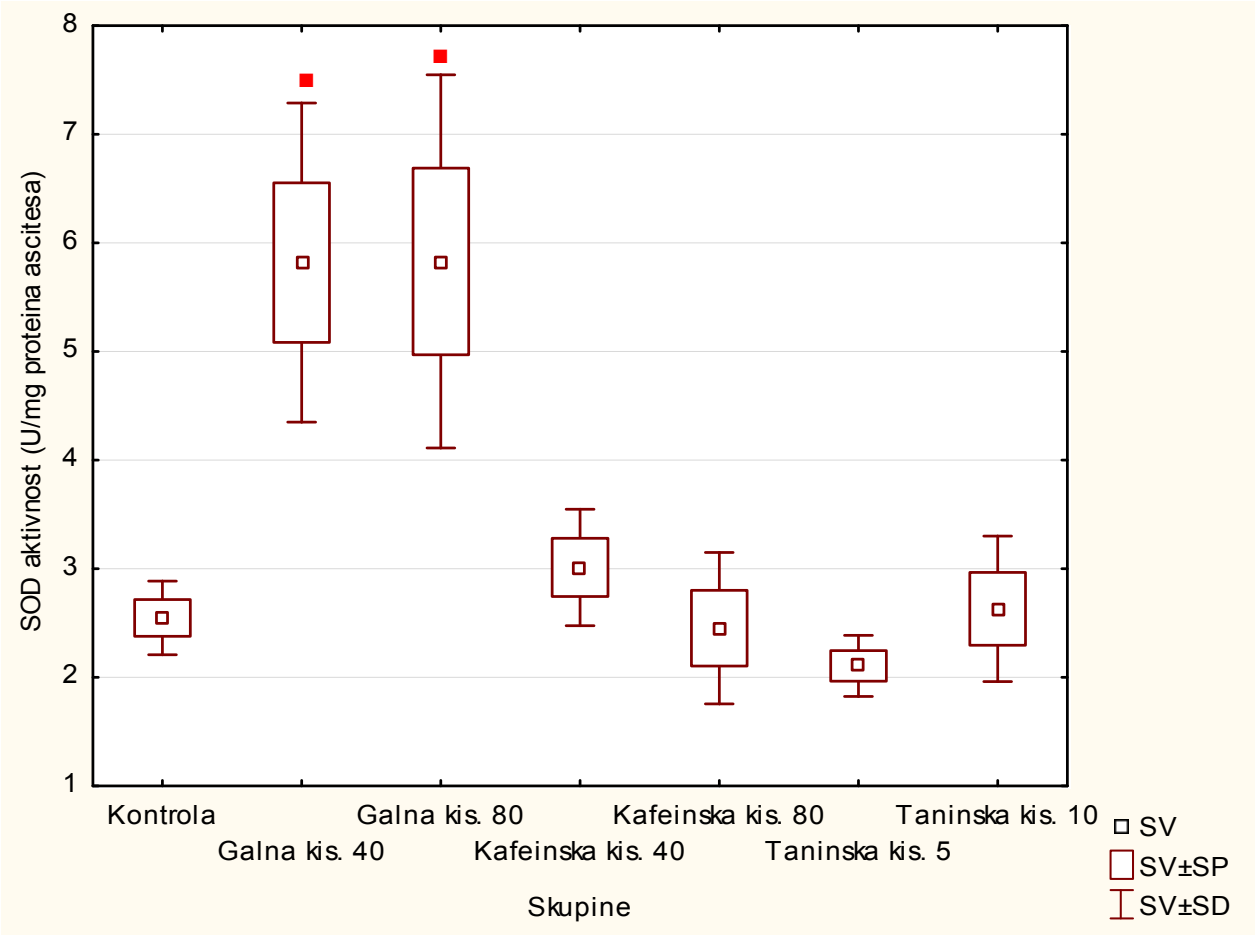
4.4.3. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima

Spektrofotometrijsko određivanje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima ascitesa koji su prikupljeni nakon obrade životinja tijekom 10 dana pokazuju povećanu aktivnost superoksid dismutaze kod GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) i CA 80 mg/kg ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolu (Slika 79), dok je kod tretmana 4X vidljivo samo statistički značajno smanjenje TA 5 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 5 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 80). Rezultati određivanja aktivnosti SOD u uzorku bubrega ukazuju na statistički značajno smanjenje kod TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) kod obrade 4X svaki drugi dan (Slika 82), dok kod obrade 10X uzorci bubrega nisu pokazali nikakvu statističku značajnost u aktivnosti SOD (Slika 81). Uočeno je statistički značajno povećanje aktivnosti SOD u uzorcima jetre kod skupine GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) tijekom obrade 10 dana (Slika 83), a kod obrade miševa 4X rezultati ukazuju na manju aktivnost kod CA 80 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 84). U uzorku slezene dobivenog nakon obrade 10X SOD aktivnost je statistički značajno viša kod skupine TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu (Slika 85), dok je kod obrade 4X statistički značajno veća aktivnost SOD kod TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 86).



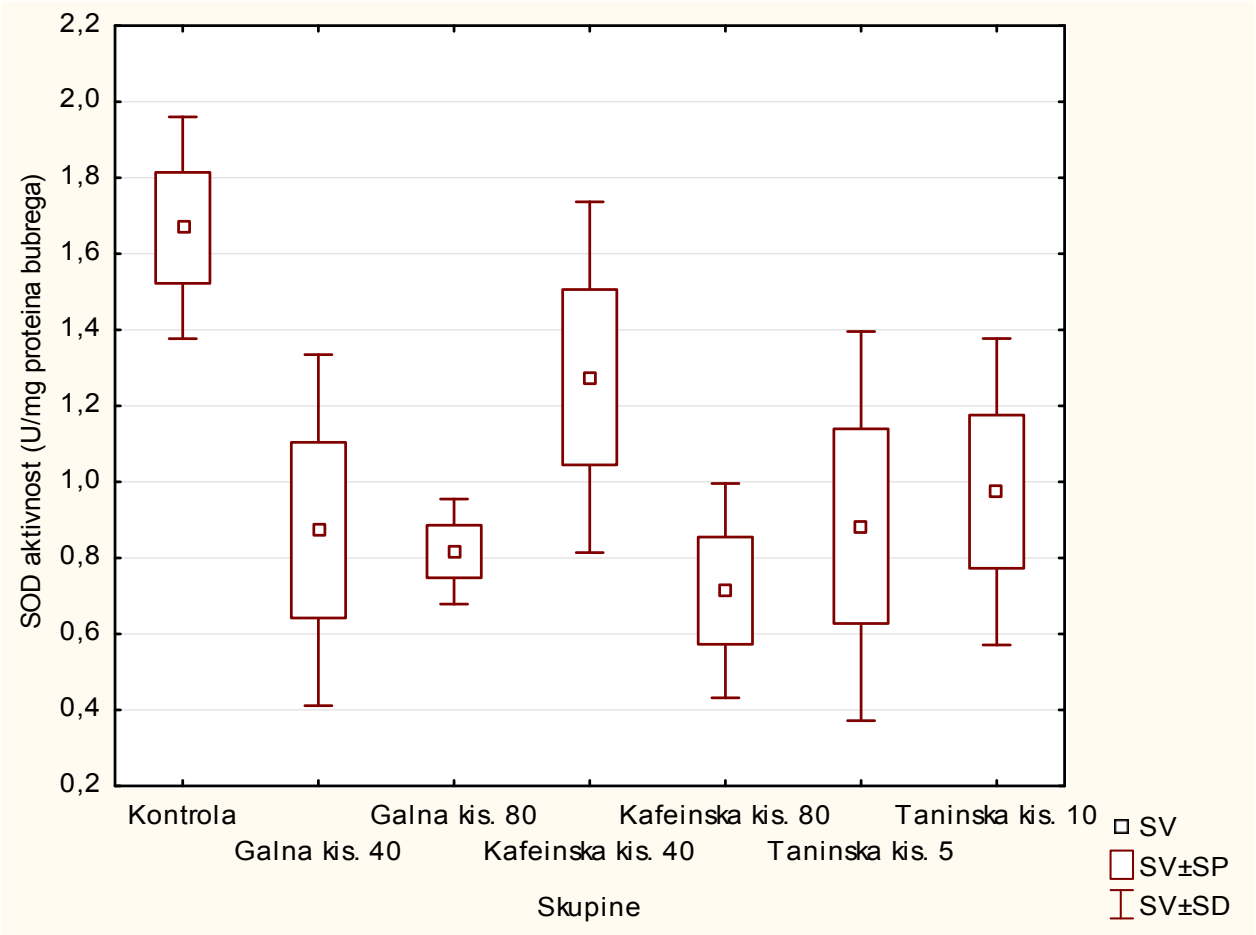
Slika 79. Aktivnost SOD u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



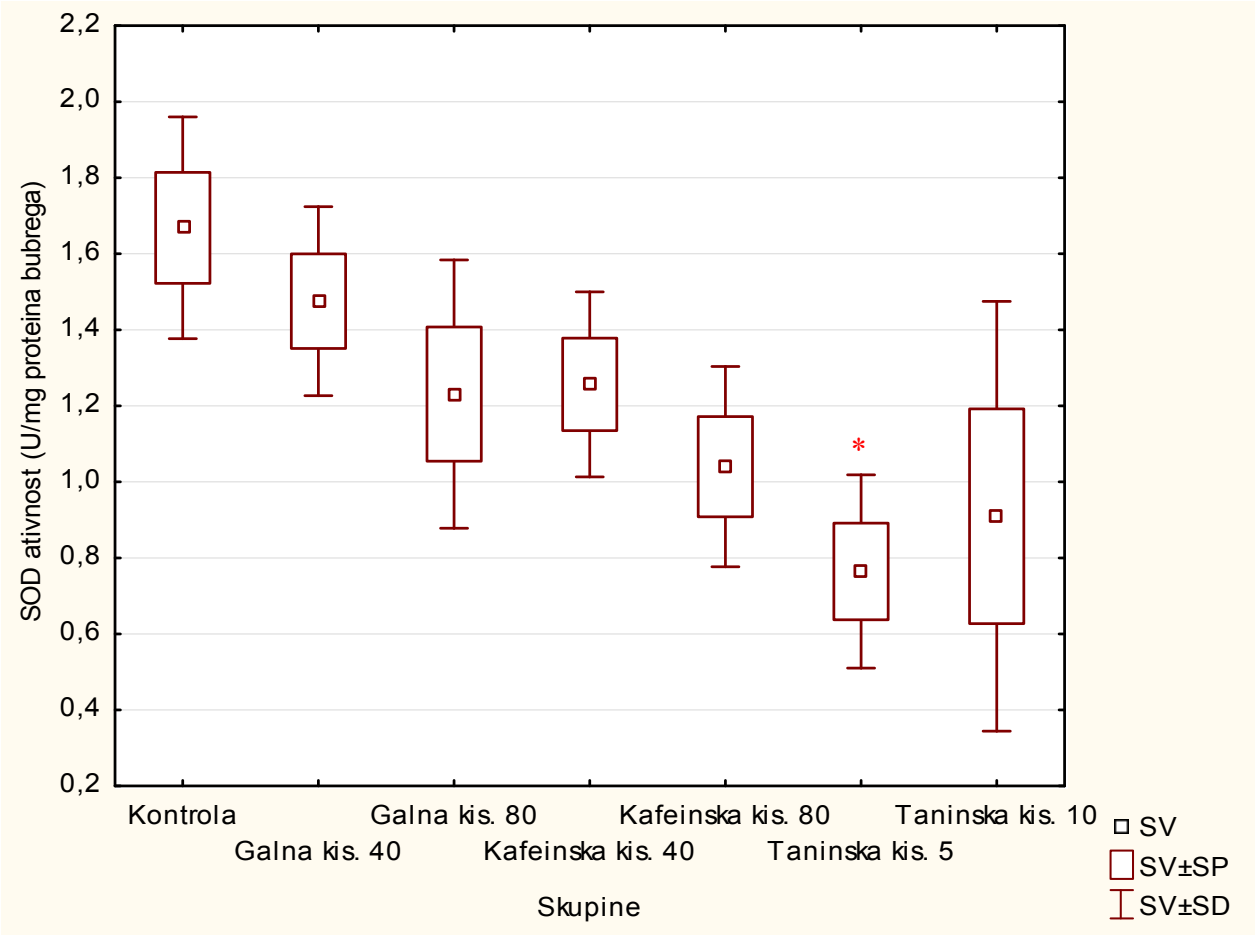
Slika 80. Aktivnost SOD u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$); GA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



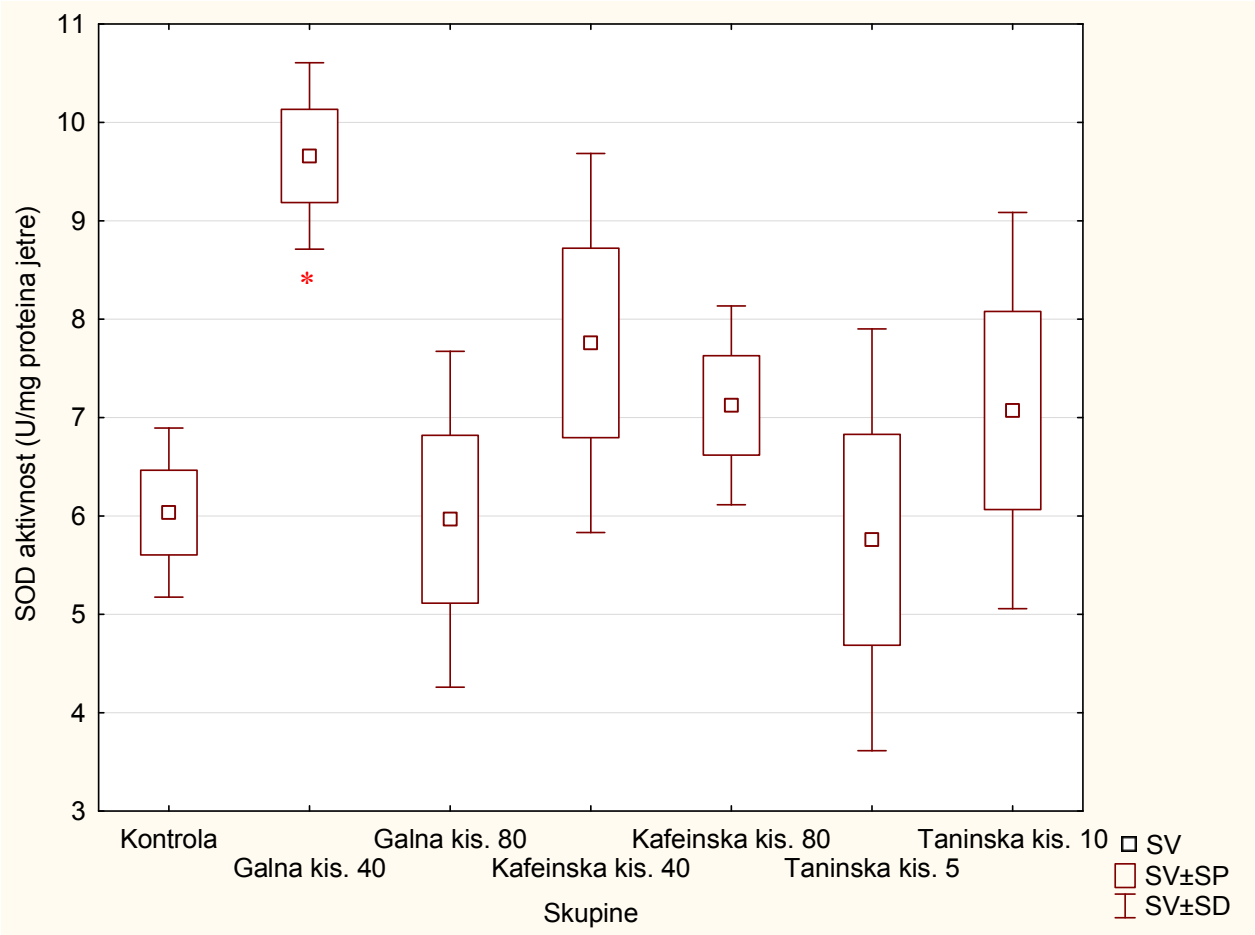
Slika 81. Aktivnost SOD u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



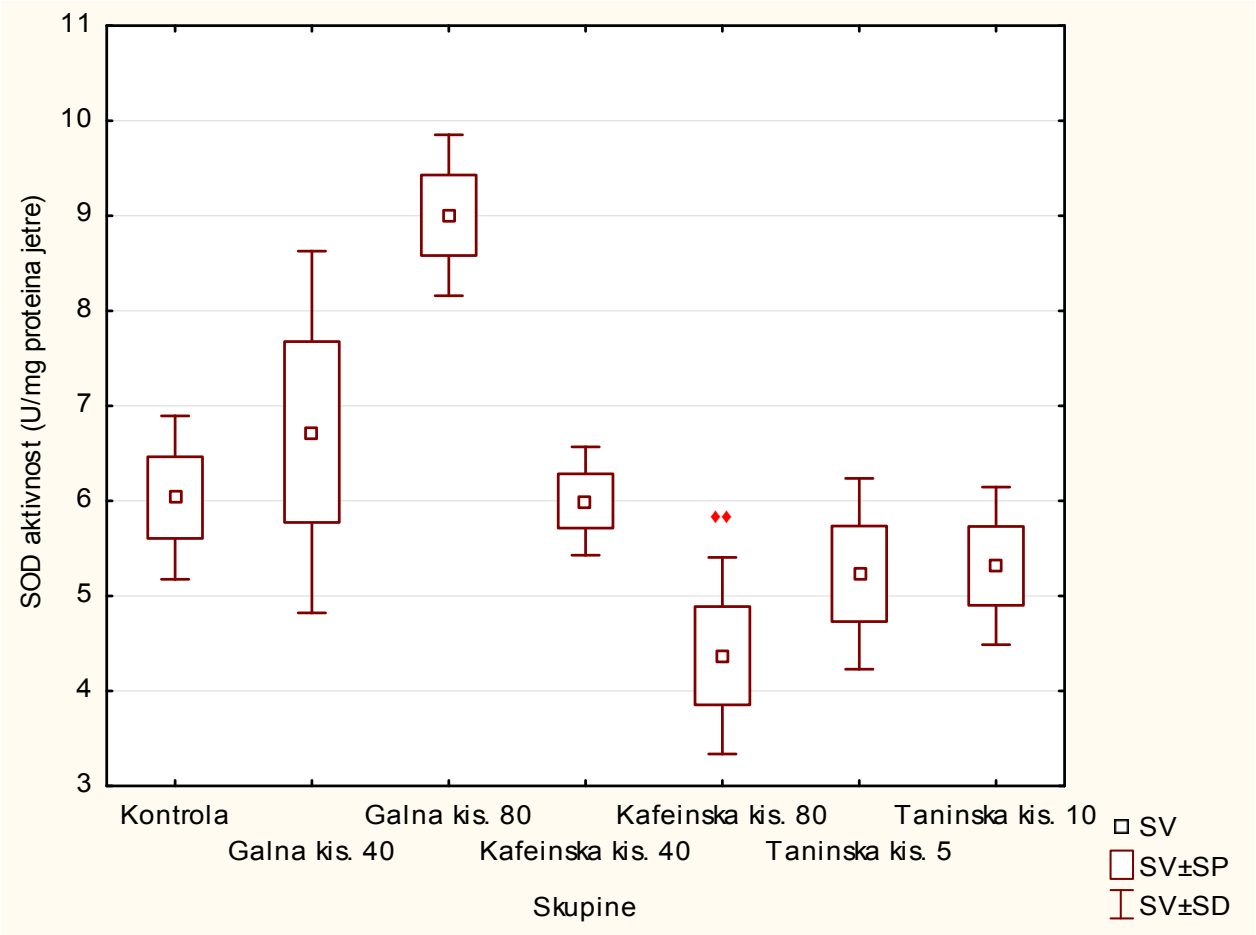
Slika 82. Aktivnost SOD u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



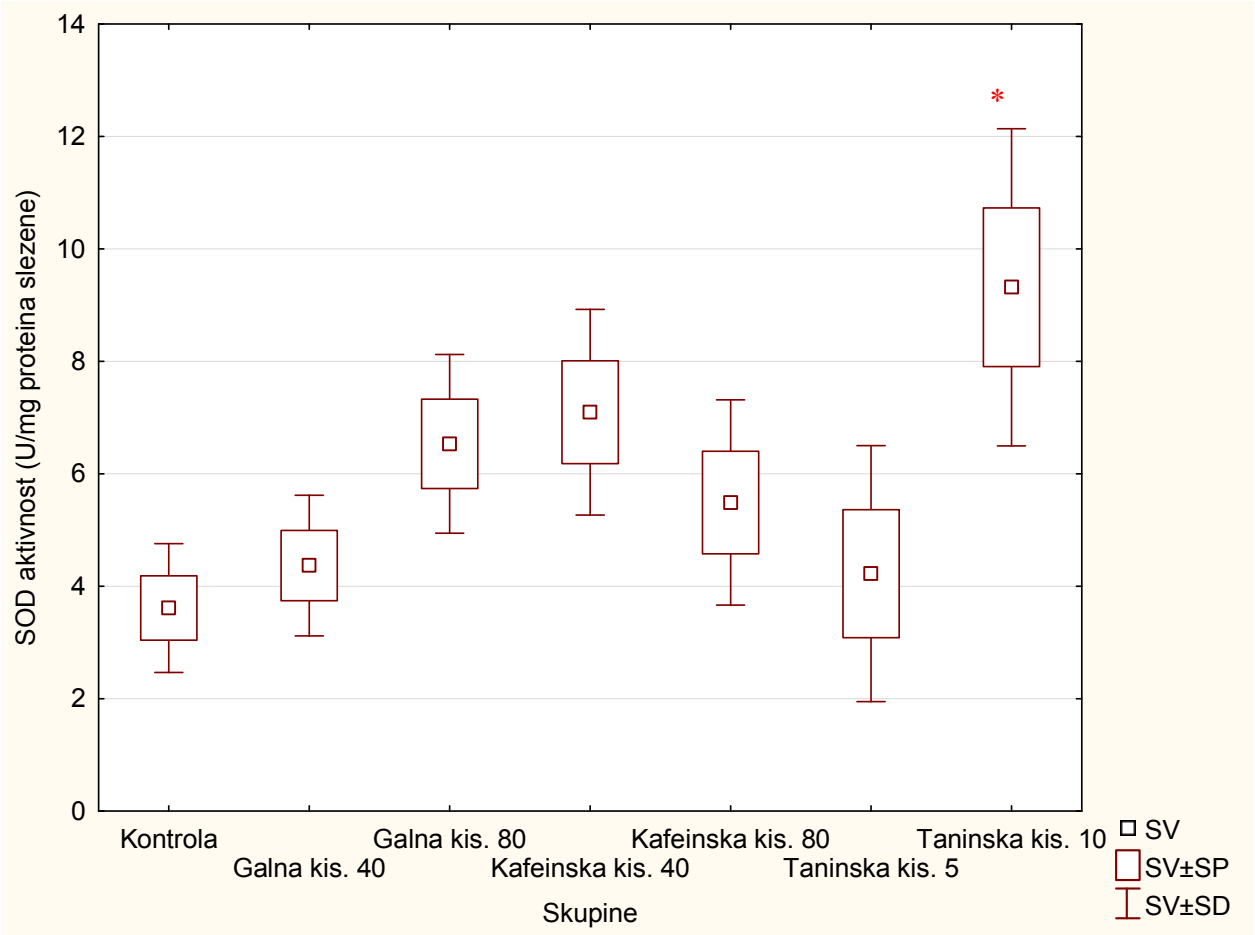
Slika 83. Aktivnost SOD u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



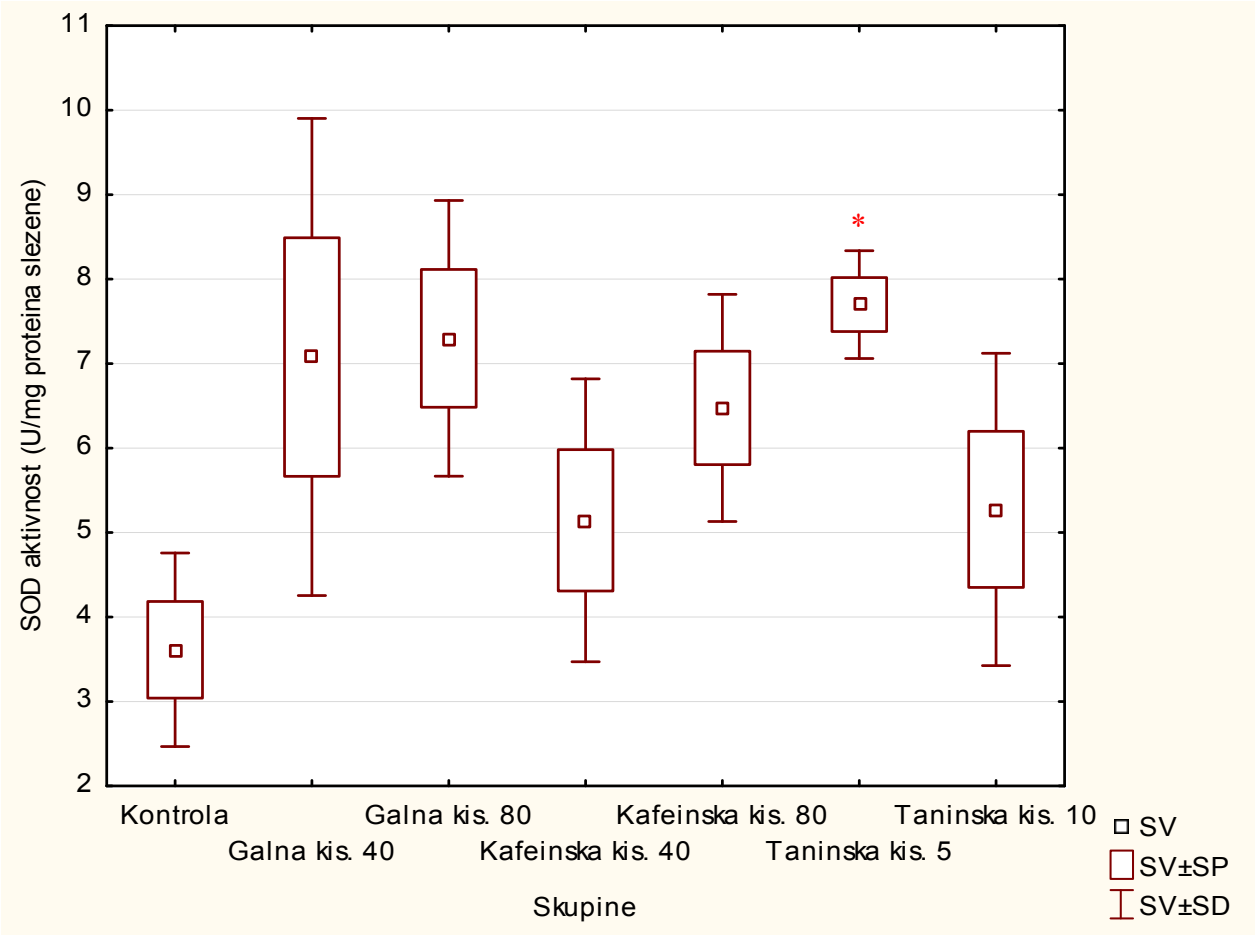
Slika 84. Aktivnost SOD u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: CA 80 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦♦$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



Slika 85. Aktivnost SOD u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

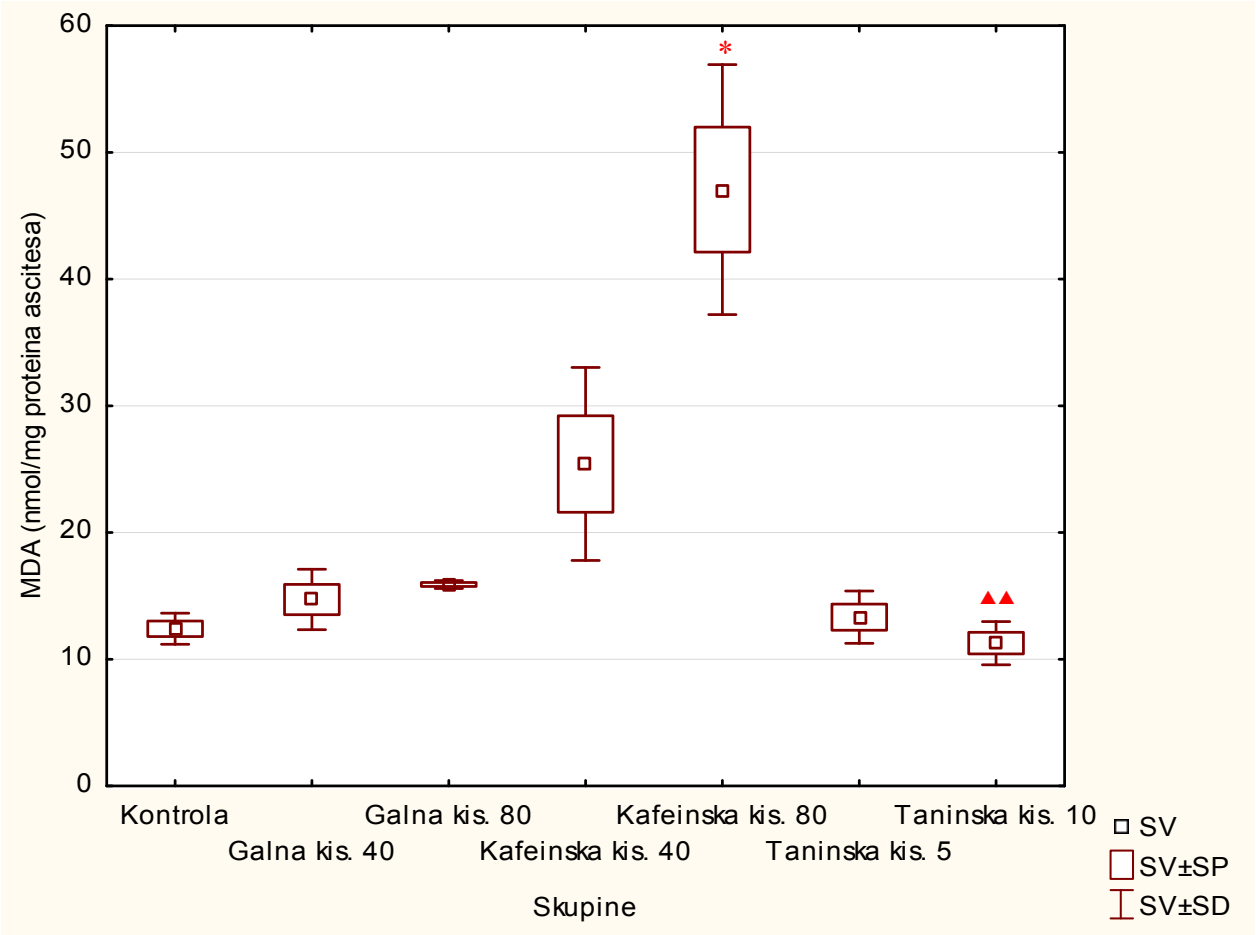


Slika 86. Aktivnost SOD u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

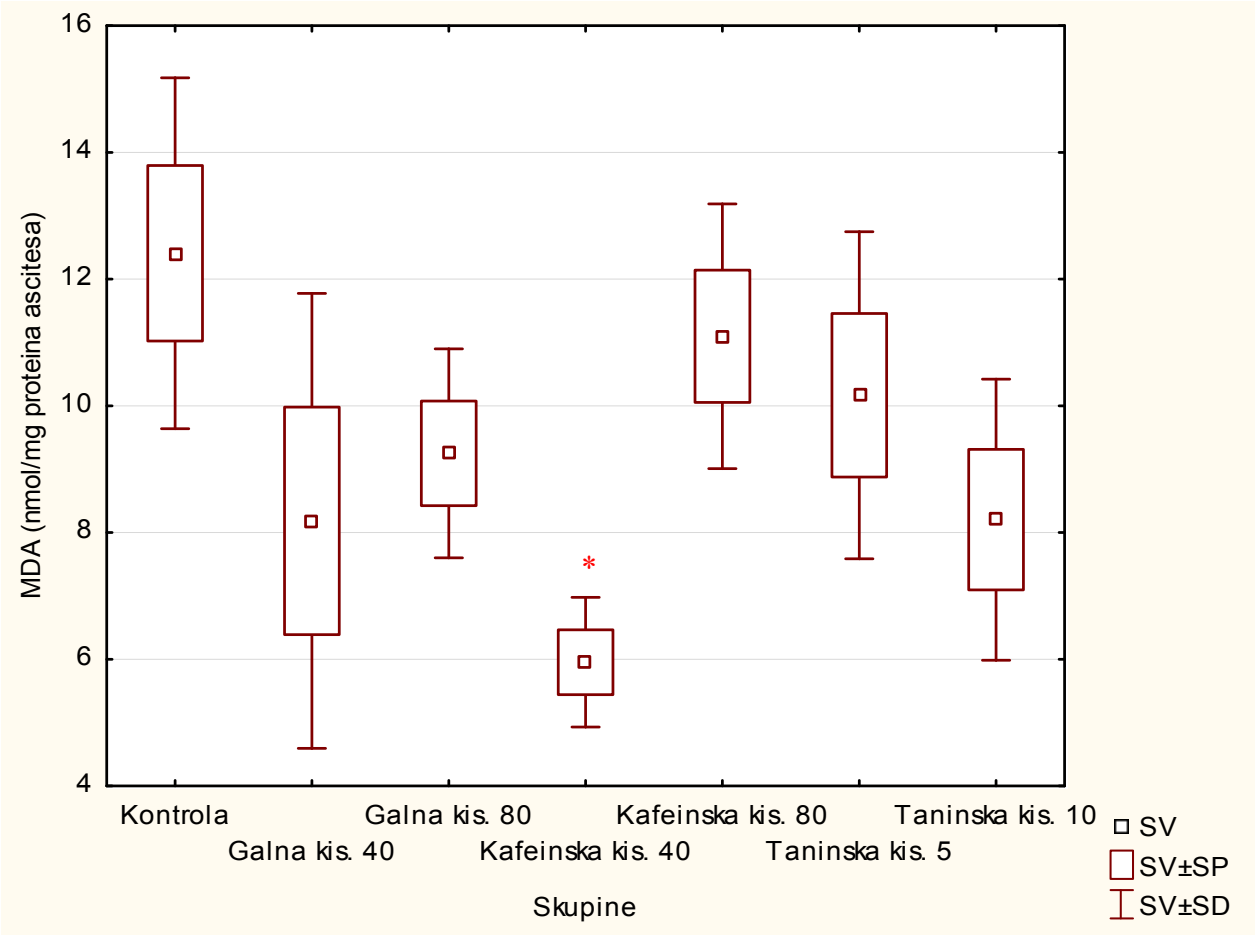
4.4.4. Koncentracija lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima

Rezultati mjerenja koncentracije lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima ascitesa dobivenim nakon obrade miševa 10X ukazuju na statističko povećanje koncentracije MDA kod CA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) dok je kod skupine TA 10 mg/kg značajno smanjenje koncentracije MDA u odnosu na CA 80 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 87). Kod obrade miševa 4X svaki drugi dan u uzorcima ascitesa uočeno je statističko značajno smanjenje kod CA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 88). U uzorcima bubrega dobivenim nakon obrade 10X svaki dan nije uočena nikakva statistička razlika (Slika 89), dok kod obrade miševa 4X uzorci bubrega kod skupine TA 10 mg/kg pokazuju statistički manju koncentraciju MDA u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 90). Jetra obrađena 10X svaki dan pokazuje značajno smanjenje koncentracije MDA kod TA 5 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$), zatim kod TA 10 mg/kg u odnosu na CA 40 mg/kg ($P < 0,05$) te TA 10 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 91), dok kod obrade miševa nositelja EAT-a s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan nisu uočene nikakve statističke značajnosti (Slika 92). Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorku slezene tijekom 10 dana obrade fenolnim kiselinama pokazuju značajno nižu koncentraciju MDA kod CA 80 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 93), dok rezultati obrade miševa 4X s TA 10 mg/kg pokazuju značajno smanjenje koncentracije MDA u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 94).



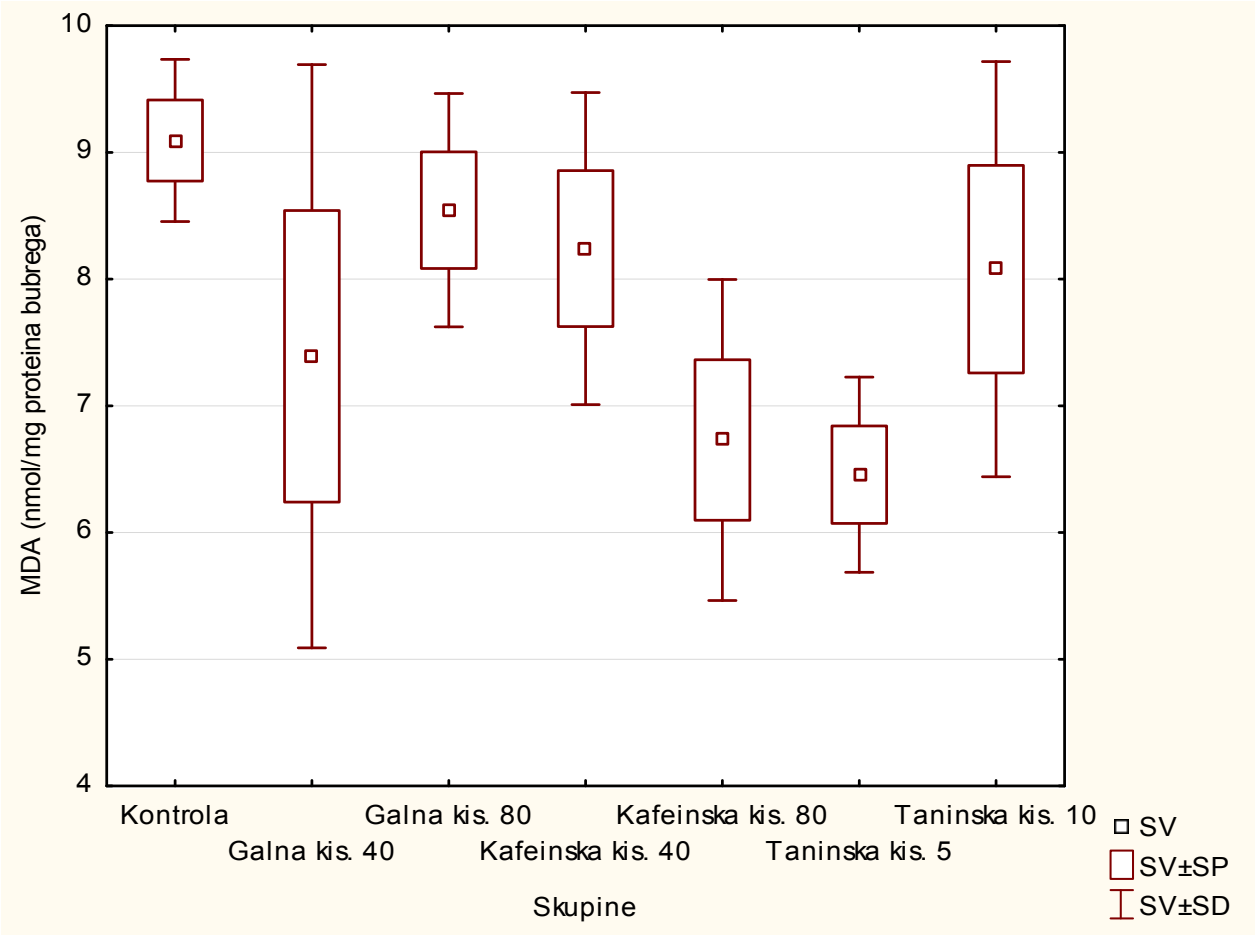
Slika 87. Koncentracija MDA u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: TA 10 mg/kg *vs* CA 80 mg/kg (▲▲$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



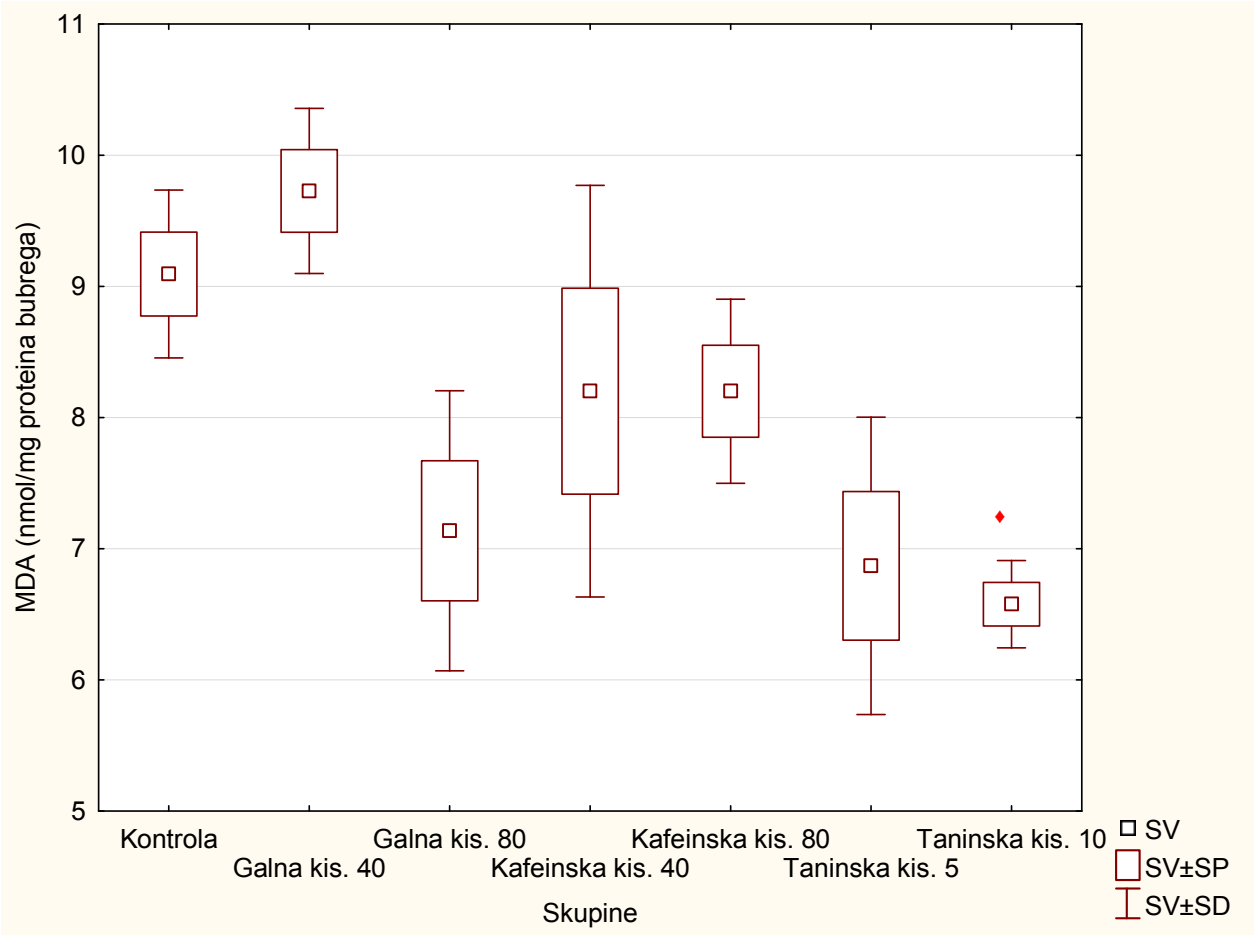
Slika 88. Koncentracija MDA u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: CA 40 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



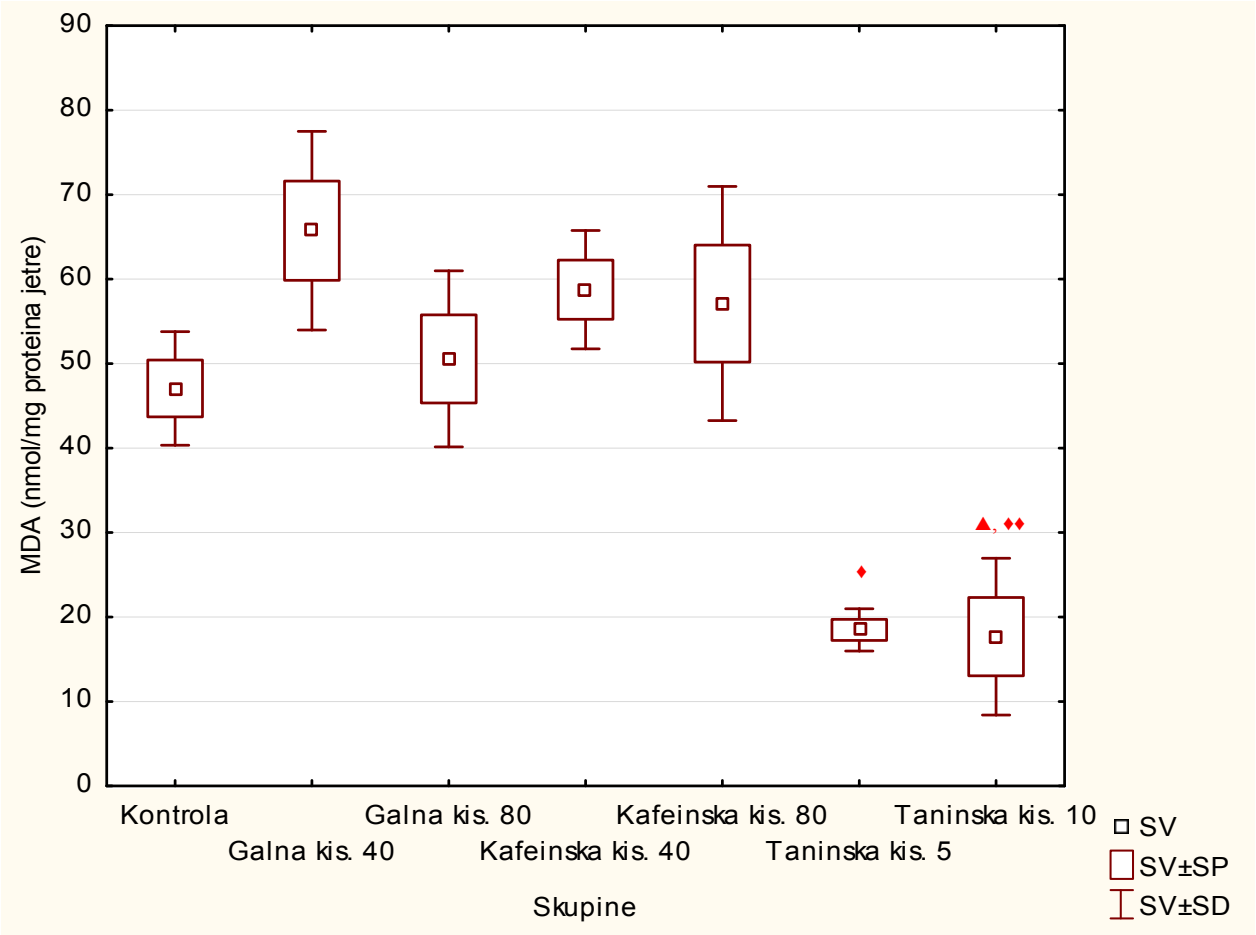
Slika 89. Koncentracija MDA u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



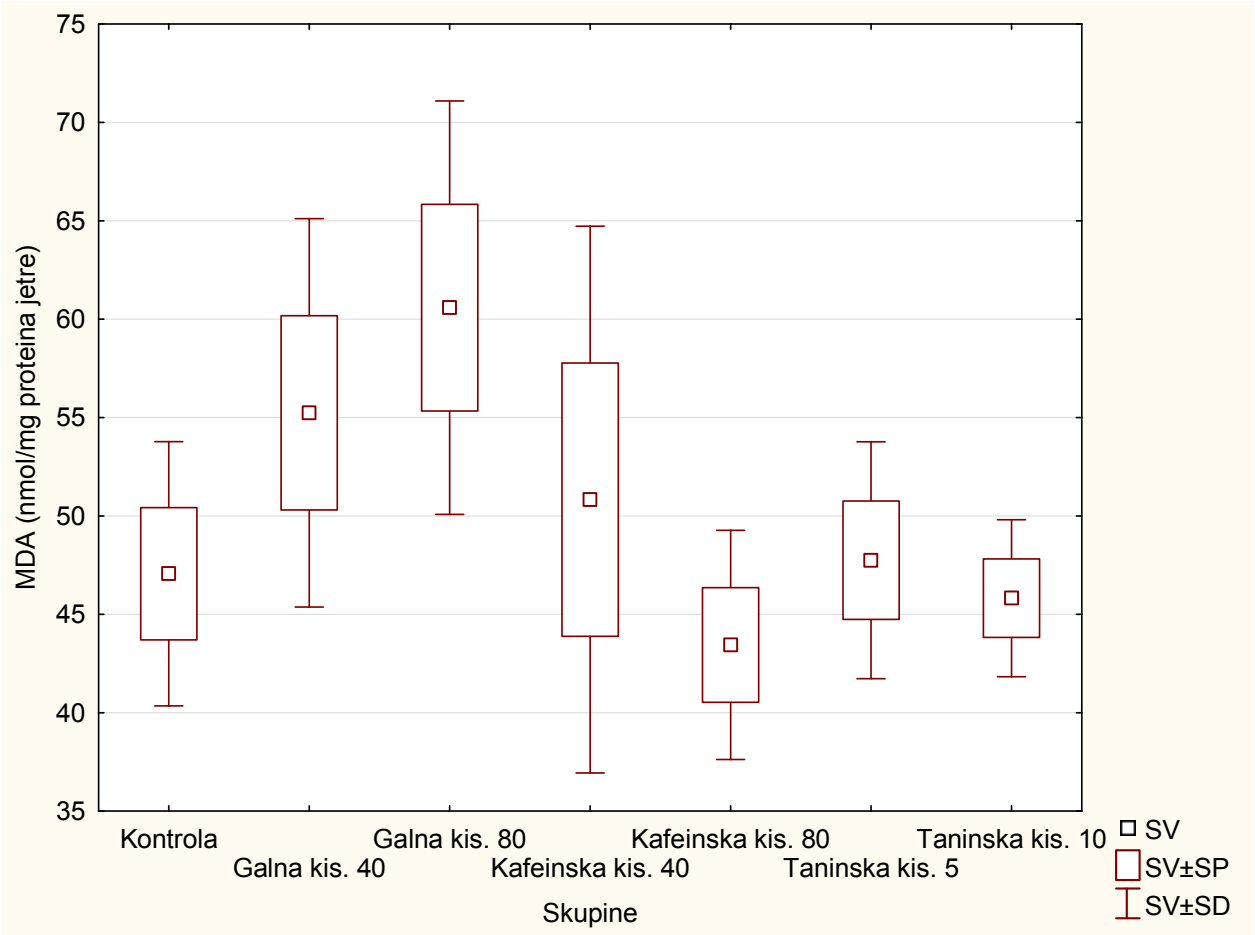
Slika 90. Koncentracija MDA u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: TA 10 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



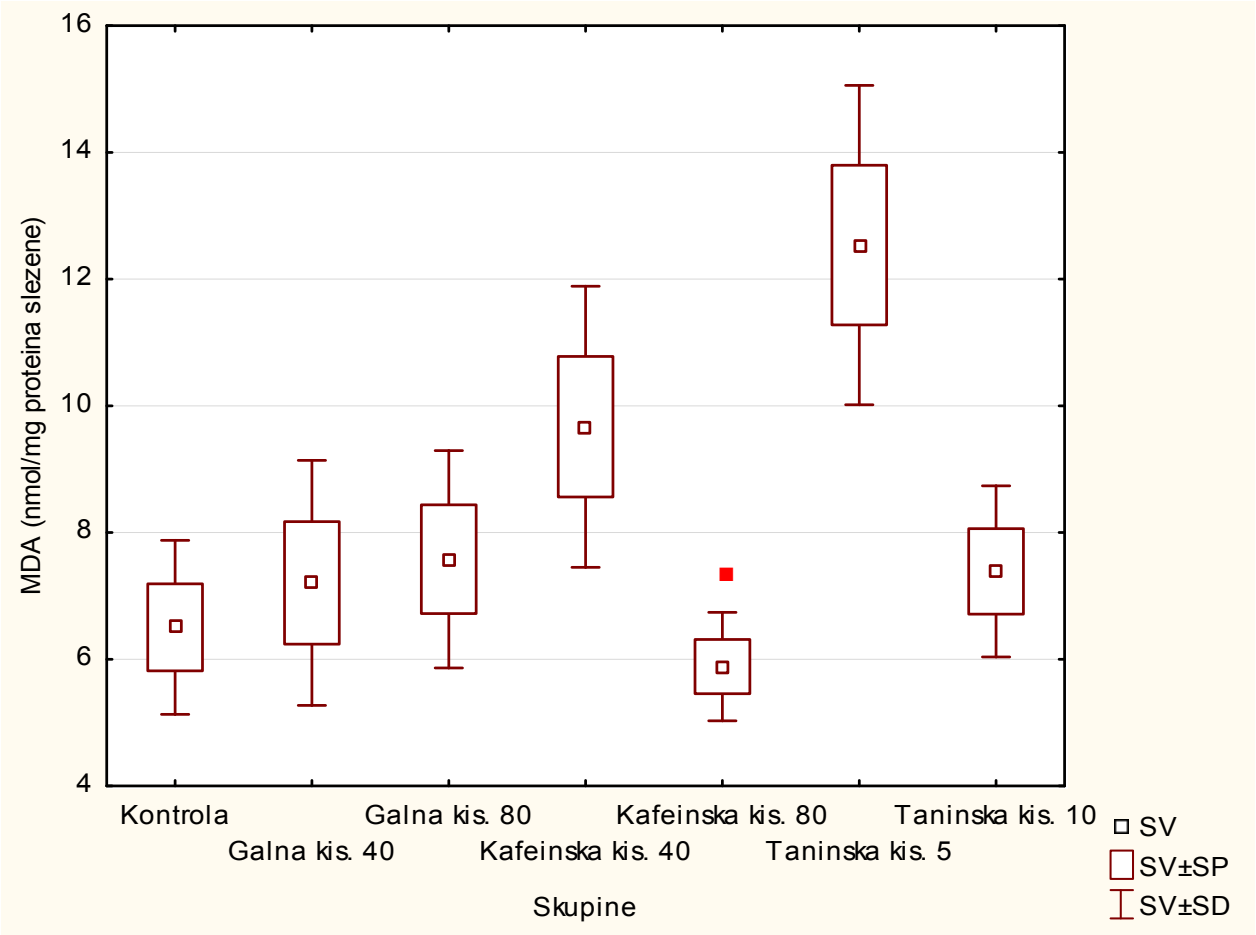
Slika 91. Koncentracija MDA u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$); TA 10 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg (▲$P < 0{,}05$); TA 10 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦♦$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



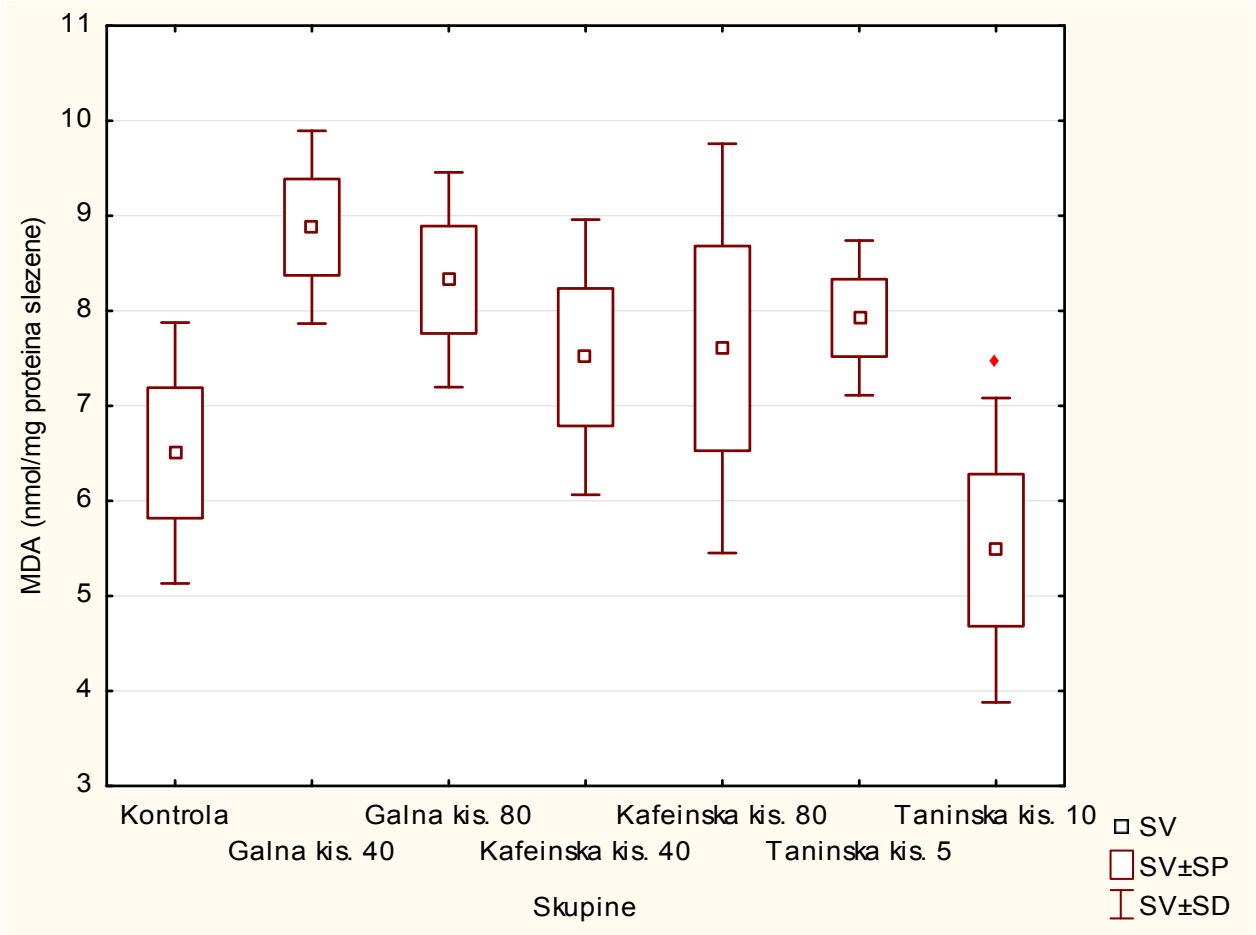
Slika 92. Koncentracija MDA u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



Slika 93. Koncentracija MDA u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: CA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



Slika 94. Koncentracija MDA u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=4) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: TA 10 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.5. UČINAK FENOLNIH KISELINA NA POLARIZACIJU MAKROFAGA

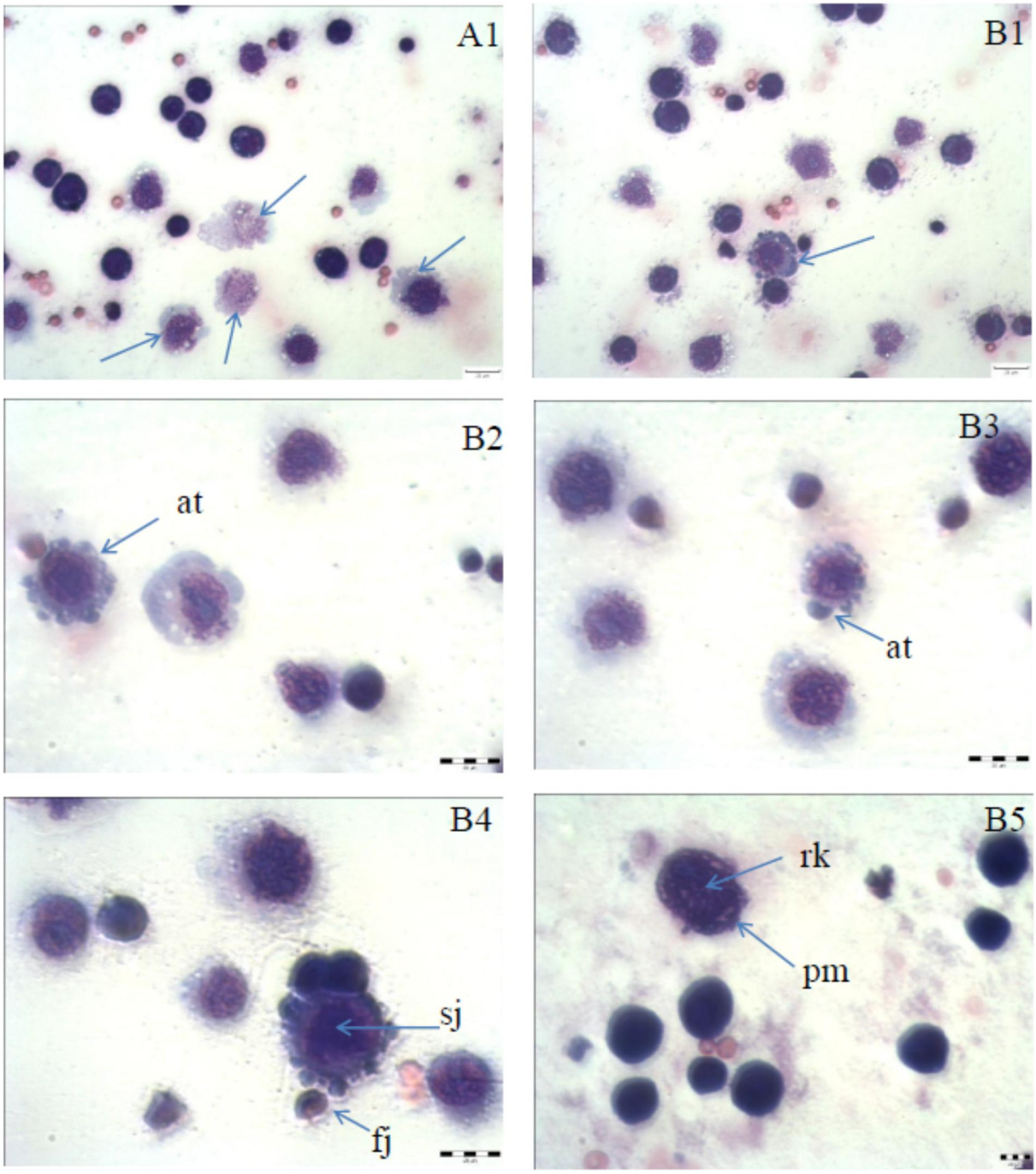
Tijekom napredovanja tumora, tumor aktivno privlači (regrutira) monocite i makrofage iz cirkulacije u tumor, gdje makrofagi u nazočnosti raznih mikrookolišnih signalnih molekula tumora i stromalnih stanica mijenjaju mikrookoliš tumora i ubrzavaju njegov rast. Osim fenotipa, makrofagi mijenjaju svoju funkciju; dolazi do tzv. polarizacije makrofaga od klasičnih M1 u alternativne M2 makrofage. M1 makrofagi uključeni su u upalni odgovor stvaranjem proupalnih citokina i reaktivnih vrsta molekula, zatim u prepoznavanje antigena, uništavanje patogena fagocitozom, mikrobicidno djelovanje i protutumorsku imunost. Nasuprot tome, M2 makrofagi i njima srodni tumoru pridruženi makrofagi (TAMs) utječu na protuupalni odgovor, zacjeljivanje rana i angiogenezu, te imaju prokarcinogene i imunomodulatorske značajke.

Pokazalo se je da proizvodnja reaktivnih vrsta kisika, koja je inače ključna u aktivaciji i funkcioniranju M1 makrofaga, nužna i za diferencijaciju M2 makrofaga i TAMs te da primjena antioksidativne terapije sprječava diferencijaciju TAMs i tumorigenezu u mišjim modelima raka. Makrofagi pridruženi tumoru (TAMs) podsjećaju na M2-polarizirane makrofage te su kritični modulatori okoline tumora, osiguravaju povoljno mikrookruženje za rast i razvoj tumora kroz pojačanu angiogenezu i imunosupresiju budući da se je pokazalo da dolazi do povećanja aktivnosti Arg-1, a smanjuje se aktivnost iNOS. Ove imunosupresivne stanice usko su povezane s lošom prognozom oboljelih od raka. Također, TAMs imaju slabi antigen-predočni kapacitet, a brojnim supresivnim čimbenicima smanjuju aktivnost citotoksičnih stanica T i NK stanica dok brojni čimbenici rasta i kemokina, proteaze te drugi čimbenici pojačavaju angiogenezu i progresiju tumora. Stoga, TAMs kao potencijalne ciljne stanice, su novi pristup u liječenju raka.

Temeljem navedenog učinak fenolnih kiselina na polarizaciju M1/M2 makrofaga iskazali smo kroz analizu funkcionalne aktivnosti makrofaga, mjerenje razine dušikova(II) oksida (NO) i enzimske aktivnosti Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima slezene i ascitesa, zatim u nestimuliranim makrofagima ascitesa te nadtalogu stanica tumora.

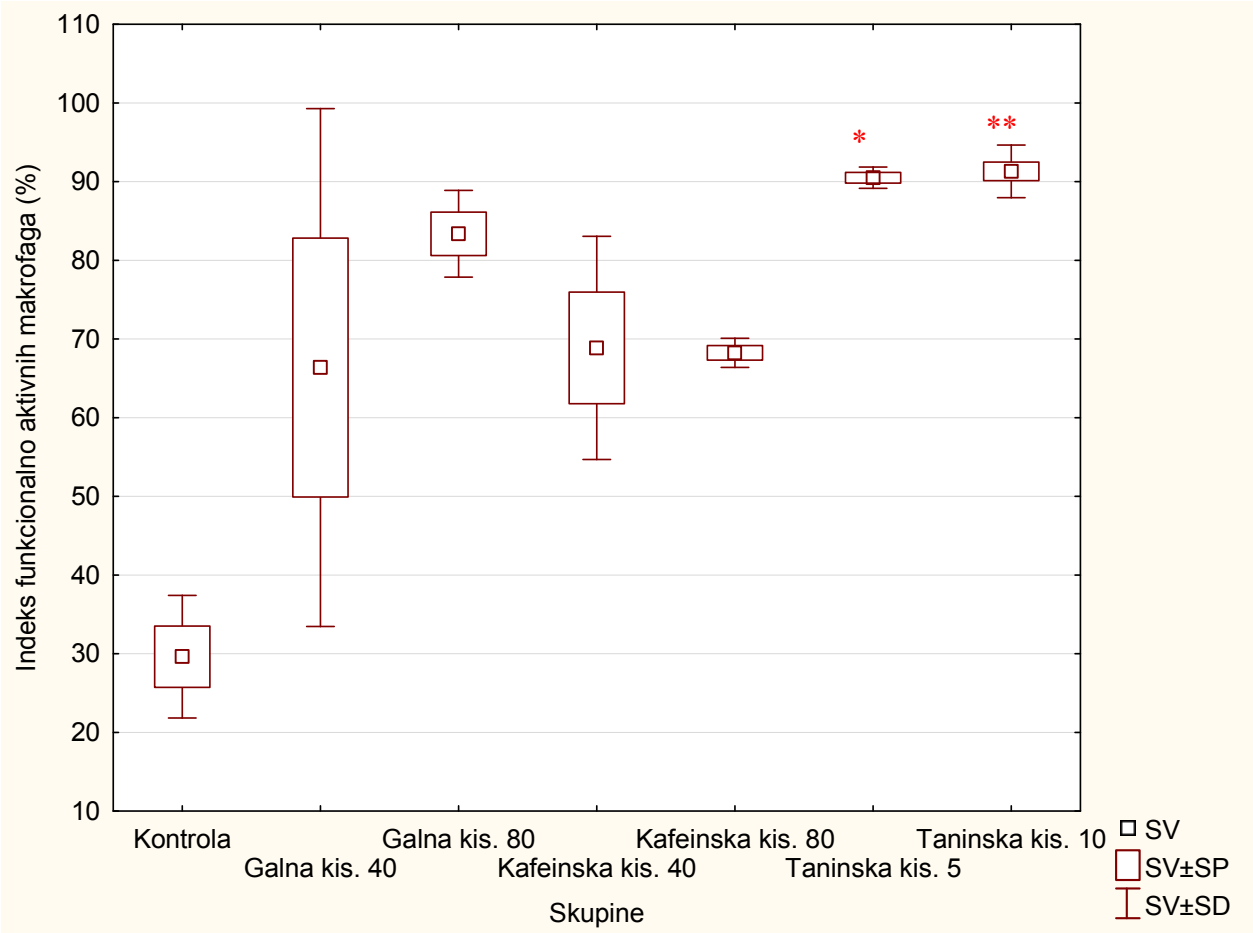
4.5.1. Funkcionalna aktivnost makrofaga iz peritonealne tekućine

Rezultati analize određivanja funkcionalne aktivnosti makrofaga kod miševa nositelja EAT-a koji su obrađeni s fenolnim kiselinama (galna, kafeinska i taninska kiselina) tijekom 10 dana svaki dan ukazuju da povećanje postotnog udjela indeksa aktiviranih makrofaga kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu, s time da je statistički značajno povećanje uočeno kod skupine TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 10 mg/kg ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolu (Slika 96 i 98). I kod obrade miševa od 5. dana svaki drugi dan kada je tumor u uznapredovaloj fazi rasta uočena je ista pojava povećanja udjela indeksa funkcionalno aktiviranih makrofaga (Slika 97 i 99), ali je to povećanje nešto veće kod svih obrađenih skupina nego kod uzastopne obrade miševa tijekom 10 dana. Na Slici 95 prikazan je učinak CA na tumorocidnu aktivnost makrofaga (Slika 95 A1) i pokretanje procesa apoptoze (Slika 95 B1-B5) tijekom 10 dana obrade.



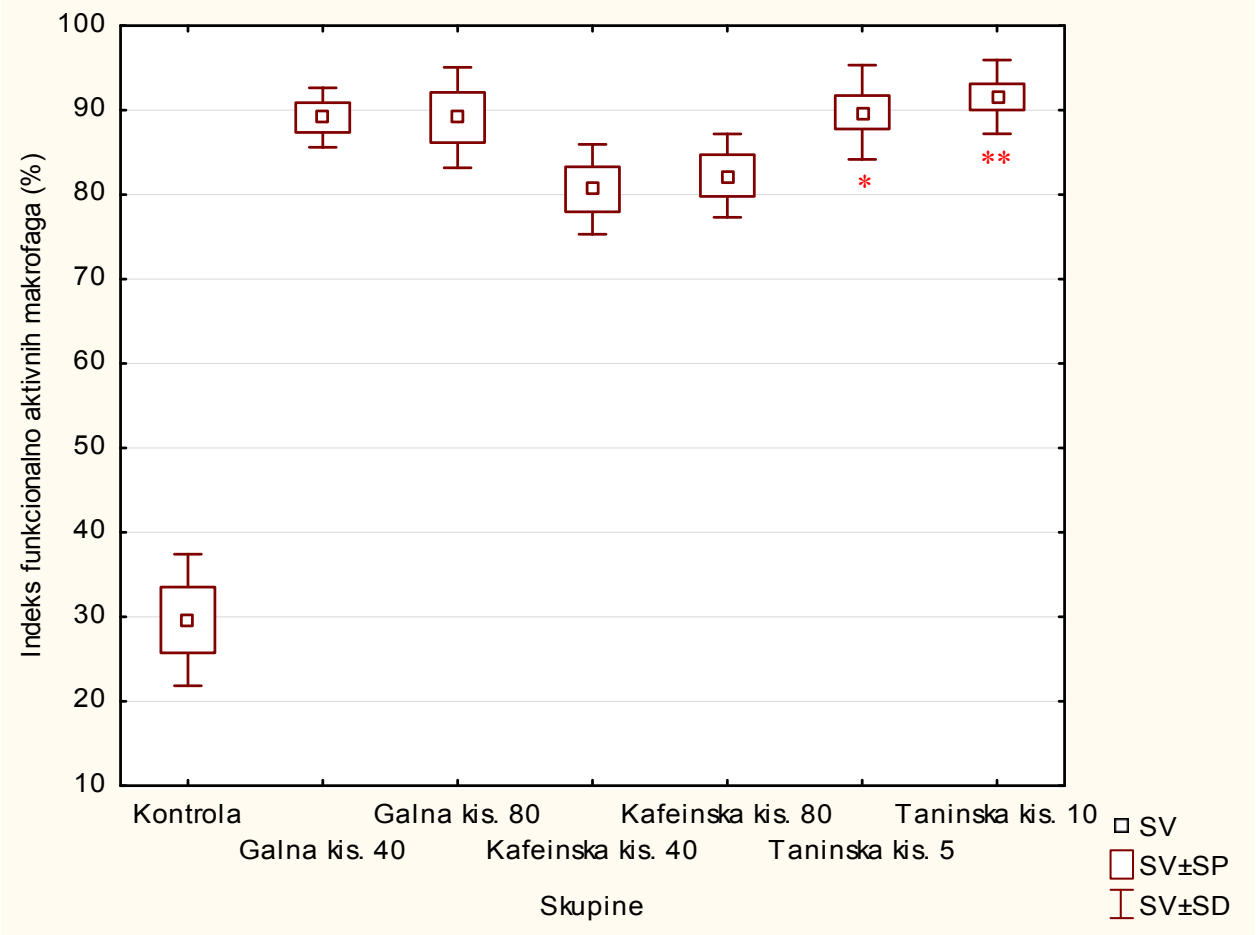
Slika 95. Učinak kafeinske kiseline na tumorocidnu aktivnost makrofaga (A1) i pokretanje procesa apoptoze (B1) tijekom 10 dana obrade. Morfološke promjene na apoptotičkim EAT stanicama inducirane kafeinskom kiselinama određene su na Giemsa obojenim preparatima kao slijed morfoloških događaja koji uključuju: smanjenje stanice, stvaranje plazmatskih izbočina ili mjehurića na membrani, fragmentacija jezgre, stvaranje apoptotičnih tijela i konačno razgradnja same stanice. Stanice obrađene s kafeinskom kiselinom pokazuju (B2 i B3) formiranje apoptotičkih tjelešaca (at), (B4) smanjenje jezgre (sj) i fragmentaciju jezgre (fj). Stanice EAT kontrole (Slika B5) obojane Giemsom imaju

jezgre s raspršenim kromatinom (rk) i cjelovitom plazma membranom (pm). Vlažne adherirane stanice slikane su pod povećanjem 400 X (A1, B1) i 1000 X na fazno-kontrastnom mikroskopu (B2-B5). Slične promjene uočene su i kod primjene ostalih fenolnih kiselina kod oba načina obrade životinja.



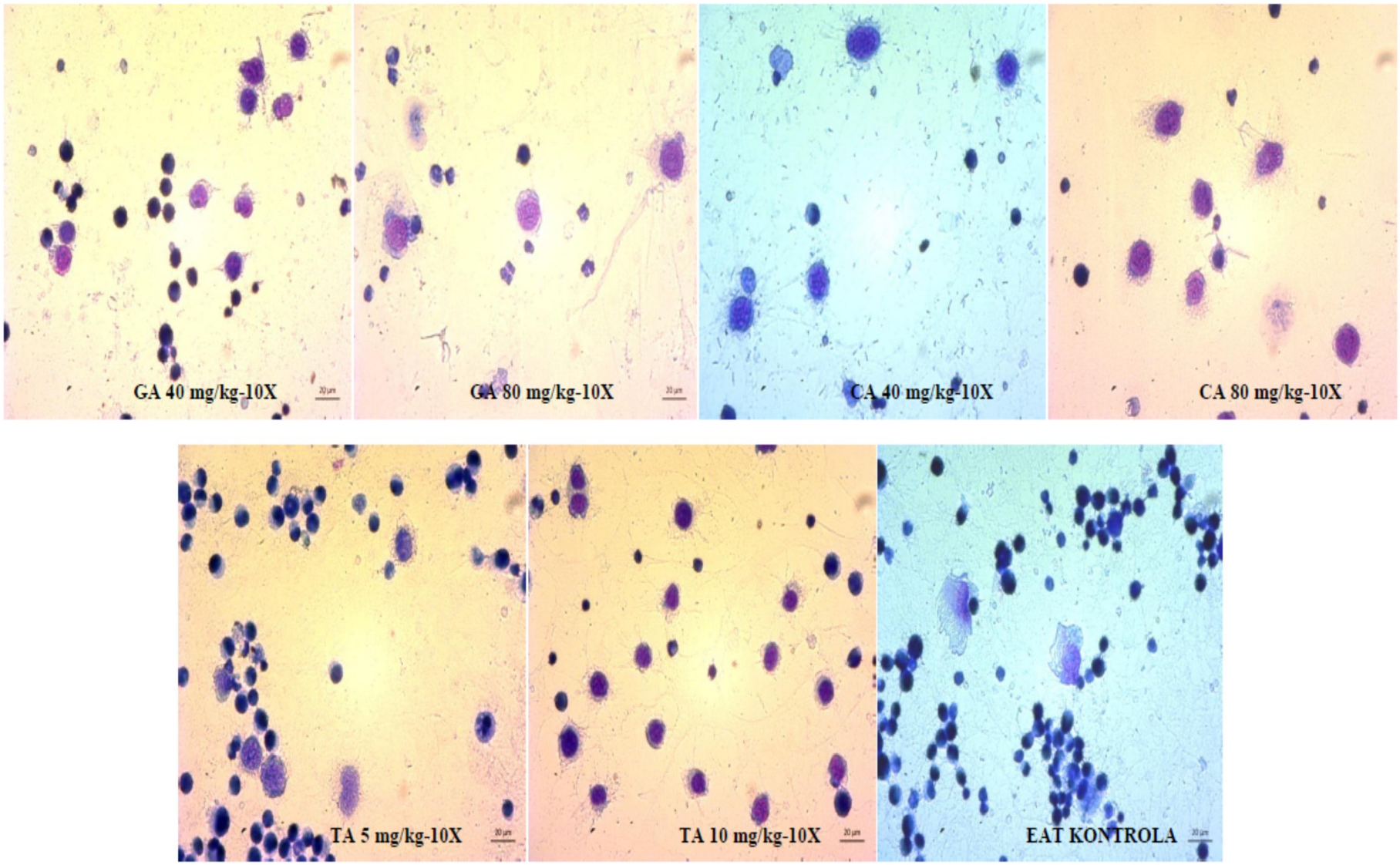
Slika 96. Indeks funkcionalno aktivnih makrofaga miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N= 5) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Indeks funkcionalno aktivnih makrofaga (**SI**) odredili smo prema formuli: **SI (%) = broj aktiviranih makrofaga x 100 stanica / 200**. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

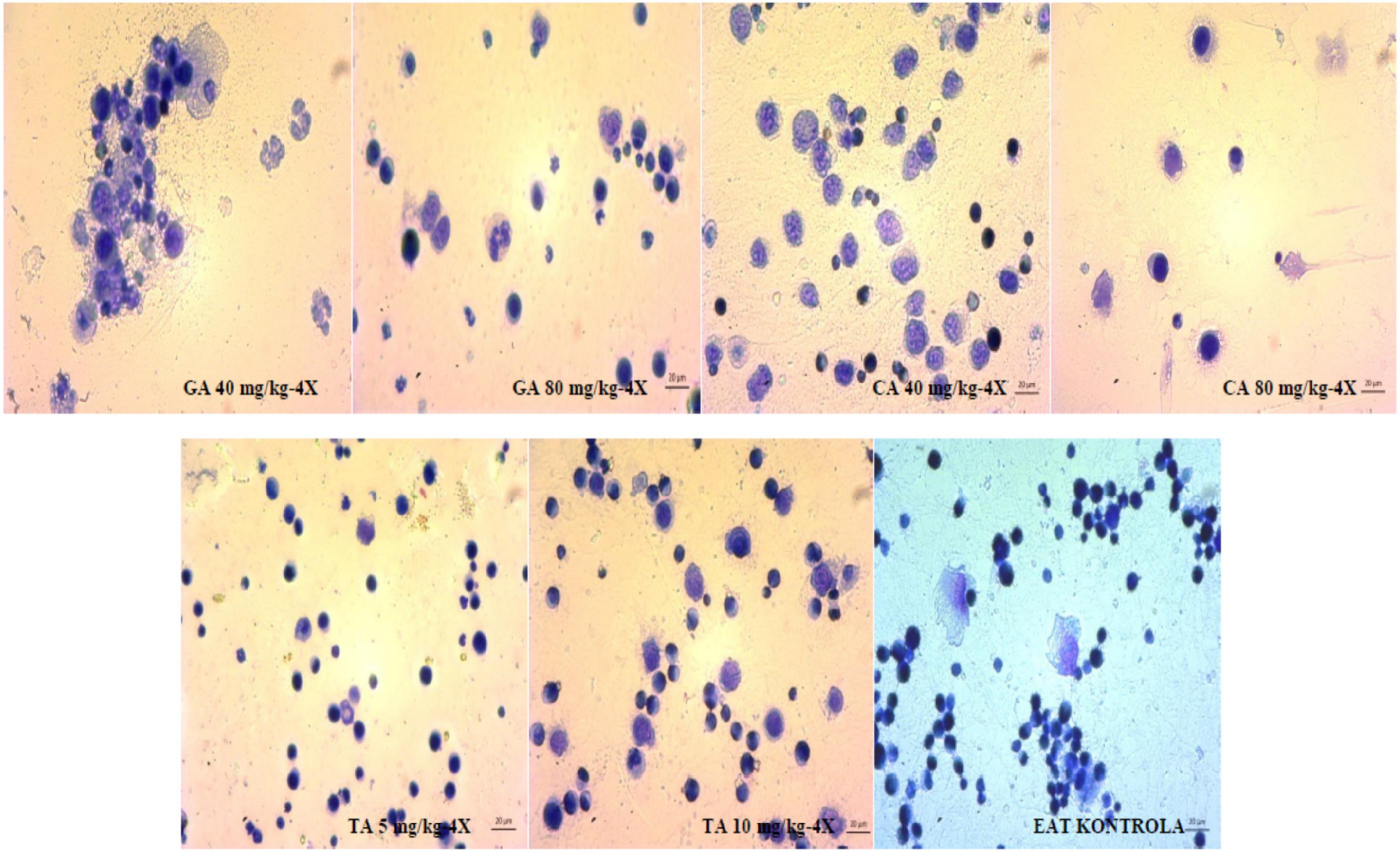


Slika 97. Indeks funkcionalno aktivnih makrofaga miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Indeks funkcionalno aktivnih makrofaga (**SI**) odredili smo prema formuli: **SI (%) = broj aktiviranih makrofaga x 100 stanica / 200.** Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



Slika 98. Funkcionalna aktivnost makrofaga kod miša nositelja EAT-a (kontrola) i obrađenih skupina (GA 40 mg/kg i 80 mg/kg; CA 40 mg/kg i 80 mg/kg; TA 5 mg/kg i 10 mg/kg) tijekom 10 dana (Giemsa 400 X)

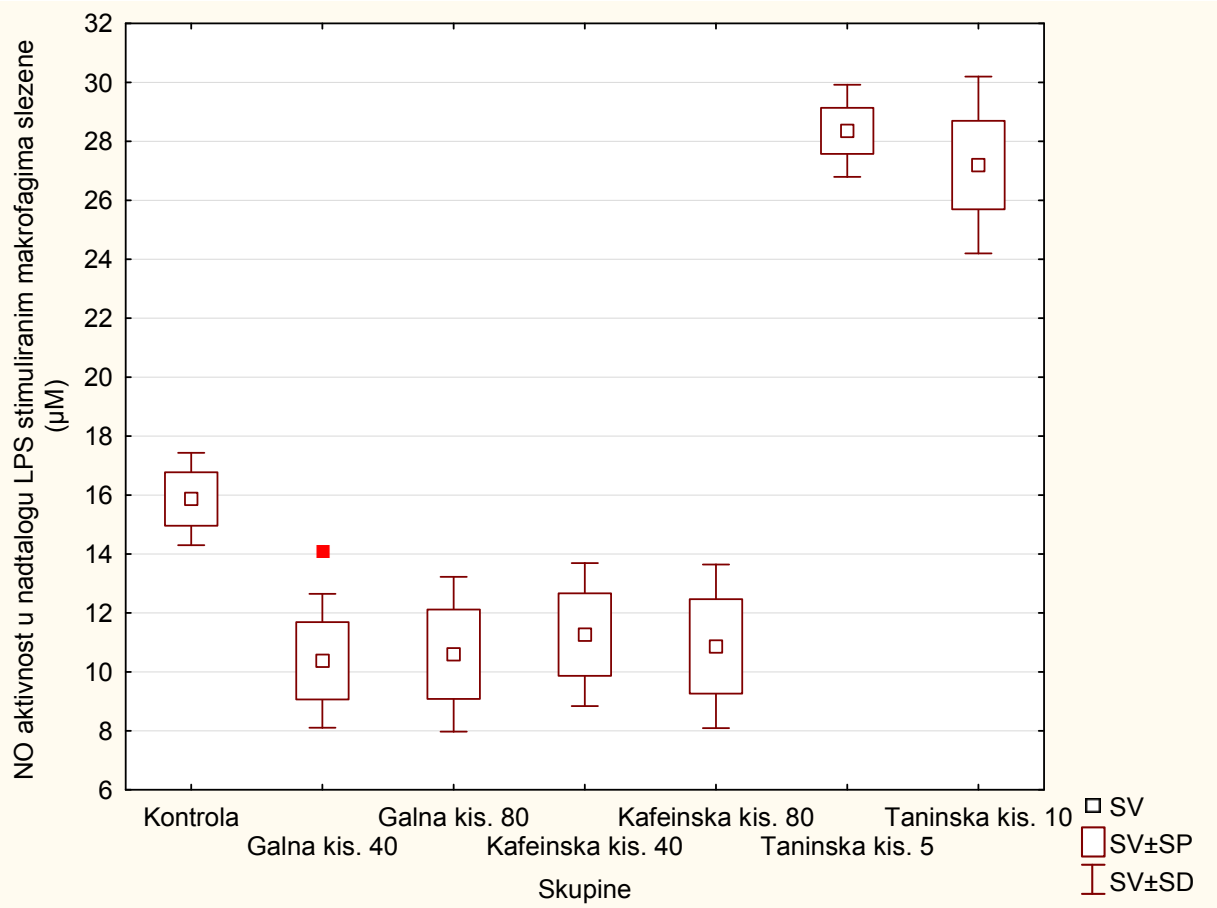


Slika 99. Funkcionalna aktivnost makrofaga kod miša nositelja EAT-a (kontrola) i obrađenih skupina (GA 40 mg/kg i 80 mg/kg; CA 40 mg/kg i 80 mg/kg; TA 5 mg/kg i 10 mg/kg) nakon 5. dana svaki drugi dan (Giemsa 400 X)

4.5.2. Rezultati mjerenja NO indirektnom metodom prema Griess-u

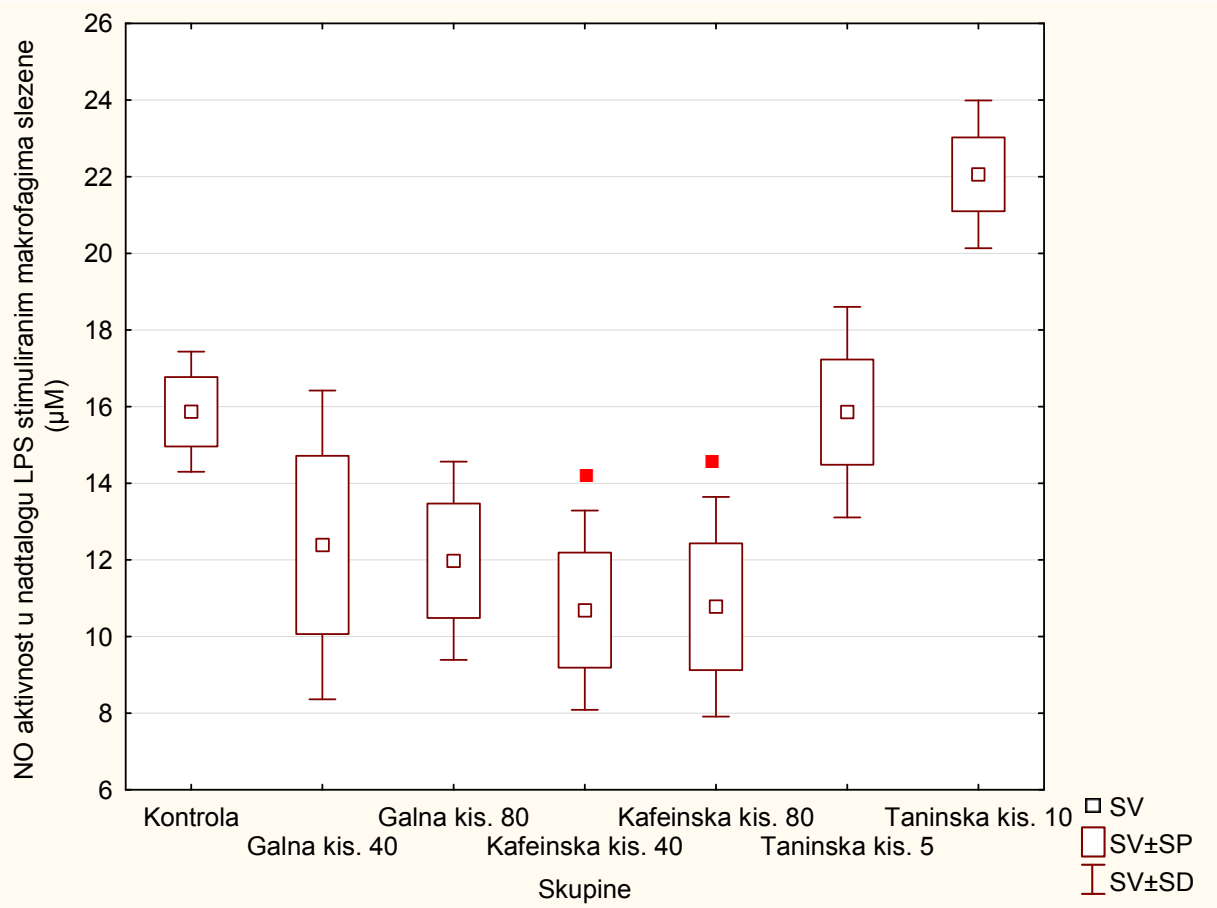
4.5.2.1. NO aktivnost u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima slezene

Na Slici 100 prikazani su rezultati mjerenja dušikova(II) oksida (NO) indirektnom Griessovom metodom u uzorcima nadtaloga LPS-om stimuliranim makrofagima slezene dobiveni nakon obrade životinja 10X svaki dan. Razina NO je statistički značajno smanjena kod GA 40 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg ($P < 0,05$). Za vrijednosti NO kod obrade životinja 4X svaki drugi dan uočili smo statistički značajno niže vrijednosti NO kod CA 40 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg te CA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 101).



Slika 100. NO aktivnost u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



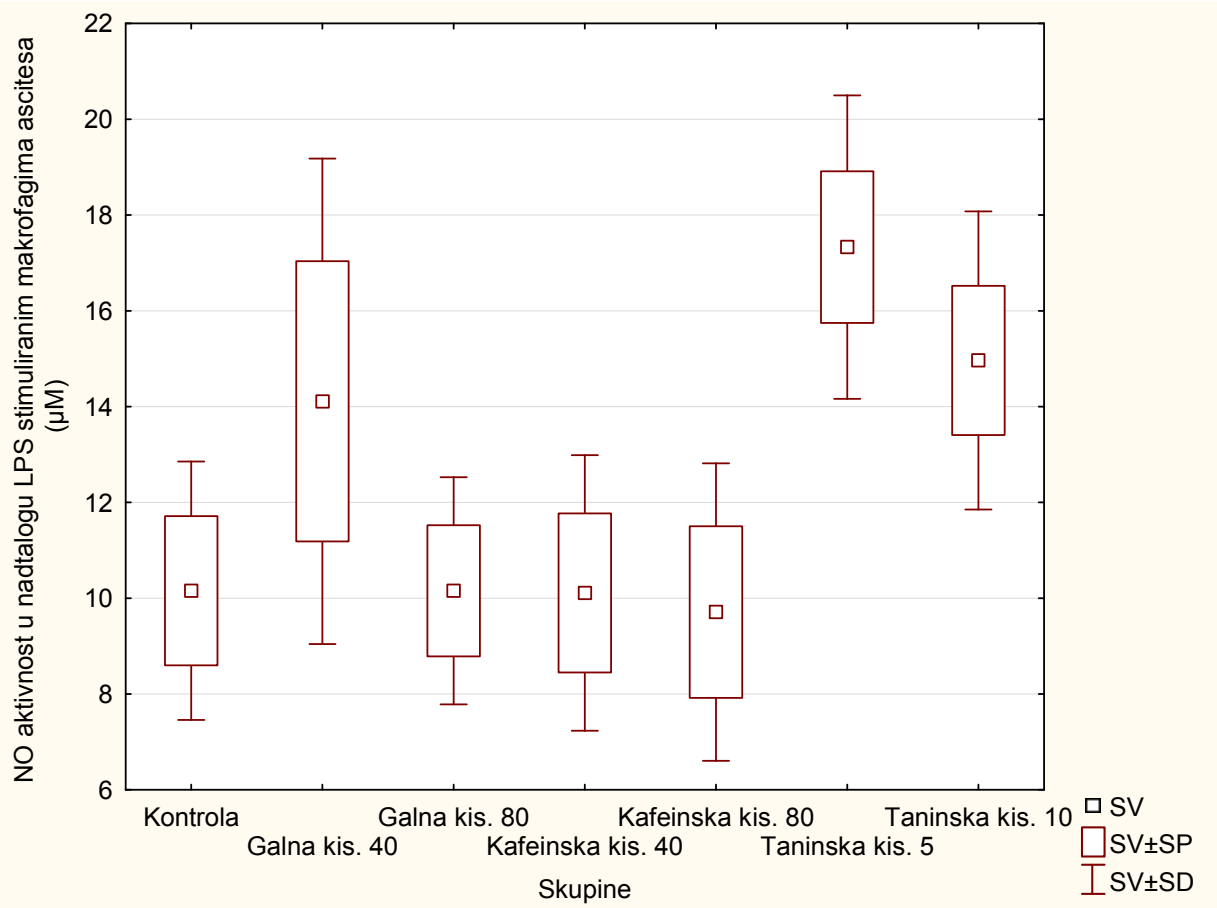
Slika 101. NO aktivnost u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP.

Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: CA 40 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg; CA 40 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

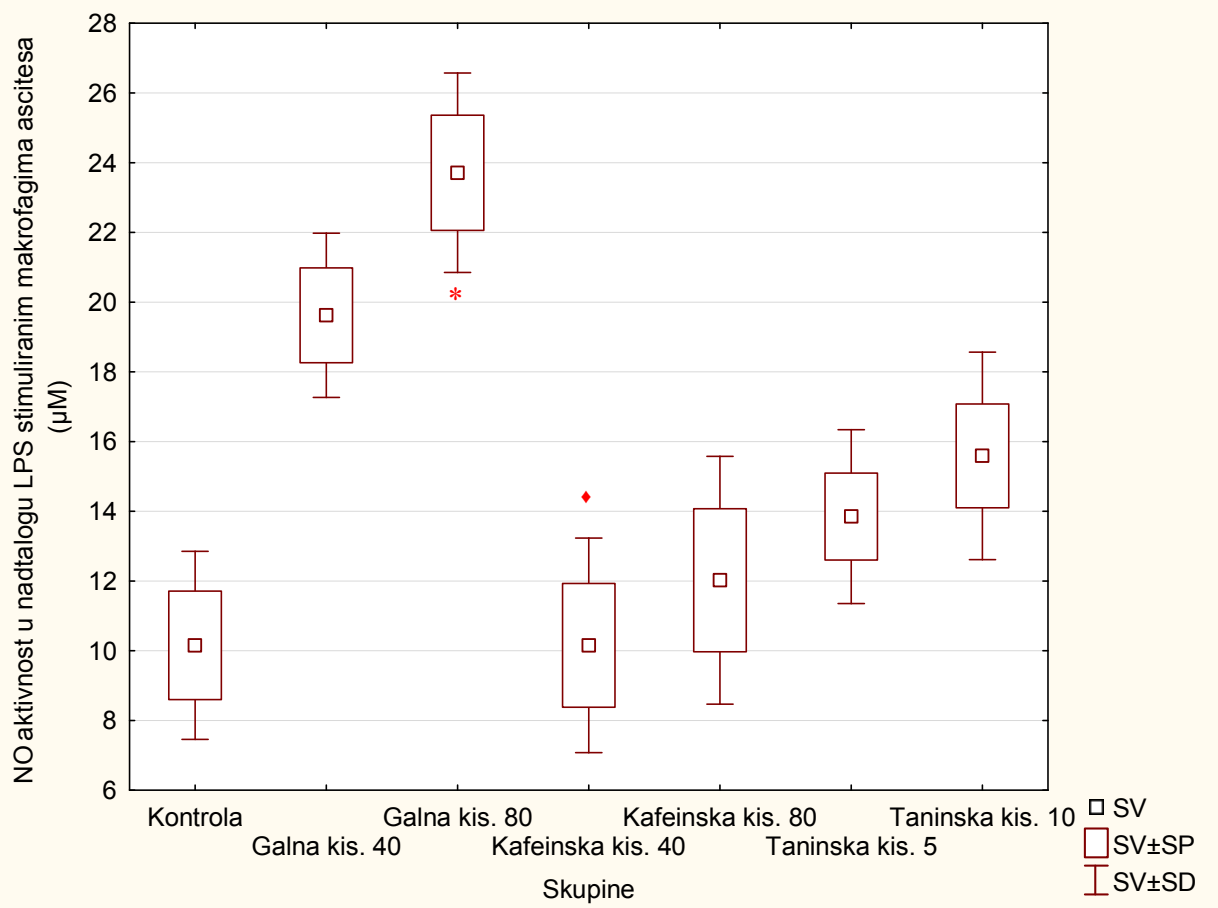
4.5.2.2. NO aktivnost u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima ascitesa

Rezultati mjerenja dušikova(II) oksida u uzorcima nadtaloga LPS-om stimuliranim makrofagima ascitesa dobivenim nakon obrade 10X ne pokazuju nikakve statističke razlike kako u odnosu na kontrolu, tako i između obrađenih skupina (Slika 102). Na Slici 103 nakon obrade miševa 4X svaki drugi dan vidi se značajno povećanje razine NO kod GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), dok kod CA 40 mg/kg dolazi do smanjenja razine NO u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$).



Slika 102. NO aktivnost u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

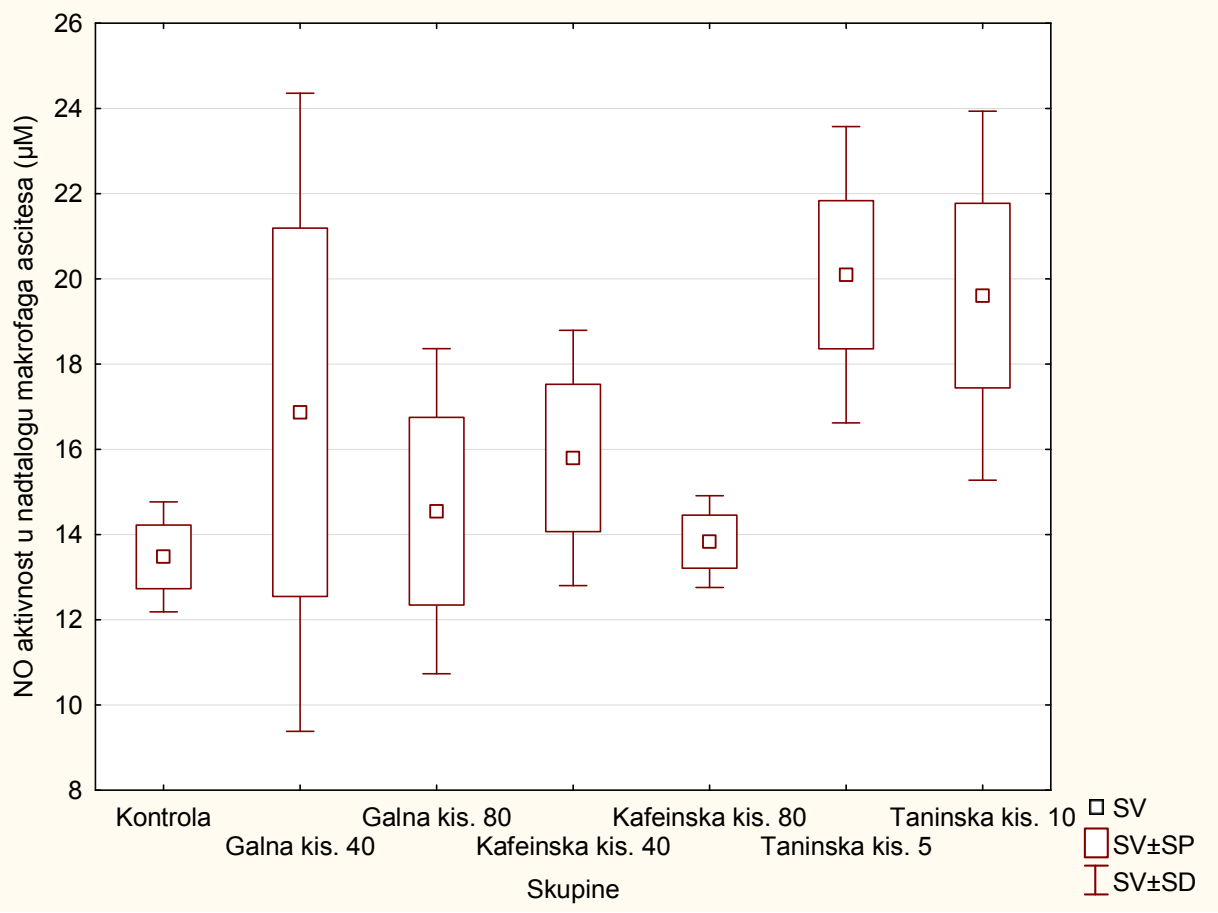


Slika 103. NO aktivnost u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: CA 40 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

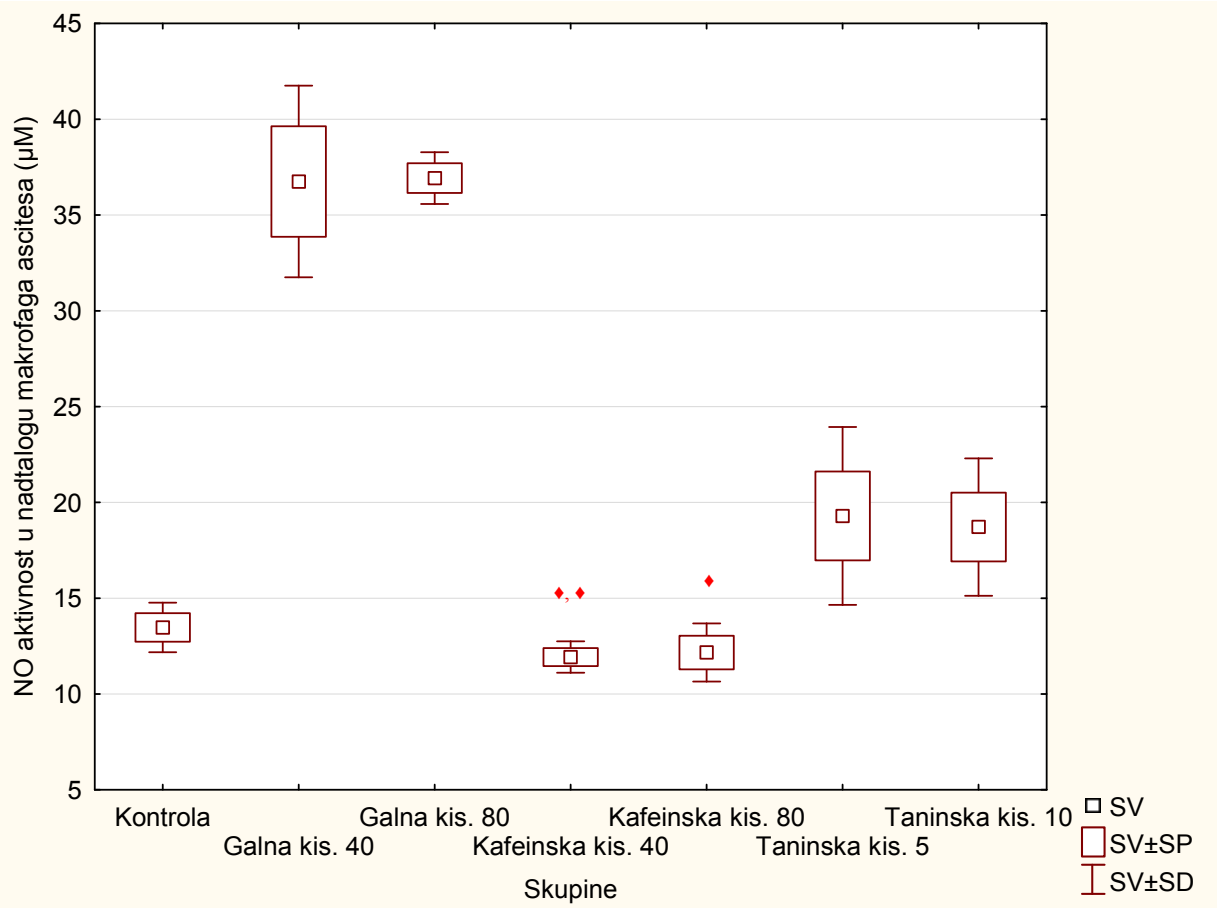
4.5.2.3. NO aktivnost u nadtalogu nestimuliranih makrofaga ascitesa

Na Slici 104 vidi se da ne postoje statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu i između obrađenih skupina prilikom analize mjerenja NO aktivnosti u uzorcima nadtaloga nestimuliranih makrofaga ascitesa nakon *ip* obrade s fenolnim kiselinama tijekom 10 dana. Kod analize mjerenja NO aktivnosti na uzorcima dobivenim nakon obrade 4X svaki drugi dan vidljivo je da dolazi do smanjenja proizvodnje NO kod obrađenih skupina CA 40 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg zatim kod CA 40 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg te CA 80 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 105).



Slika 104. NO aktivnost u nadtalogu nestimuliranih makrofaga ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2,5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

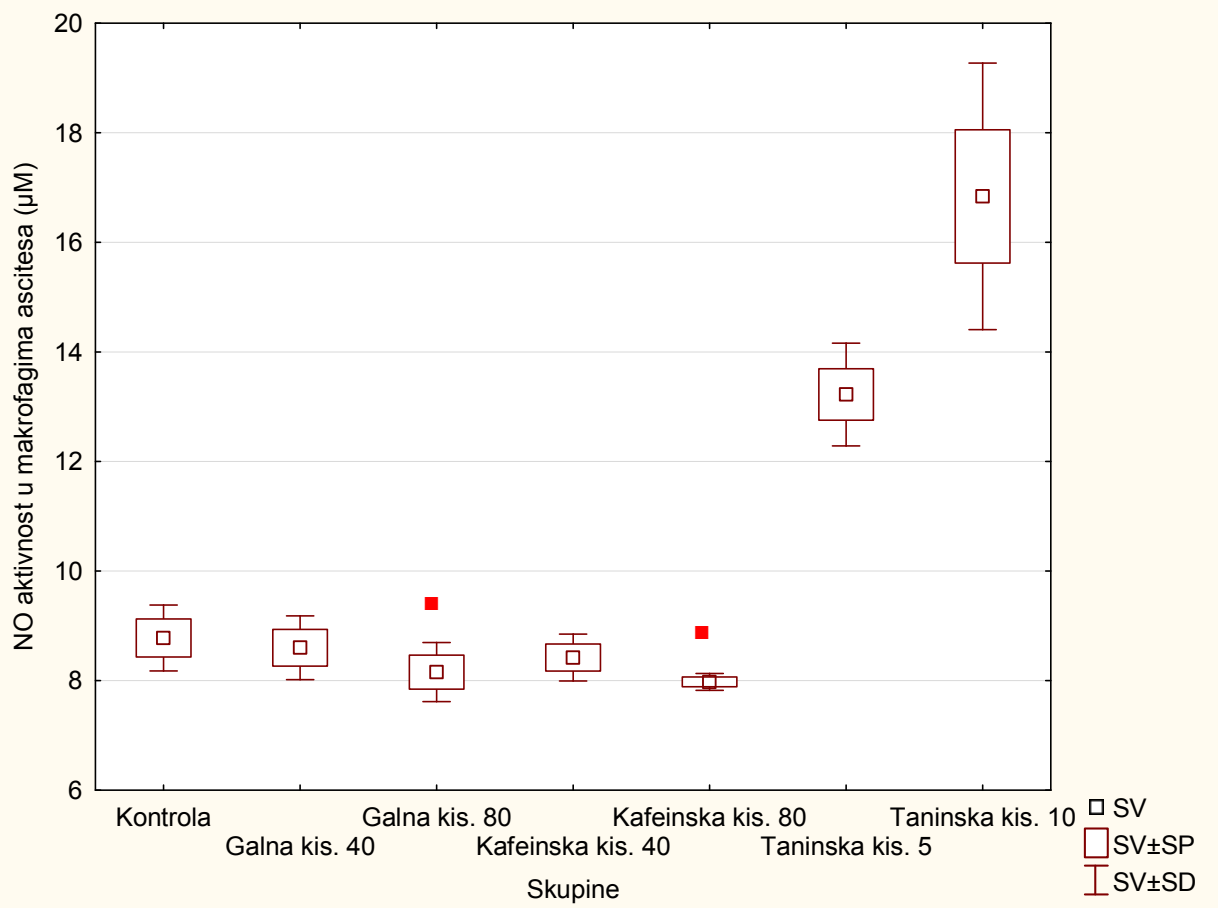


Slika 105. NO aktivnost u nadtalogu nestimuliranih makrofaga ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: CA 40 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg; CA 40 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg; CA 80 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

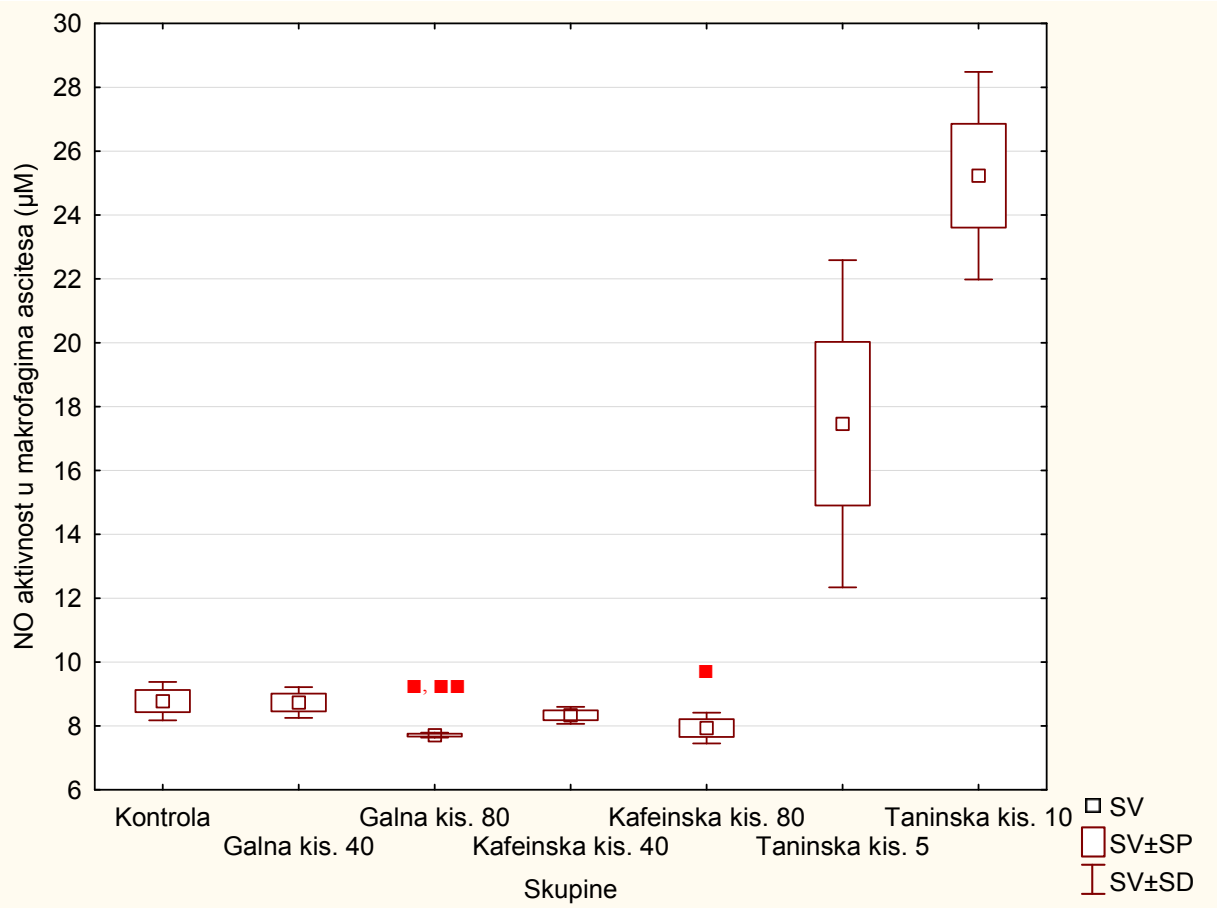
4.5.2.4. NO aktivnost u nestimuliranim makrofagima ascitesa

NO aktivnost u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan (Slika 106) pokazuje značajno nižu NO aktivnost kod skupina CA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg te GA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,05$). Obrada miševa od 5. dana svaki drugi dan dovela je do smanjenja NO aktivnosti kod GA 80 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg i CA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) te GA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 107).



Slika 106. NO aktivnost u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: CA 80 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg; GA 80 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

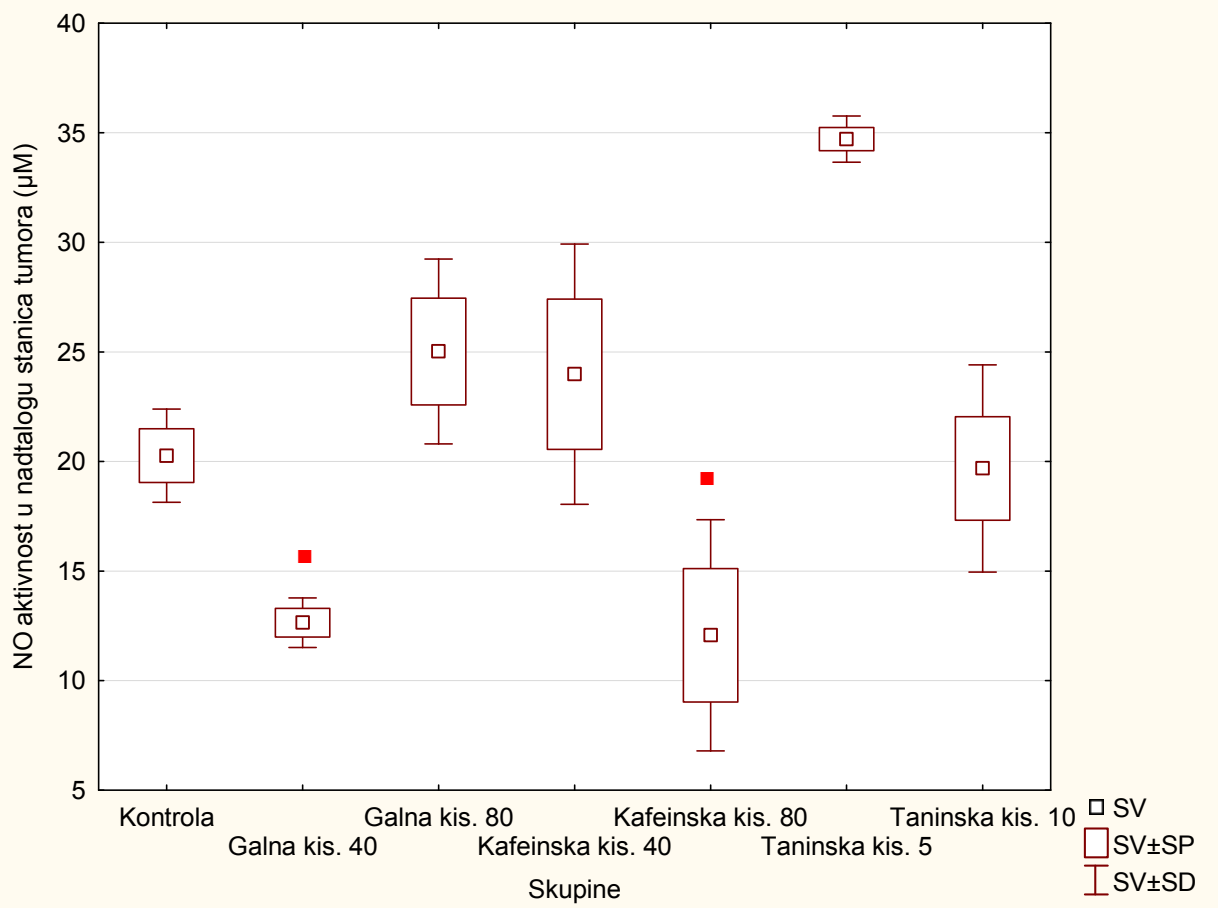


Slika 107. NO aktivnost u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg; CA 80 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■$P < 0{,}05$); GA 80 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■■$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

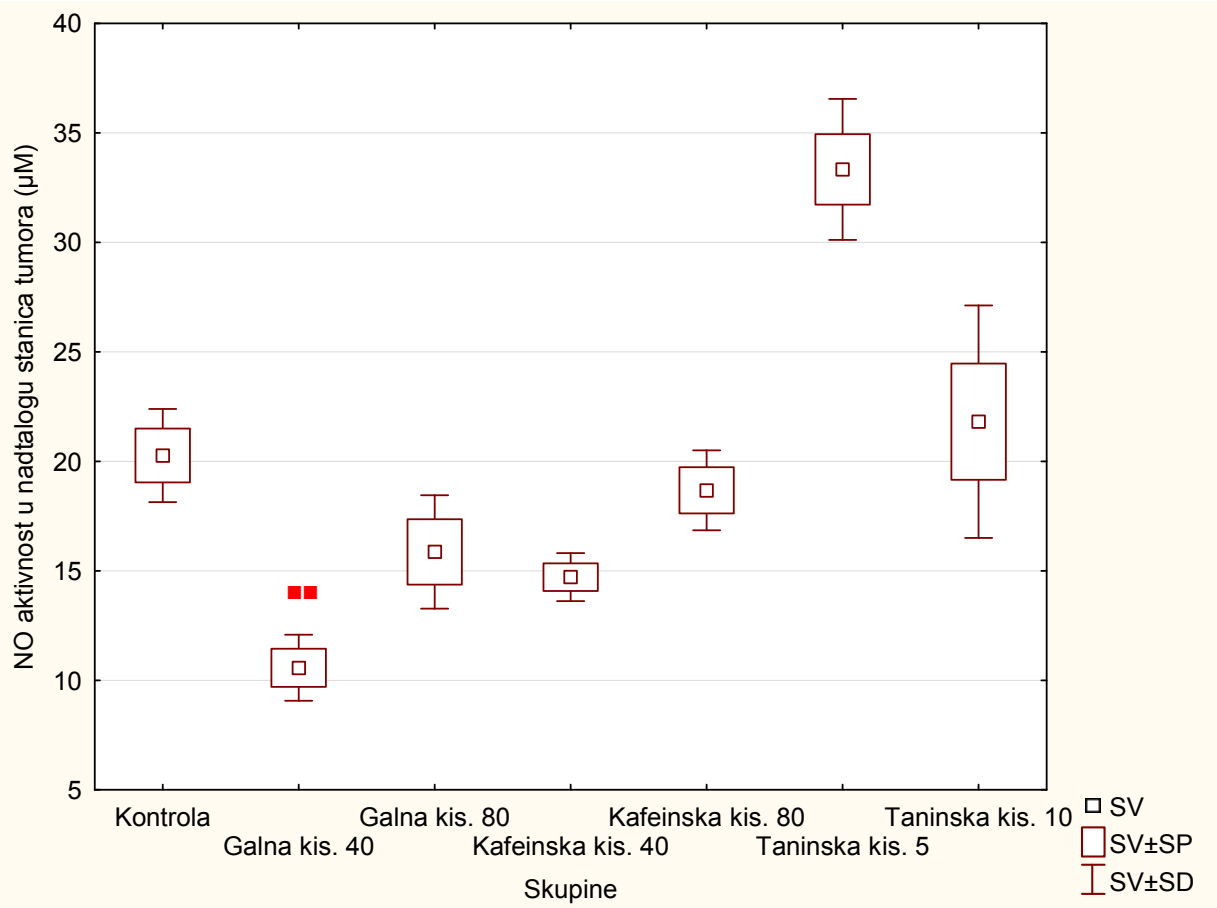
4.5.2.5. NO aktivnost u nadtalogu tumorskih stanica

Statistički značajno povećanje aktivnosti dušikova(II) oksida (NO) u odnosu na TA 5 mg/kg, uočili smo kod skupine GA 40 mg/kg i CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) u uzorcima nadtaloga tumorskih stanica dobivenih nakon obrade miševa 10X svaki dan (Slika 108), dok je kod obrade miševa 4X svaki drugi dan došlo do smanjene NO aktivnosti kod skupine GA 40 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 109).



Slika 108. NO aktivnost u nadtalogu stanica tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg; CA 80 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



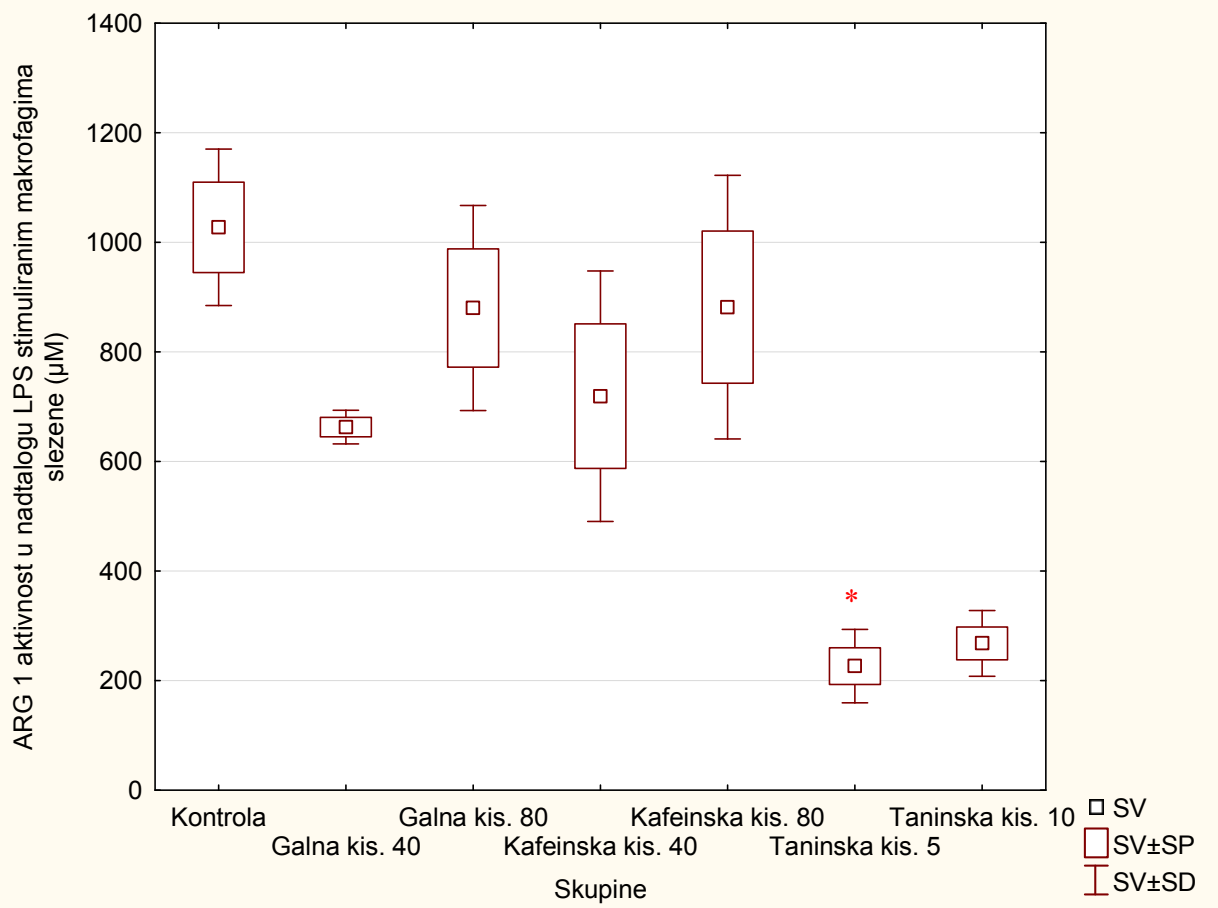
Slika 109. NO aktivnost u nadtalogu stanica tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■■ $P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.5.3. Enzimska aktivnost Arg-1 u uzorcima

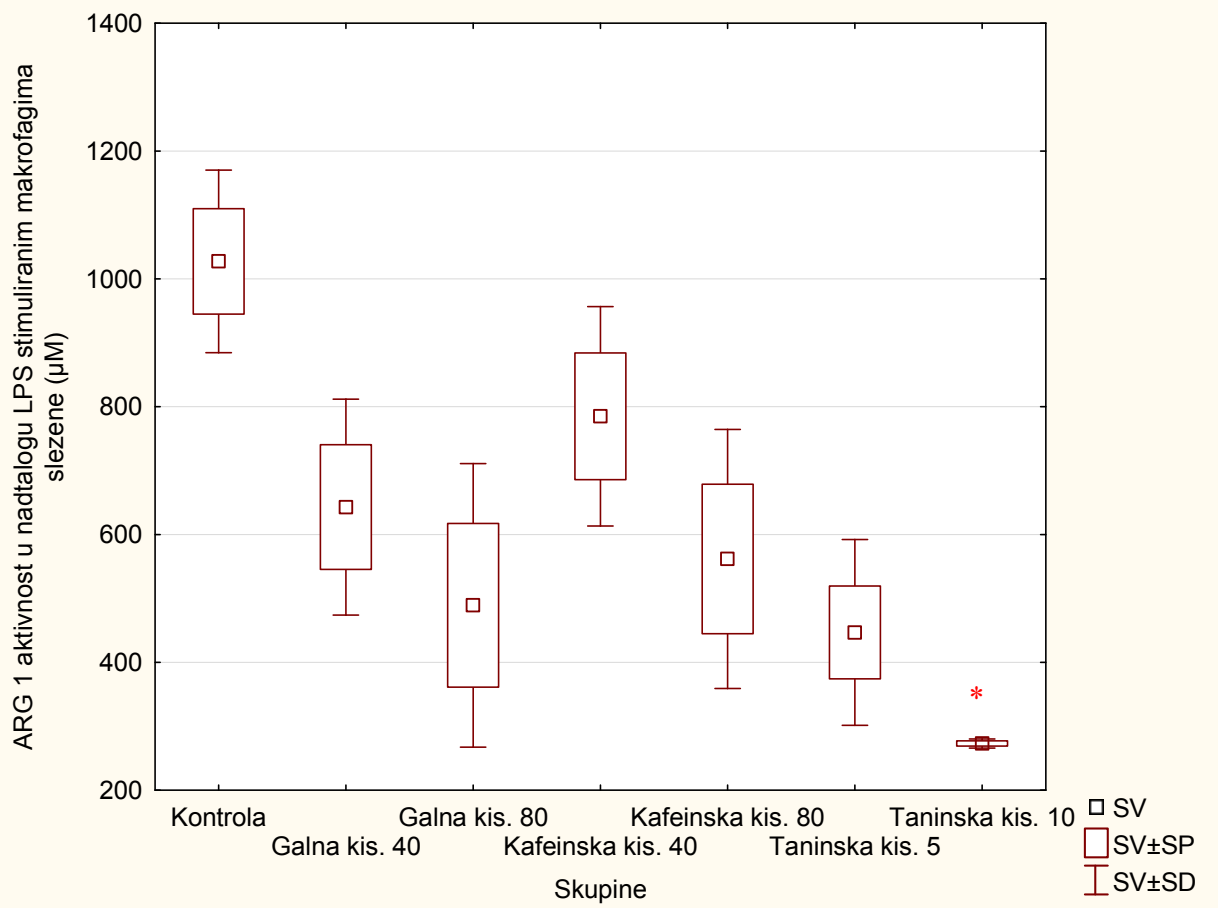
4.5.3.1. Enzimska aktivnost Arg-1 u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima slezene

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja enzimske aktivnosti Arg-1 u uzorcima nadtaloga LPS-om stimuliranim makrofagima slezene koji su dobiveni nakon obrade miševa tijekom 10 dana ukazuju da je aktivnost Arg-1 značajno niža kod TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 110). Isto tako uočeno je smanjenje aktivnosti Arg-1 kod TA 10 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 111) kod uzoraka uzetih nakon obrade 4X svaki drugi dan.



Slika 110. Aktivnost Arg-1 u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

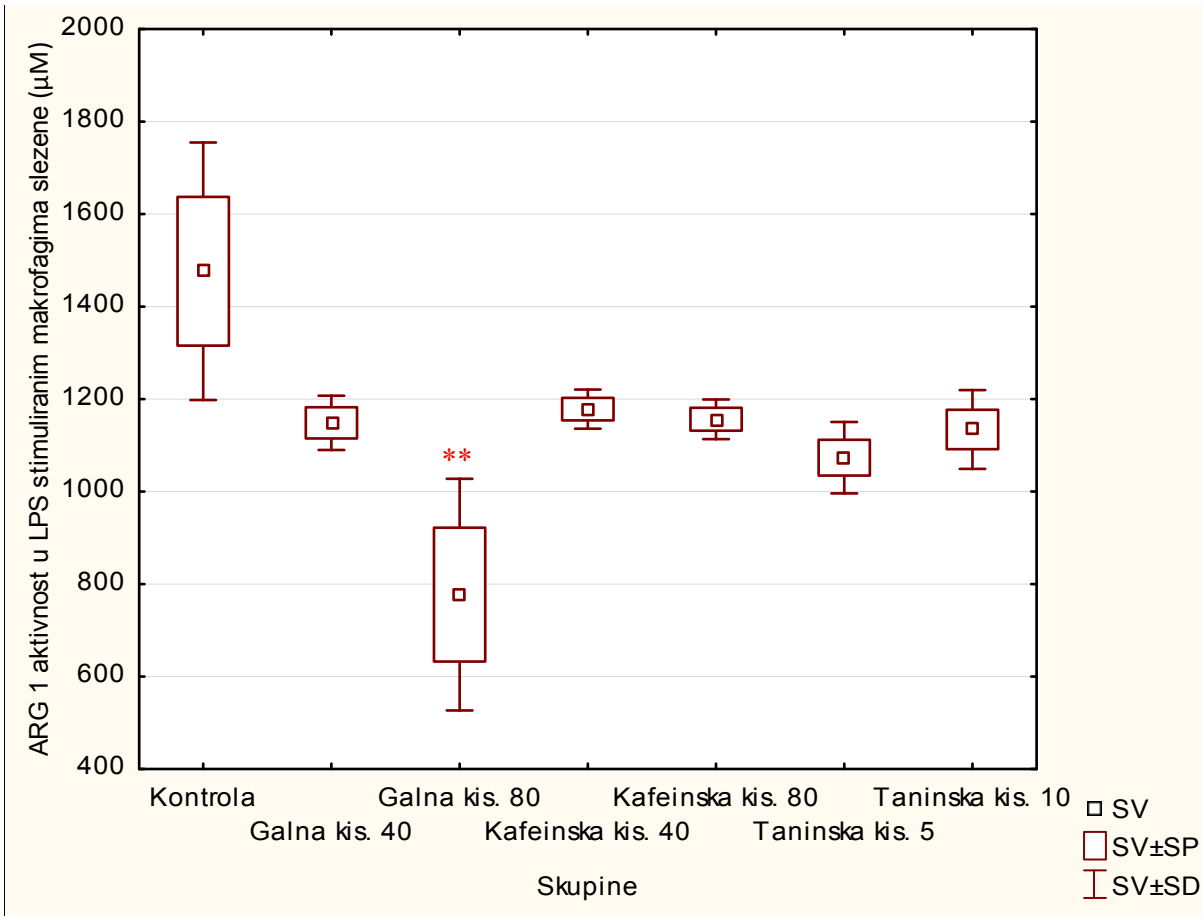


Slika 111. Aktivnost Arg-1 u nadtalogu LPS stimuliranim makrofagima slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica (2,5x10^6) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*P < 0,05).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

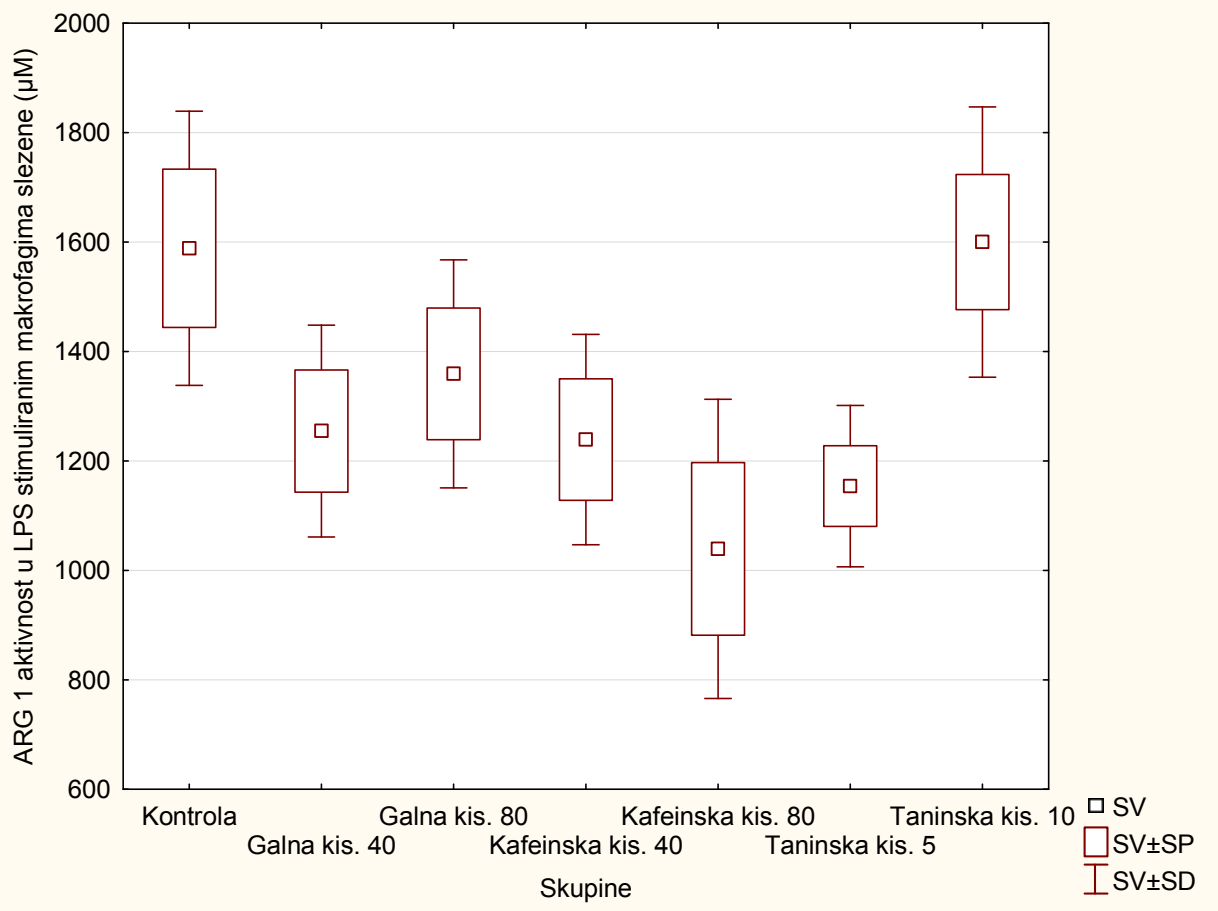
4.5.3.2. Enzimska aktivnost Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima slezene

Stimulirane stanice makrofaga slezene s lipopolisaharidom (LPS) u koncentraciji od 0,1 µg/mL uzete nakon obrade miševa fenolnim kiselinama 10X svaki dan, pokazuju značajno smanjenje razine Arg-1 kod GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,01$) (Slika 112), dok kod obrade 4X svaki drugi dan nisu uočene nikakve statistički značajne razlike (Slika 113) iako je kod većine skupina vidljivo da dolazi do smanjenja aktivnosti Arg-1 u odnosu na kontrolu.



Slika 112. Aktivnost Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

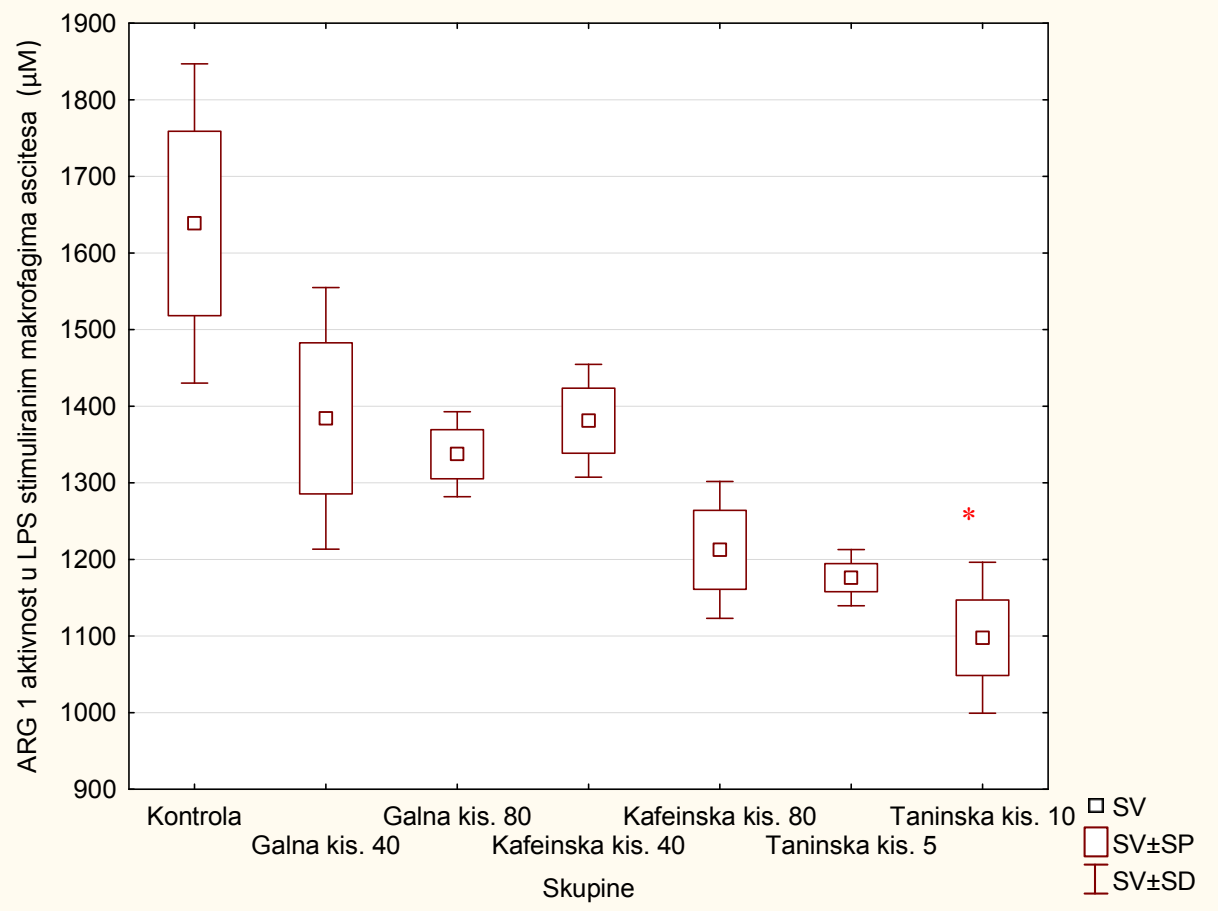


Slika 113. Aktivnost Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

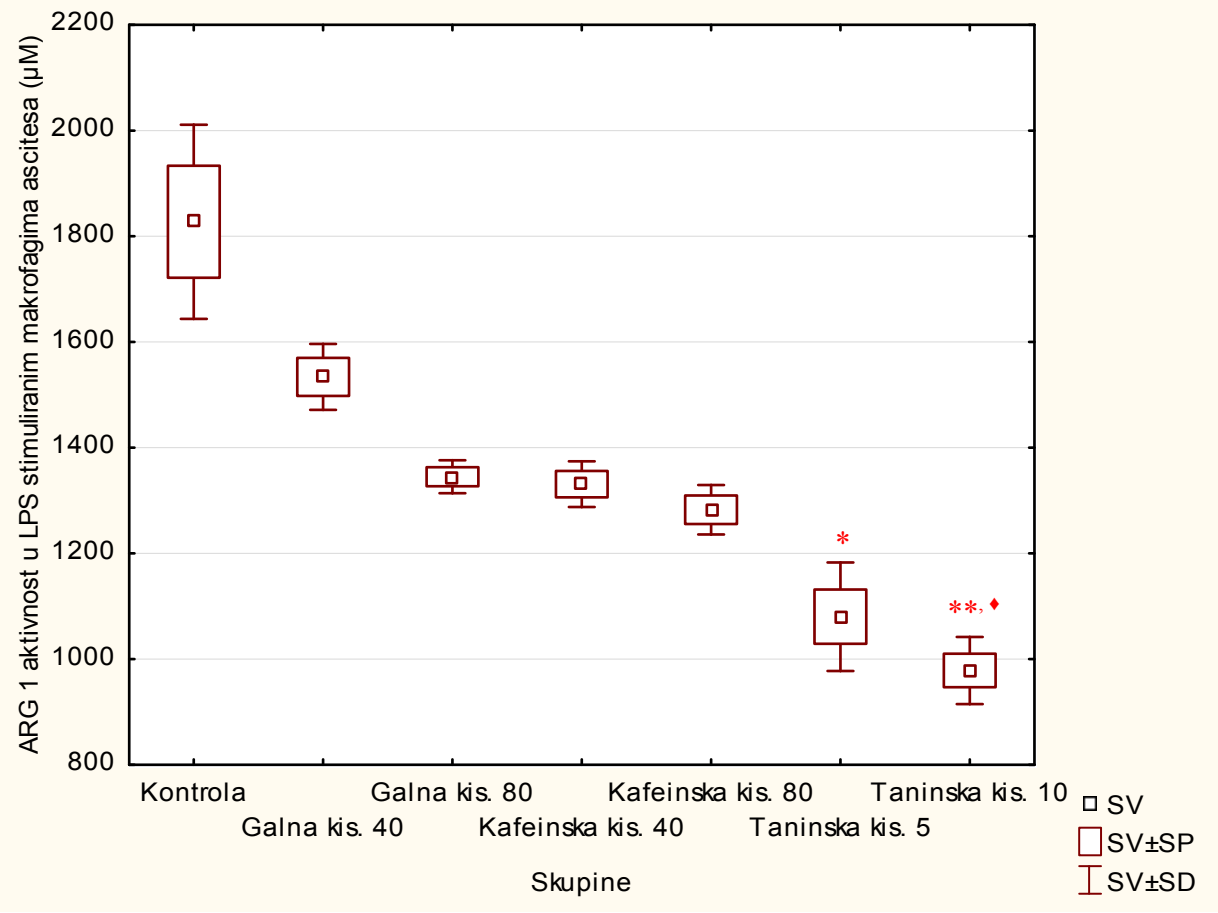
4.5.3.3. Enzimska aktivnost Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa

U uzorcima LPS-om stimuliranim makrofagima izoliranih iz ascitesa nakon obrade životinja fenolnim kiselinama 10X svaki dan uočena je značajno niža vrijednost koncentracije Arg-1 kod TA 10 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 114). Također, obrada životinja s TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 10 mg/kg ($P < 0,01$) svakog drugog dana (4X) dovela je do značajnog smanjenja aktivnosti Arg-1 u odnosu na kontrolu, ali i kod TA 10 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 115).



Slika 114. Aktivnost Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

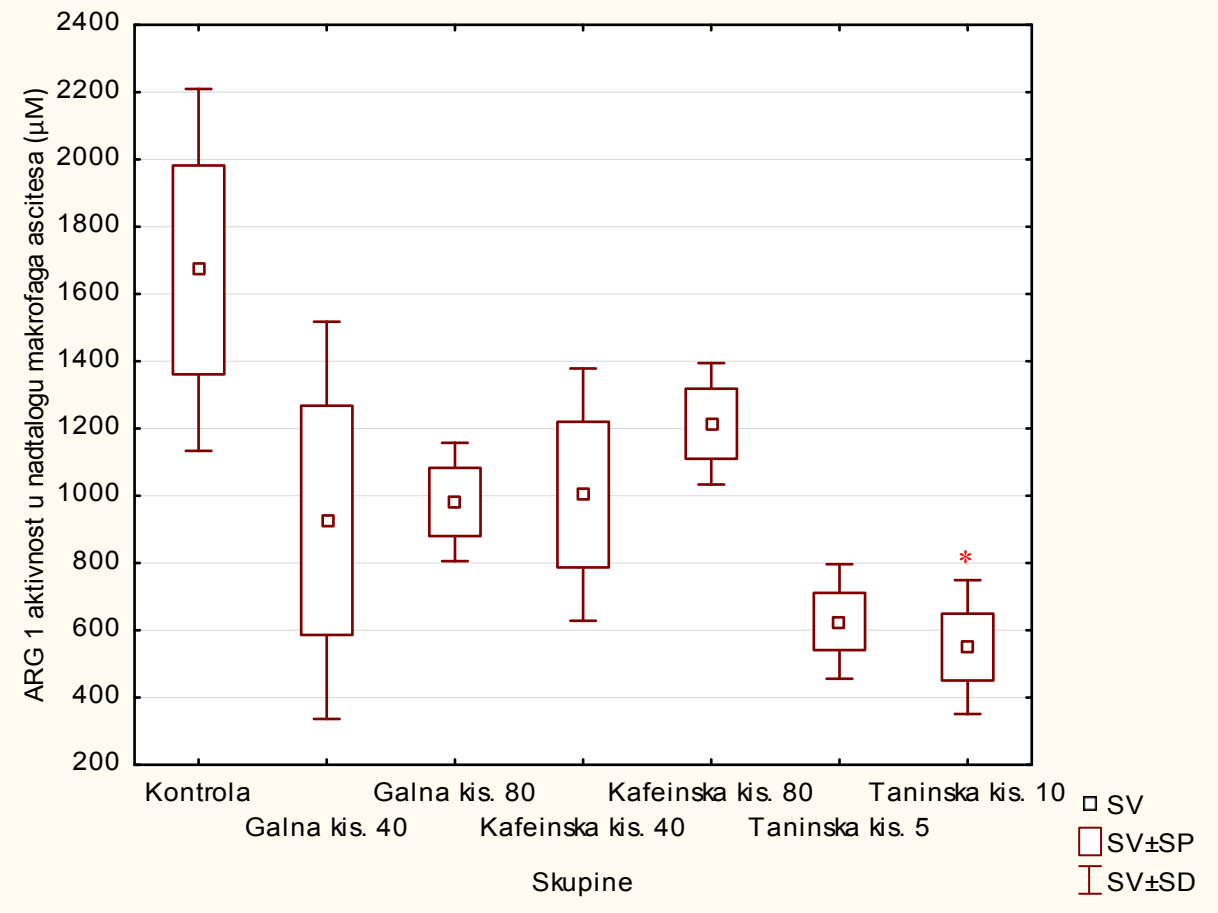


Slika 115. Aktivnost Arg-1 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica (2,5x10^6) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*P < 0,05); TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (**P < 0,01) i između obrađenih skupina: TA 10 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦P < 0,05).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

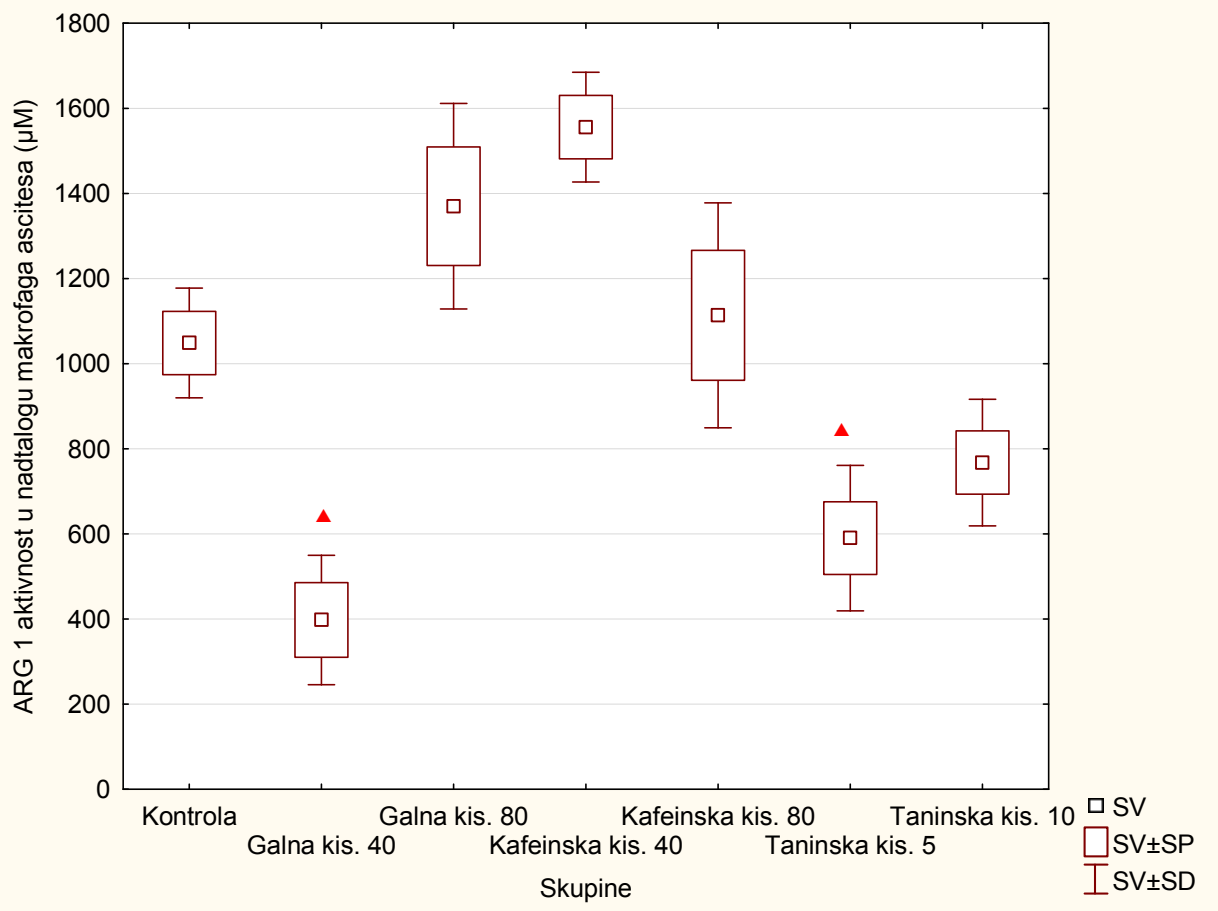
4.5.3.4. Enzimska aktivnost Arg-1 u nadtalogu nestimuliranih makrofaga ascitesa

Na Slici 116 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti Arg-1 u nadtalogu nestimuliranih makrofaga izoliranih iz ascitesa pri čemu se može vidjeti da dolazi do značajnog smanjenja razine Arg-1 u odnosu na kontrolu kod TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) kod obrade miševa 10X, dok je kod obrade miševa tek od 5. dana svaki drugi dan (4X) uočeno smanjenje aktivnosti Arg-1 u odnosu na CA 40 mg/kg kod skupina GA 40 mg/kg i TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 117).



Slika 116. Aktivnost Arg-1 u nadtalogu nestimuliranih makrofaga ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

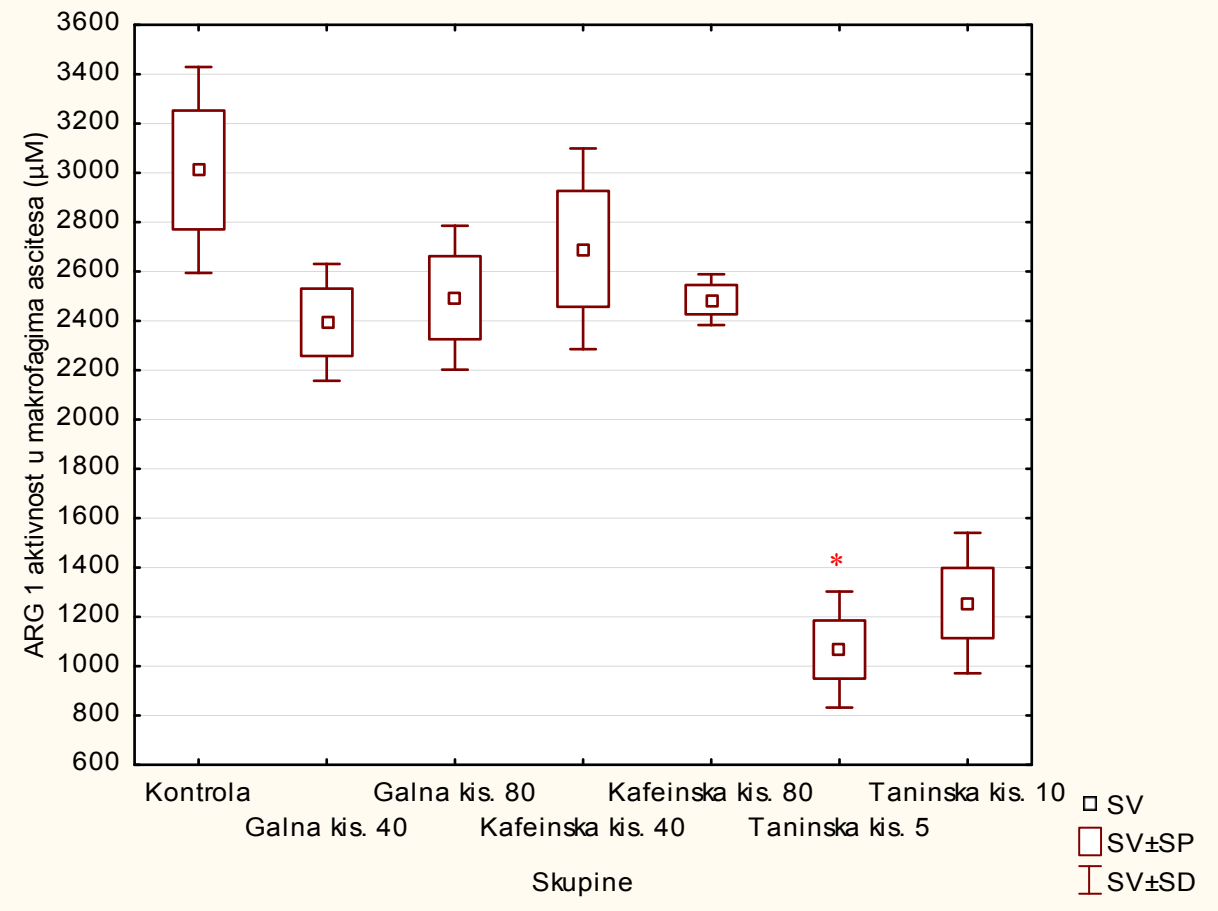


Slika 117. Aktivnost Arg-1 u nadtalogu nestimuliranih makrofaga ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg, TA 5 mg/kg *vs* CA 40 mg/kg (▲$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

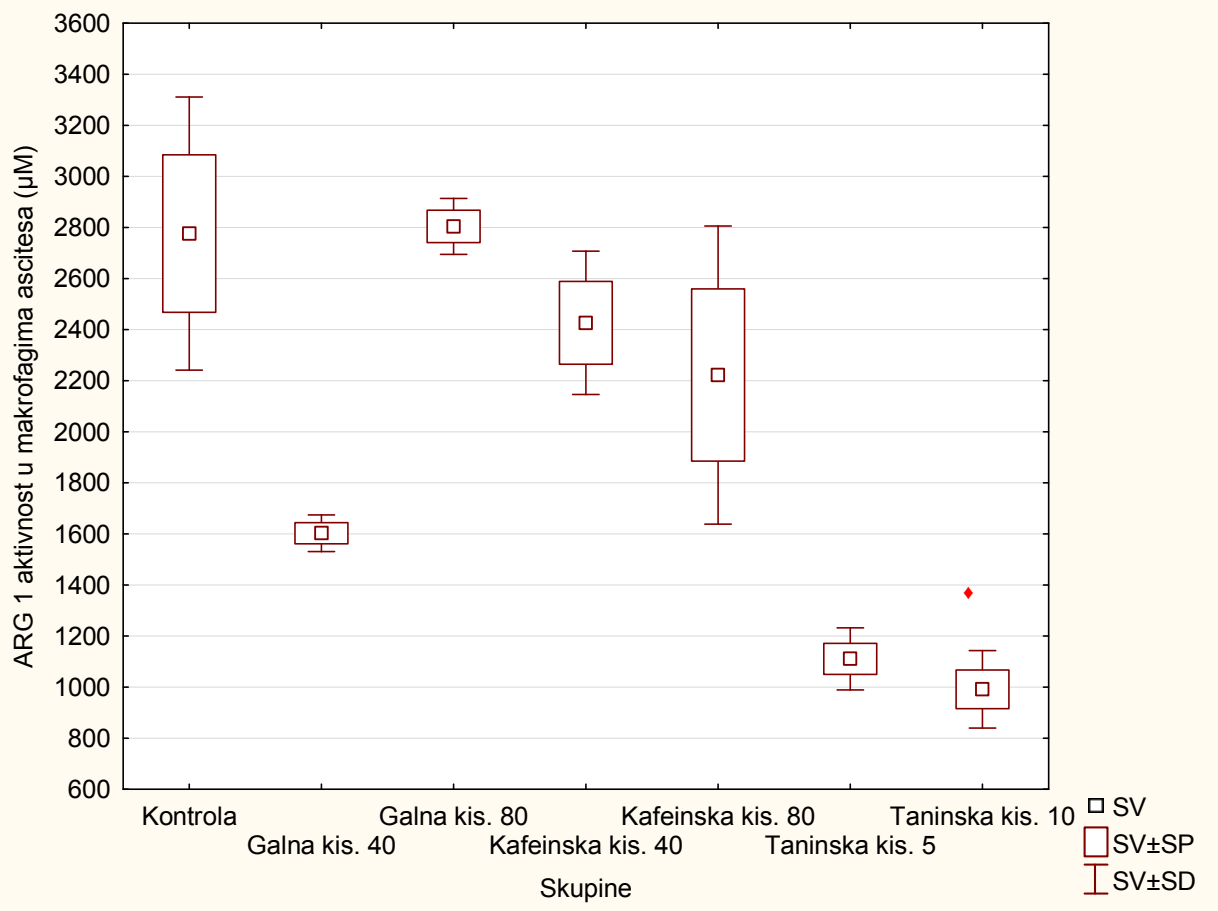
4.5.3.5. Enzimska aktivnost Arg-1 u nestimuliranim makrofagima ascitesa

U nestimuliranim makrofagima ascitesa izoliranim nakon obrade miševa 10X s fenolnim kiselinama izmjerena aktivnost Arg-1 pokazuje značajno nižu vrijednost u odnosu na kontrolu kod TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 118), dok je kod makrofaga ascitesa koji su dobiveni nakon obrade tumora u kasnoj fazi rasta vidljivo samo značajno smanjenje aktivnosti Arg-1 kod skupine TA 10 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 119).



Slika 118. Aktivnost Arg-1 u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X tijekom 10 dana. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

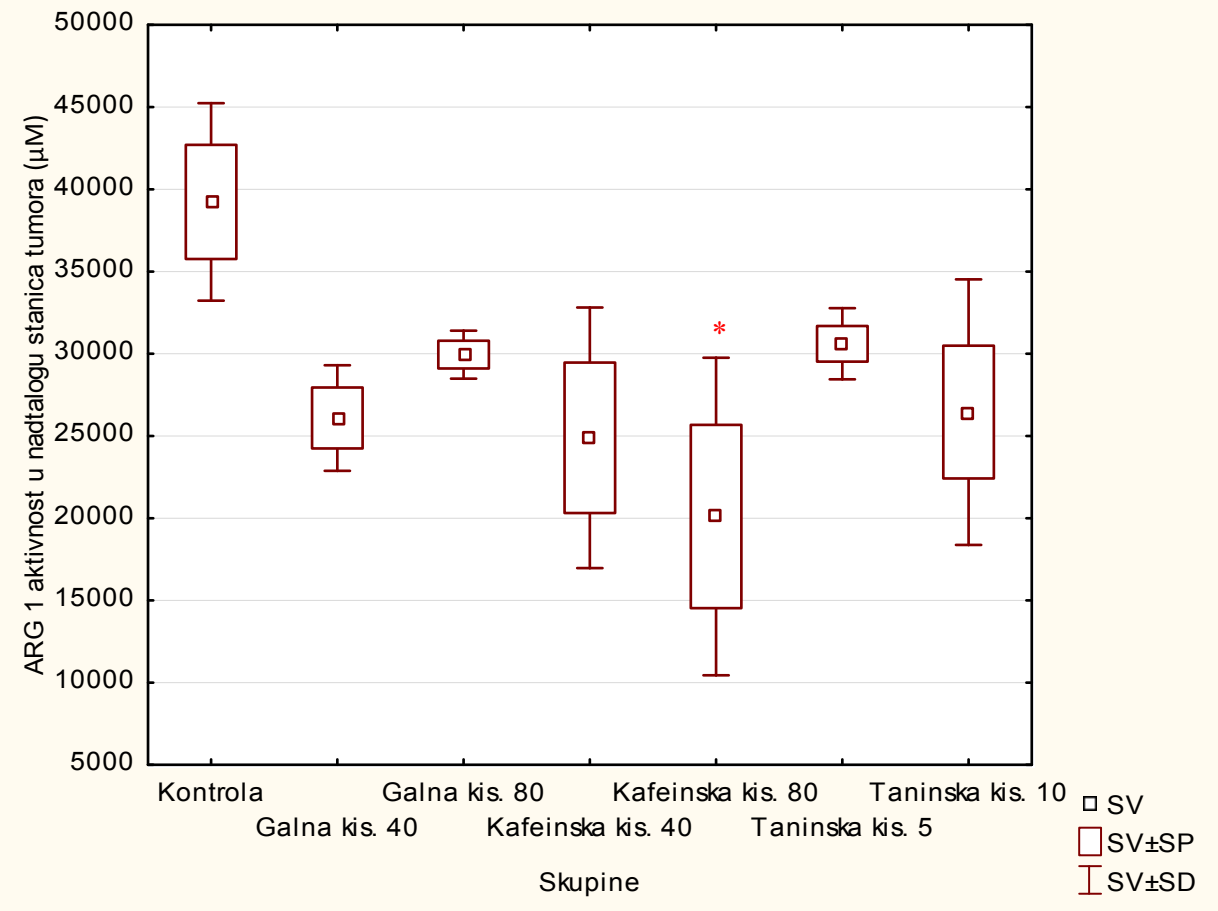


Slika 119. Aktivnost Arg-1 u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: TA 10 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

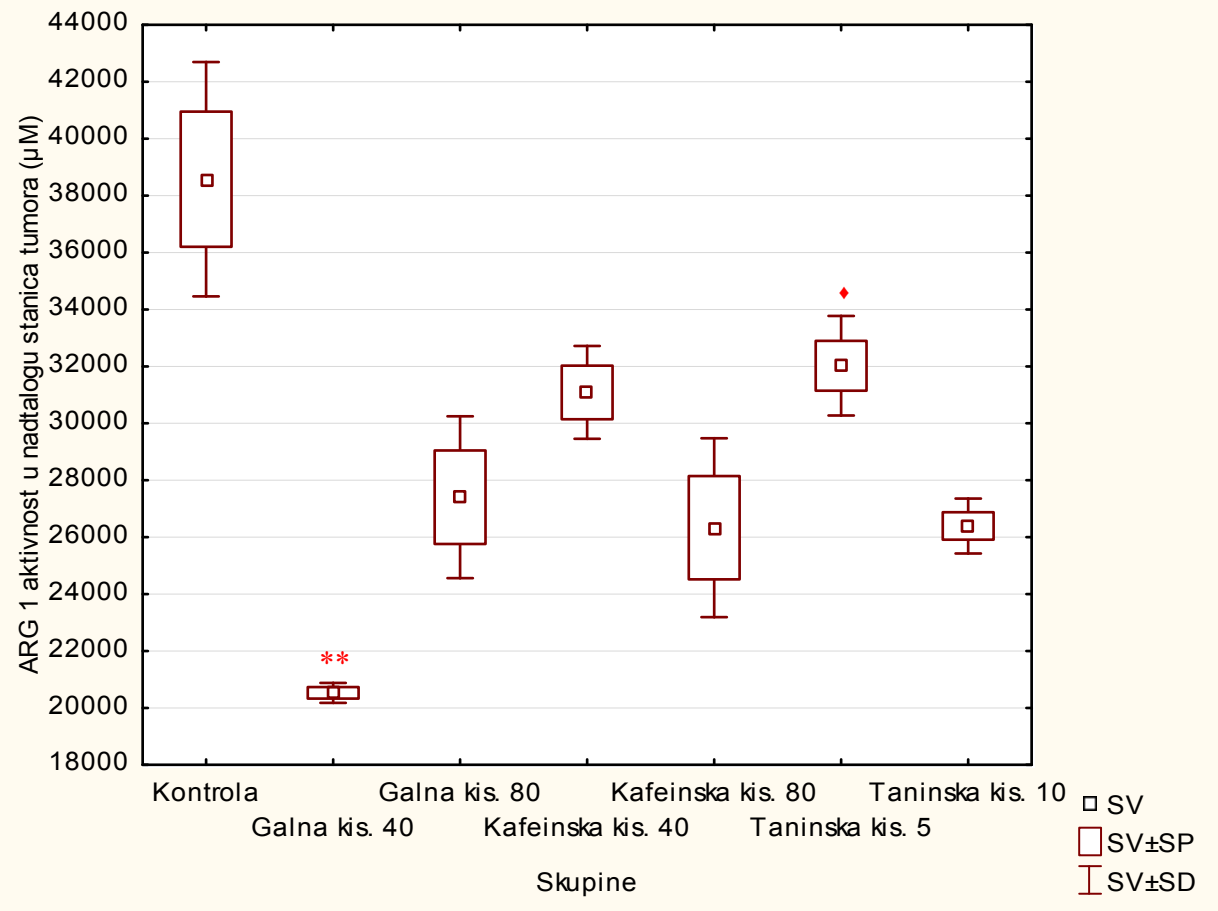
4.5.3.6. Enzimska aktivnost Arg-1 u nadtalogu tumorskih stanica

U nadtalogu tumorskih stanica koje su izolirane iz ascitesne tekućine nakon obrade miševa 10X s fenolnim kiselinama rezultati ukazuju na značajno smanjenje aktivnosti Arg-1 u odnosu na kontrolu kod CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 120). Također, vrijednost Arg-1 je statistički značajno niža kod GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,01$) te kod TA 5 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 121).



Slika 120. Aktivnost Arg-1 u nadtalogu stanica tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

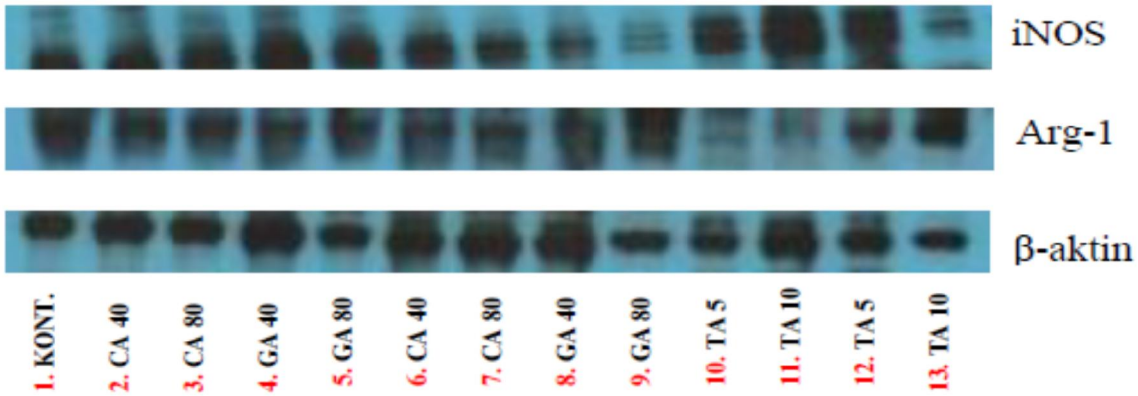


Slika 121. Aktivnost Arg-1 u nadtalogu stanica tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 40 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$) i između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.5.4. Western blot analiza Arg-1 i iNOS u tumorskim stanicama

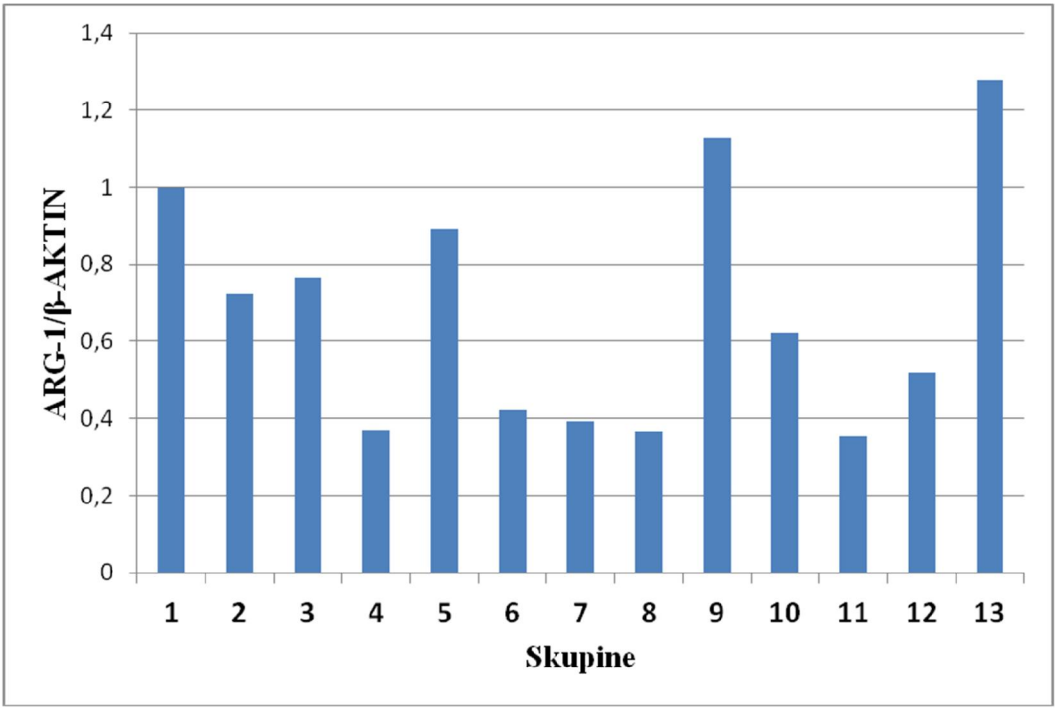
Analiza ekspresije proteina Arg-1 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a koji su obrađeni 10X s fenolnim kiselinama pokazuje smanjenje razine ekspresije Arg-1 kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu. Slično je uočeno i kod obrade miševa svakog drugog dana, s time da je jedino kod skupina GA 80 mg/kg i TA 10 mg/kg uočeno povećanje razine ekspresije proteina Arg-1 u odnosu na kontrolu (Slike 122-123). Prilikom analize ekspresije iNOS proteina u istim tumorskim stanicama uočeno je kod primjene CA 40 mg/kg i GA 40 mg/kg smanjenje razine ekspresije iNOS proteina u odnosu na kontrolu tijekom 10 dana obrade životinja, dok je kod CA 80 mg/kg, GA 80 mg/kg, TA 5 i 10 mg/kg vidljivo povećanje razine ekspresije iNOS proteina u odnosu na kontrolu. Kod obrade životinja svakog drugog dana primjena CA 40 i 80 mg/kg i GA 40 mg/kg dovela je do smanjenja razine ekspresije iNOS proteina u odnosu na kontrolu, dok je kod svih drugih skupina vidljivo povećanje razine ekspresije iNOS proteina (Slika 122, Slika 124).



Slika 122. Western blot analiza ekspresije Arg-1 i iNOS proteina u stanicama tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan i 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana i nakon 5. dana svaki drugi dan.

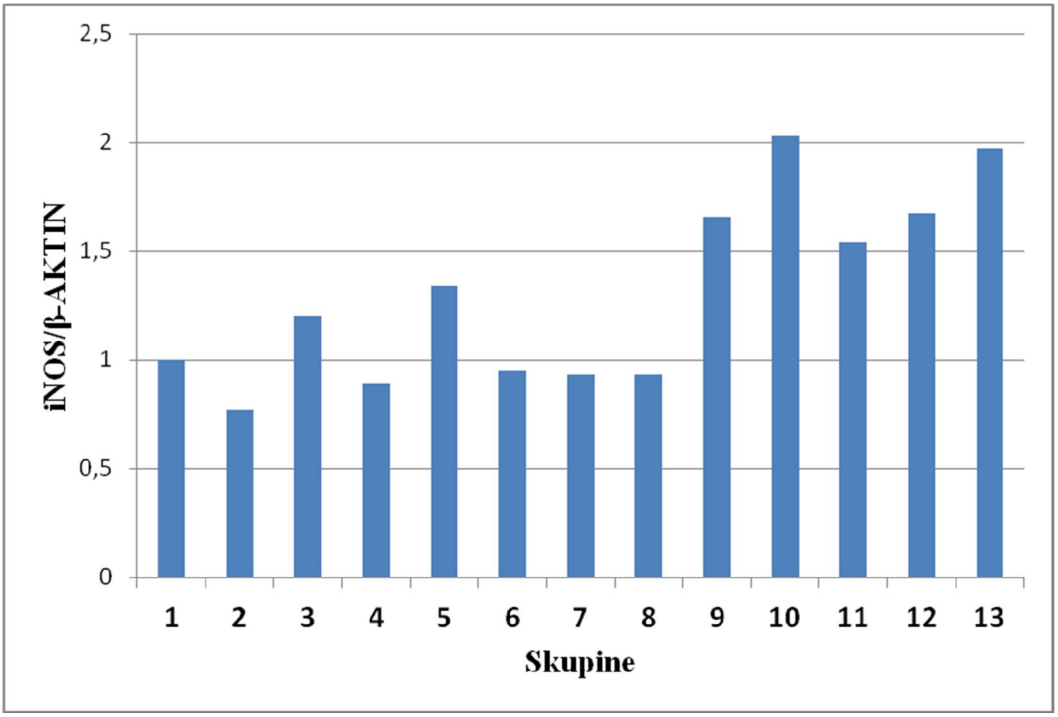
Kratice: 1. – EAT kontrola; **2.** – CA 40 mg/kg-10X; **3.**– CA 80 mg/kg-10X; **4.** – GA 40 mg/kg-10X; **5.**– GA 80 mg/kg-10X; **6.** – CA 40 mg/kg-4X; **7.**– CA 80 mg/kg-4X; **8.** – GA 40 mg/kg-

4X; **9.**– GA 80 mg/kg-4X; **10.** – TA 5 mg/kg-10X; **11.**– TA 10 mg/kg-10X; **12.** – TA 5 mg/kg-4X; **13.**– TA 10 mg/kg-4X.



Slika 123. Inhibitorni učinak fenolnih kiselina na ekspresiju proteina Arg-1 u stanicama tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih 10X svaki dan i 4X svaki drugi dan. Ekspresija proteina Arg-1 određena je pomoću denzitometrijske analize i normalizirana prema sadržaju β-aktina za svaki uzorak.

Kratice: 1. – EAT kontrola; **2.** – CA 40 mg/kg-10X; **3.**– CA 80 mg/kg-10X; **4.** – GA 40 mg/kg-10X; **5.**– GA 80 mg/kg-10X; **6.** – CA 40 mg/kg-4X; **7.**– CA 80 mg/kg-4X; **8.** – GA 40 mg/kg-4X; **9.**– GA 80 mg/kg-4X; **10.** – TA 5 mg/kg-10X; **11.**– TA 10 mg/kg-10X; **12.** – TA 5 mg/kg-4X; **13.**– TA 10 mg/kg-4X.



Slika 124. Inhibitorni učinak fenolnih kiselina na ekspresiju iNOS proteina u stanicama tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih 10X svaki dan i 4X svaki drugi dan. Ekspresija iNOS proteina određena je pomoću denzitometrijske analize i normalizirana prema sadržaju β-aktina za svaki uzorak.

Kratice: 1. – EAT kontrola; **2.** – CA 40 mg/kg-10X; **3.**– CA 80 mg/kg-10X; **4.** – GA 40 mg/kg-10X; **5.**– GA 80 mg/kg-10X; **6.** – CA 40 mg/kg-4X; **7.**– CA 80 mg/kg-4X; **8.** – GA 40 mg/kg-4X; **9.**– GA 80 mg/kg-4X; **10.** – TA 5 mg/kg-10X; **11.**– TA 10 mg/kg-10X; **12.** – TA 5 mg/kg-4X; **13.**– TA 10 mg/kg-4X.

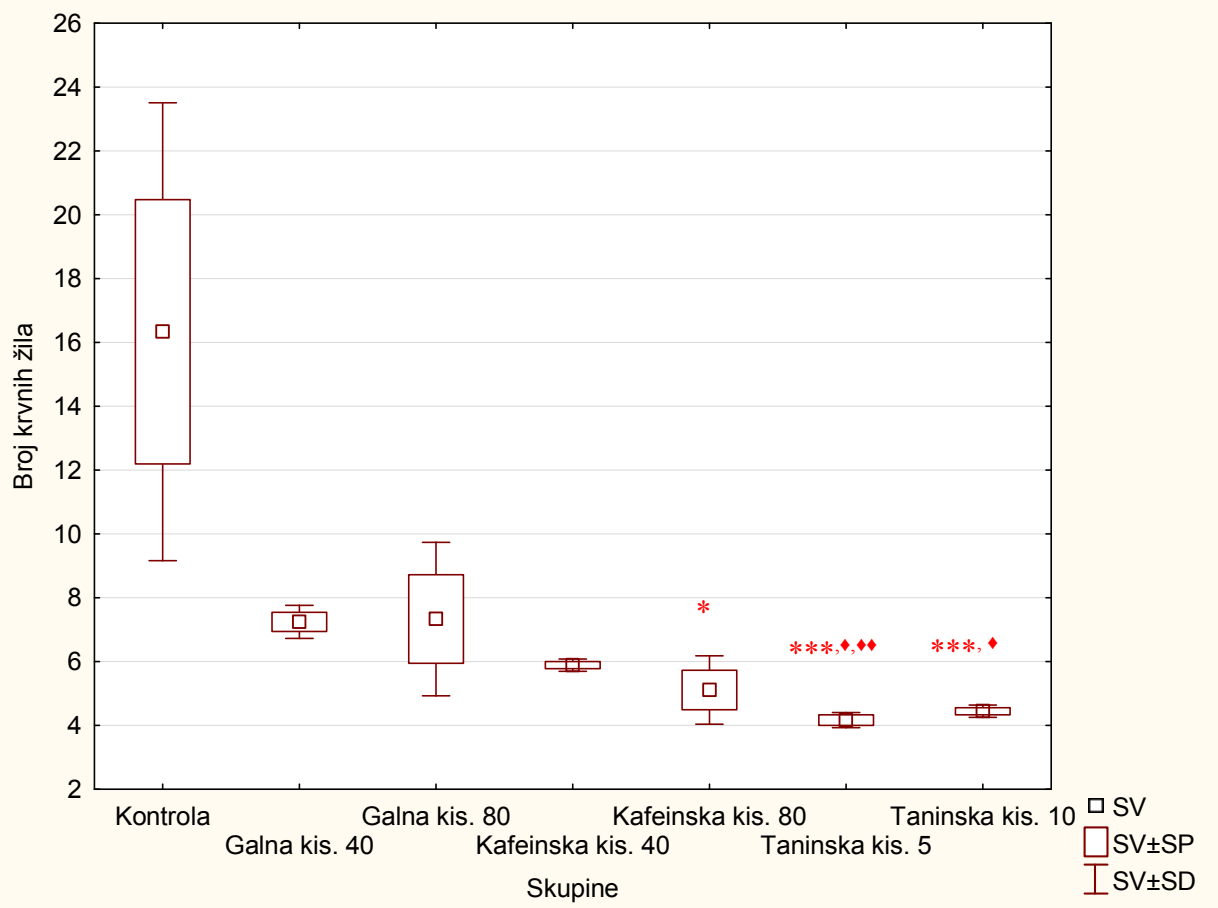
4.6. ANTIANGIOGENI UČINAK FENOLNIH KISELINA

Uz brojne čimbenike, VEGF koji povećava krvožilnu propusnost i potiče rast novih krvnih žila, jedan je od odgovornih čimbenika za stvaranje ascitesa i angiogeneze. Procesu rasta i širenja tumora pridonose brojni čimbenici uključujući brojni genetski i epigenetski čimbenici, reaktivni radikali kisika (ROS), te oslabljeni imunosni nadzor. Rastući tumor treba razgranatu mrežu kapilara (tzv. proces angiogeneze) kako bi si osigurao hranjive tvari i kisik. Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz već postojećih i smatra se ključnom za rast tumora i metastaziranje. U tomu važnu ulogu imaju tumoru pridruženi makrofazi (TAMs) koji obavljaju imunosupresivne uloge kroz a) oslobađanje protuupalnih citokina; b) moduliranje mikrookoliša tumora proizvodnjom čimbenika preživljenja/rasta (primjerice, VEGF); c) olakšavanje progresije tumora kroz otpuštanje proangiogenih čimbenika (npr. MMP-2 i MMP-9); d) povećanje aktivnosti Arg-1, a smanjenje aktivnosti iNOS.

Temeljem navedenog antiangiogeni učinak fenolnih kiselina pratili smo kvantitativnim mjerenjem prožiljenosti peritonealne ovojnice, zatim određivanjem koncentracije VEGF-a, te MMP-2 i MMP-9 u uzorcima nadtaloga tumorskih stanica, tumorskim stanicama i nestimuliranim makrofagima ascitesa.

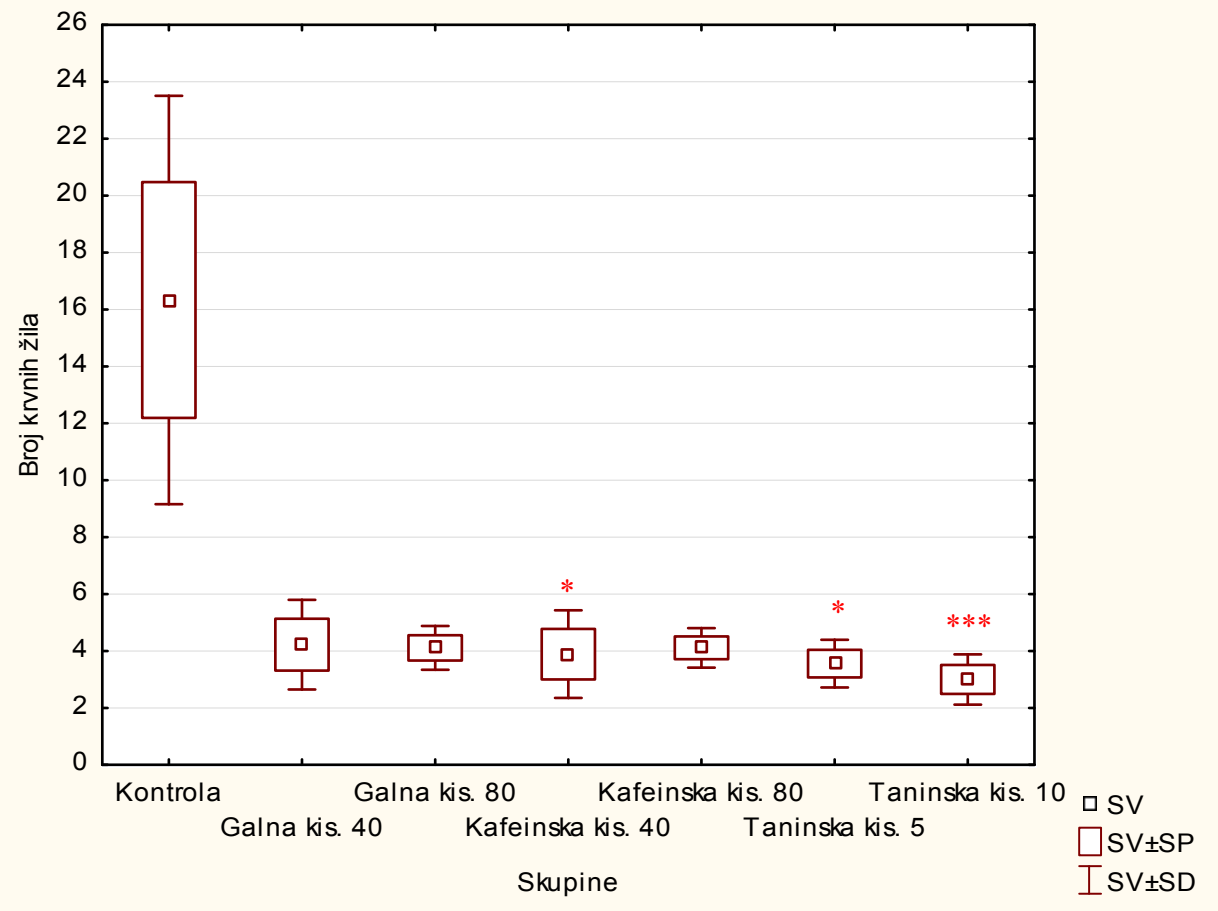
4.6.1. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja prožiljenosti peritonealne ovojnice koju smo proveli određivanjem prosječne gustoće prožiljenosti peritonealne ovojnice (MVD) u područjima najintenzivnije prokrvljenosti na ukupnom povećanju mikroskopa od 400X pokazala je statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu kod CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) te TA 5 mg/kg i TA 10 mg/kg ($P < 0,001$) tijekom obrade miševa 10X svaki dan (Slika 125). Također kod ovog načina obrade miševa uočene su statistički značajne razlike u odnosu na GA 40 mg/kg kod skupina TA 5 mg/kg ($P < 0,01$), TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) te u odnosu na GA 80 mg/kg kod skupine TA 5 mg/kg ($P < 0,05$). Što se tiče rezultata analize prožiljenosti peritonealne ovojnice miševa koji su obrađeni 4X svaki drugi dan vidljiva je statistička značajnost kod skupina CA 40 mg/kg i TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) te TA 10 mg/kg ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolu (Slika 126). Na Slikama 127-128 vidljiv je makroskopski prikaz krvnih žila iz izolirane potrbušnice miša nositelja EAT-a, dok Slike 129-130 prikazuju histološke preparate potrbušnice miša nositelja EAT-a nakon obrade fenolnim kiselinama 10X i 4X.



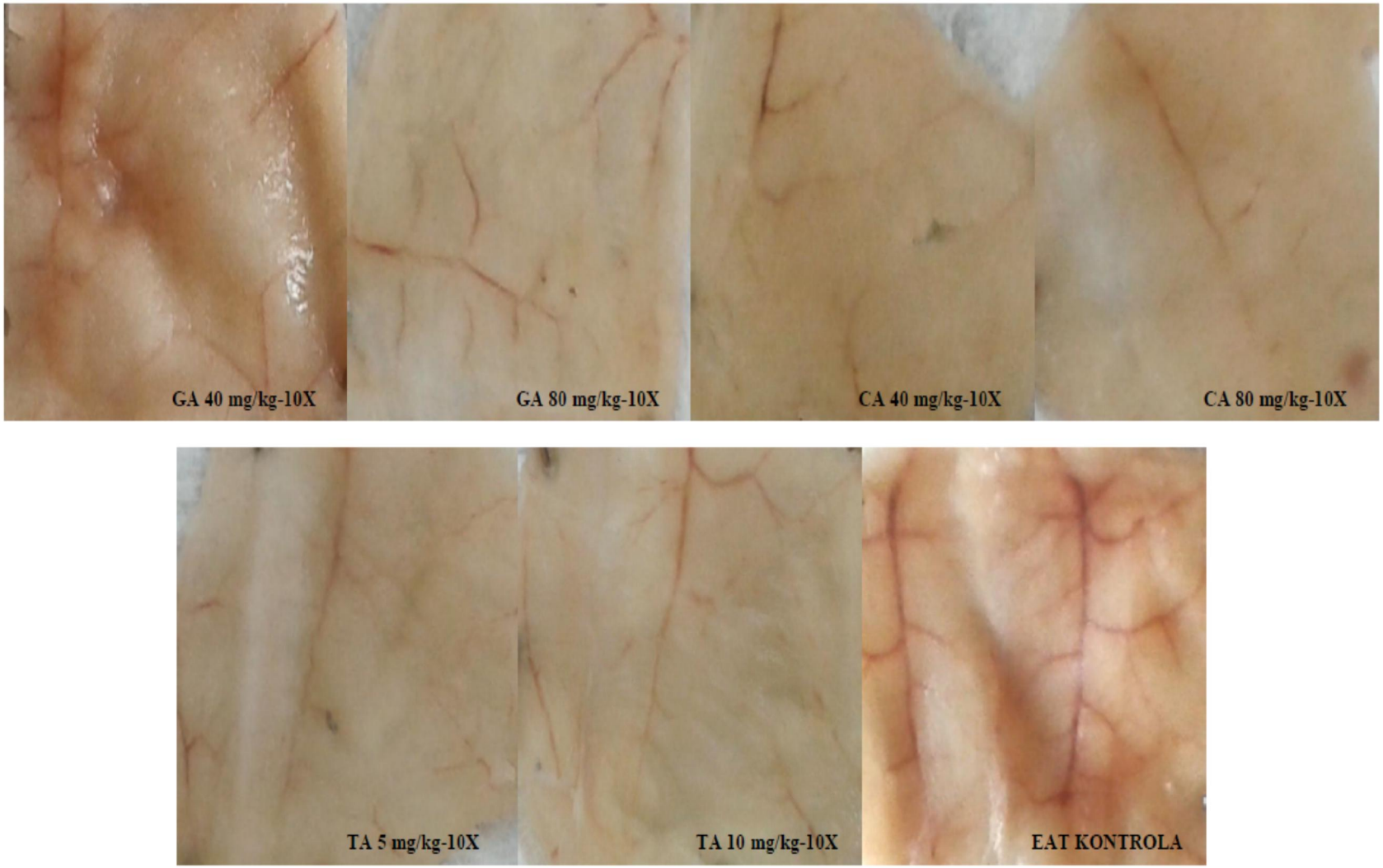
Slika 125. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=6) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu: CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); TA 5 mg/kg *vs* KONTR.; TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (***$P < 0{,}001$) i između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦♦$P < 0{,}01$), TA 5 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$), TA 10 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

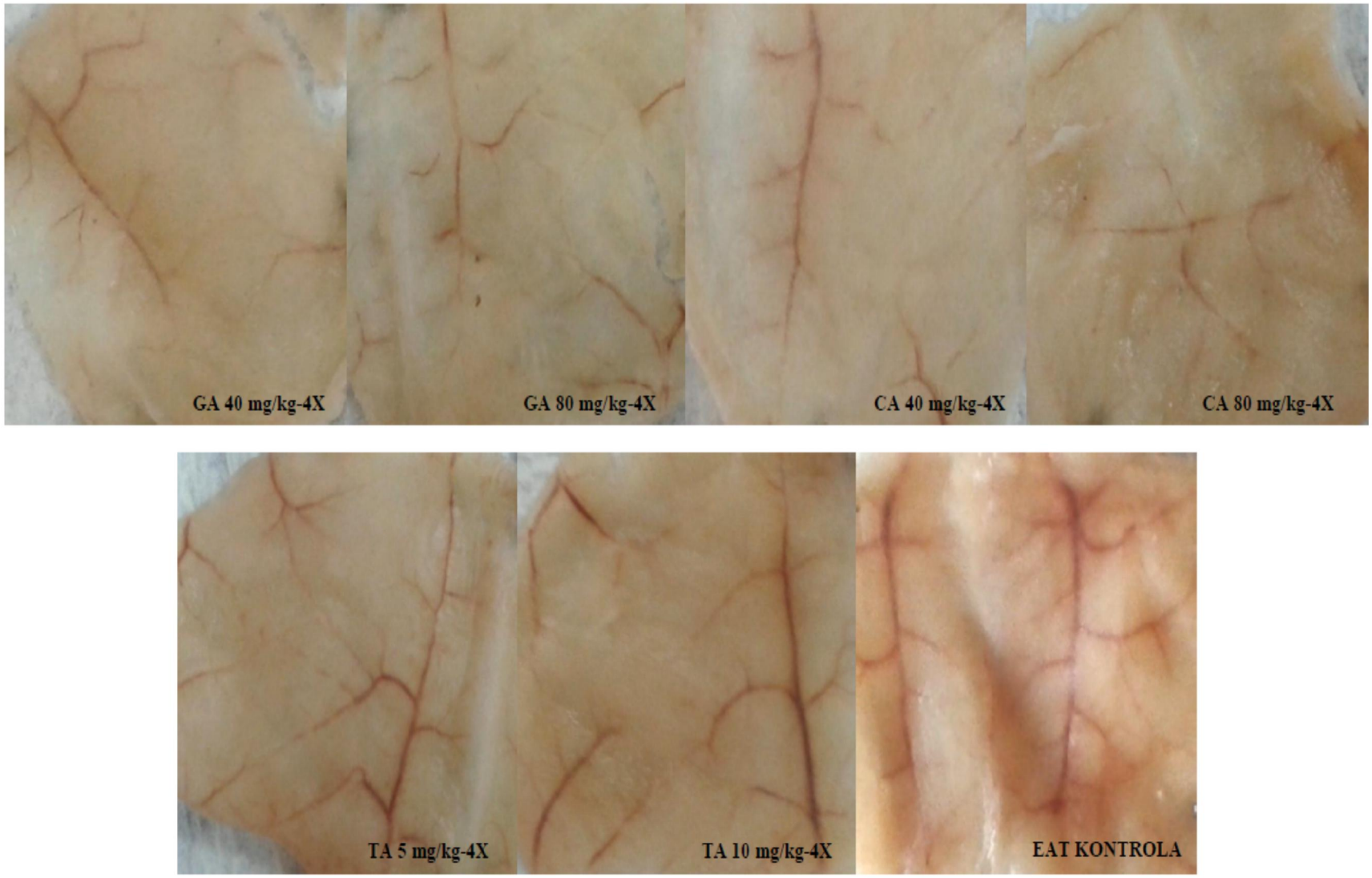


Slika 126. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=6) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu: CA 40 mg/kg *vs* KONTR.; TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$); TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (***$P < 0{,}001$).

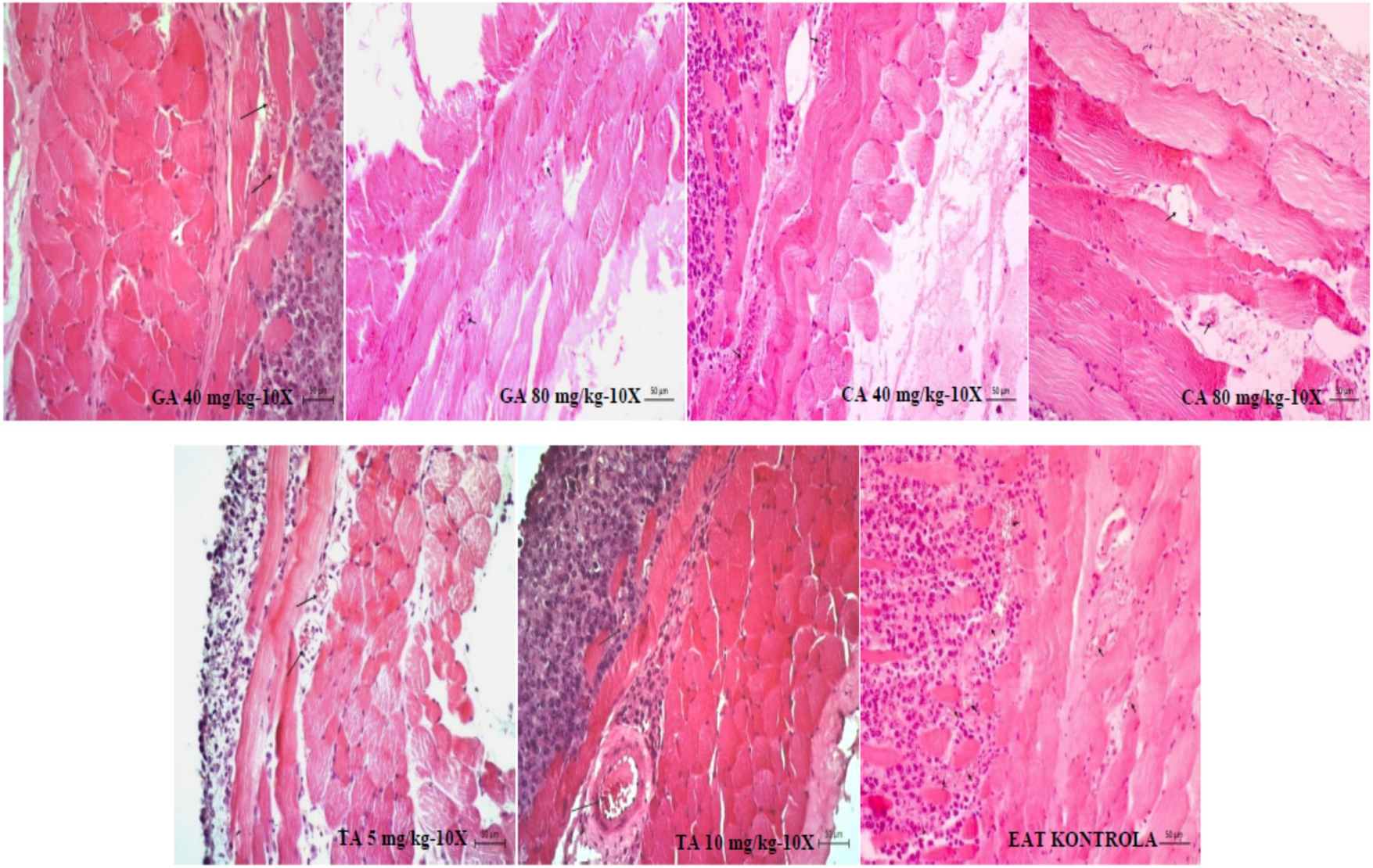
Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



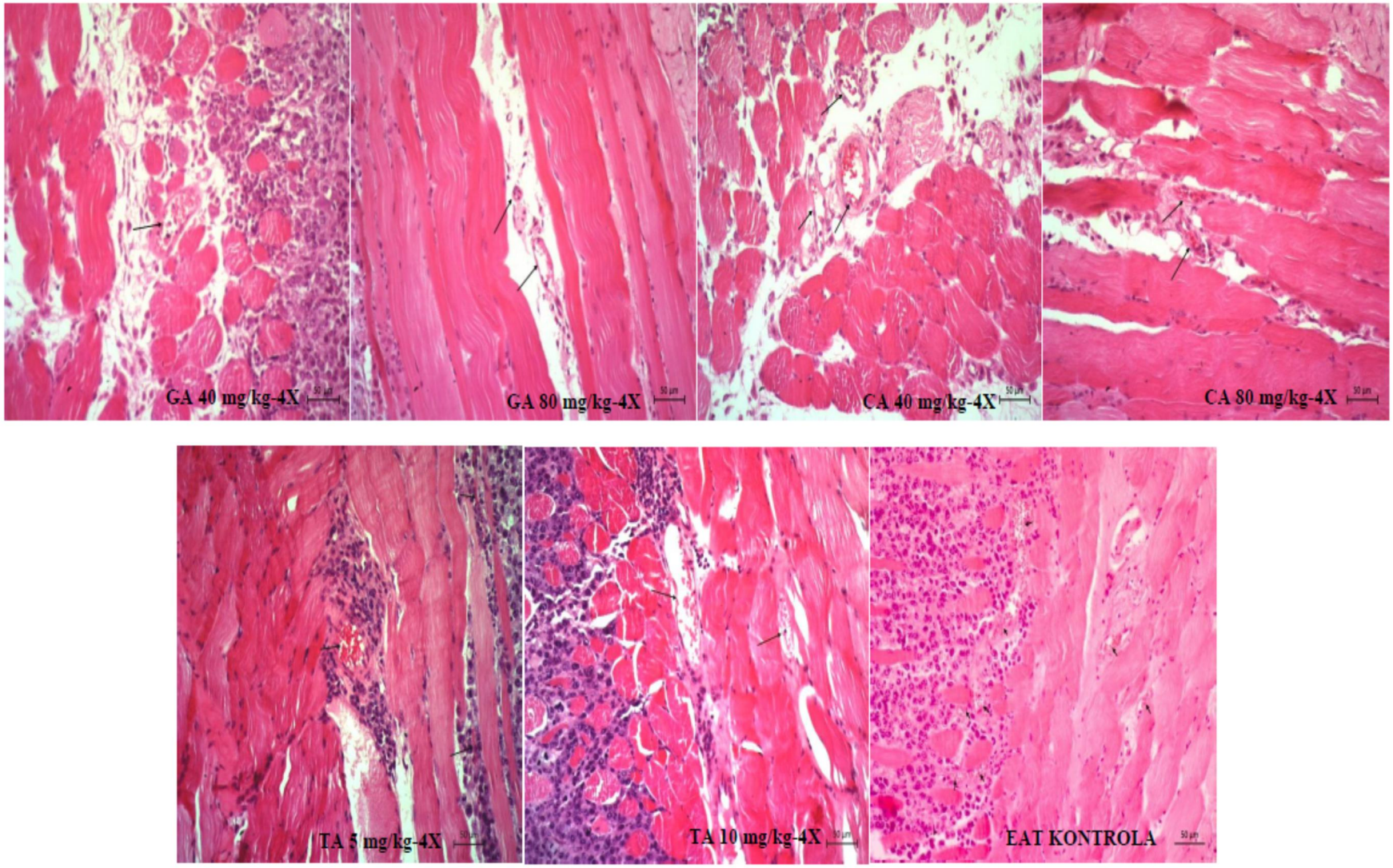
Slika 127. Makroskopski prikaz krvnih žila iz izolirane potrbušnice miša nositelja EAT-a (kontrola) i obrađenih skupina (GA 40 mg/kg i 80 mg/kg; CA 40 mg/kg i 80 mg/kg; TA 5 mg/kg i 10 mg/kg) tijekom 10 dana (10X)



Slika 128. Makroskopski prikaz krvnih žila iz izolirane potrbušnice miša nositelja EAT-a (kontrola) i obrađenih skupina (GA 40 mg/kg i 80 mg/kg; CA 40 mg/kg i 80 mg/kg; TA 5 mg/kg i 10 mg/kg) nakon 5. dana svaki drugi dan (4X)



Slika 129. Histološki preparati potrbušnice miša nositelja EAT-a (kontrola) i obrađenih skupina (GA 40 mg/kg i 80 mg/kg; CA 40 mg/kg i 80 mg/kg; TA 5 mg/kg i 10 mg/kg) tijekom 10 dana (HE 200 X)

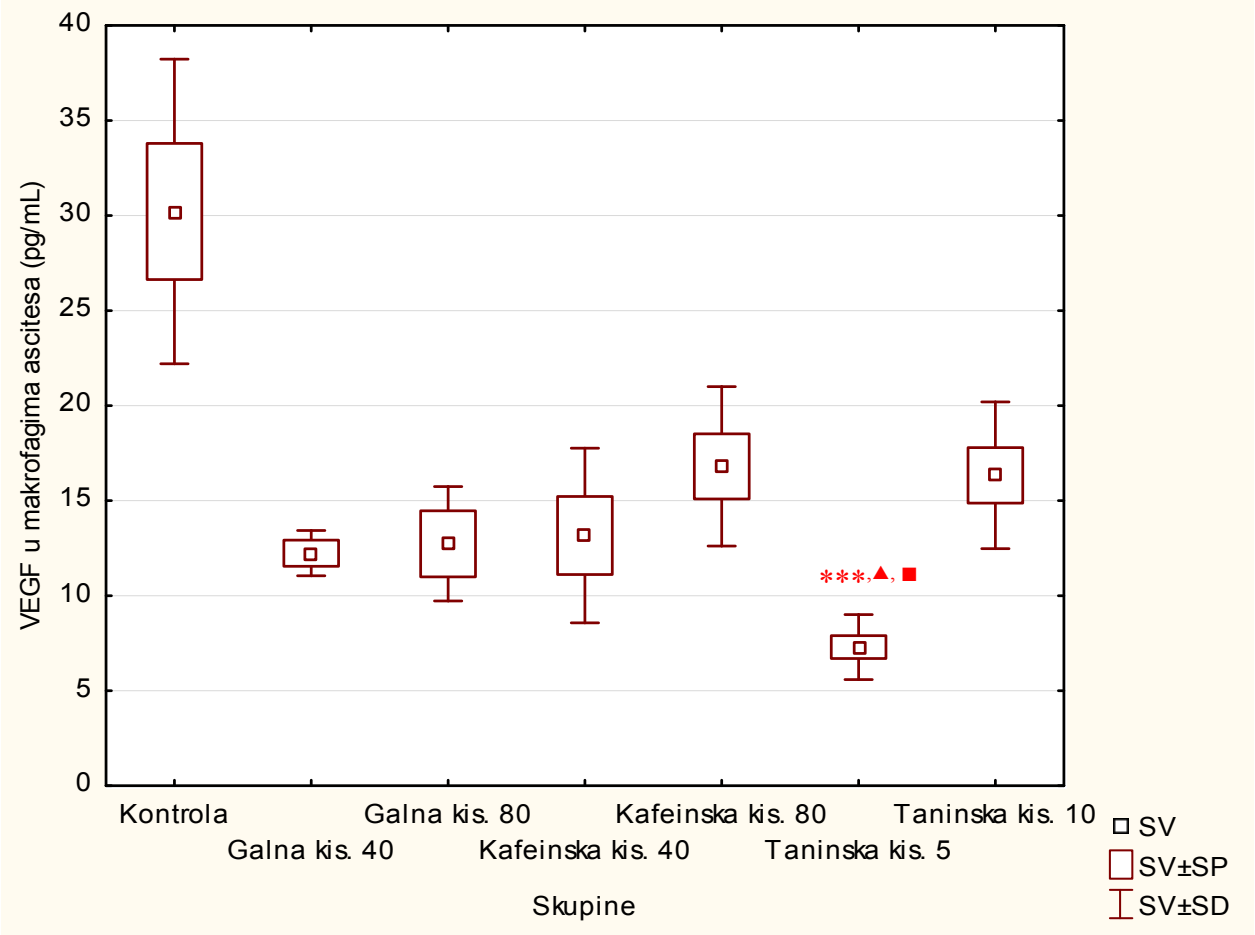


Slika 130. Histološki preparati potrbušnice miša nositelja EAT-a (kontrola) i obrađenih skupina (GA 40 mg/kg i 80 mg/kg; CA 40 mg/kg I 80 mg/kg; TA 5 mg/kg i 10 mg/kg) nakon 5. dana svaki drugi dan (4X) (HE 200 X)

4.6.2. Razina VEGF čimbenika u uzorcima

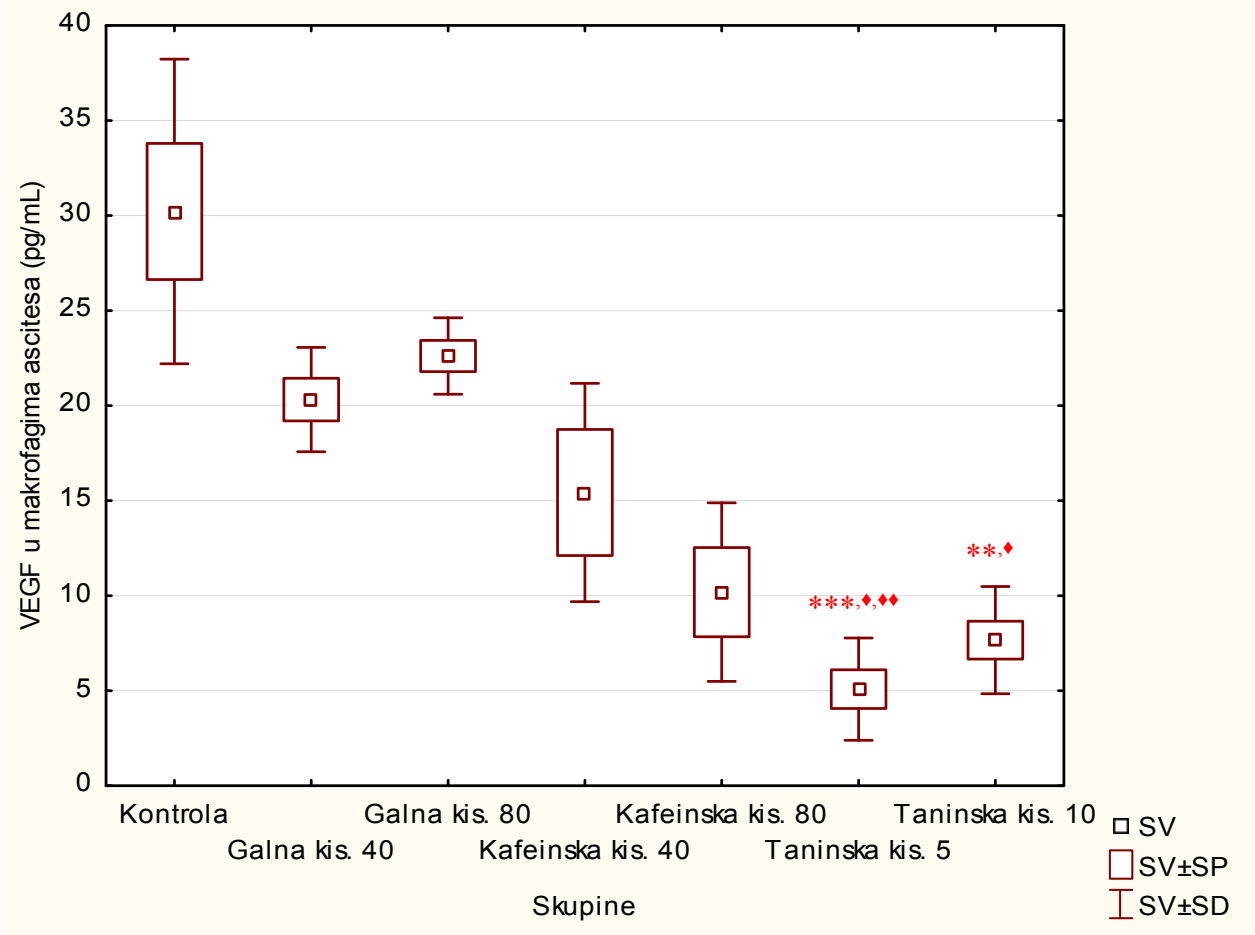
4.6.2.1. Razina VEGF-a u nestimuliranim makrofagima ascitesa

U nestimuliranim makrofagima ascitesa izmjerena razina VEGF-a pokazuje značajno nižu koncentraciju VEGF-a u odnosu na kontrolu kod TA 5 mg/kg ($P < 0,001$) te kod obrađenih skupina TA 5 mg/kg u odnosu na CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 5 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 131) kod obrade miševa 10X s fenolnim kiselinama. Također i kod kratkotrajne obrade miševa koja je započela od 5. dana i trajala svaki drugi dan uočeno je značajno smanjenje razine VEGF-a u odnosu na kontrolu kod TA 10 mg/kg ($P < 0,01$) i TA 5 mg/kg ($P < 0,001$) te između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg, TA 10 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) te TA 5 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,01$) (Slika 132).



Slika 131. Razina VEGF-a u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (***$P < 0{,}001$) i između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* CA 80 mg/kg (▲$P < 0{,}05$), TA 5 mg/kg *vs* TA 10 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

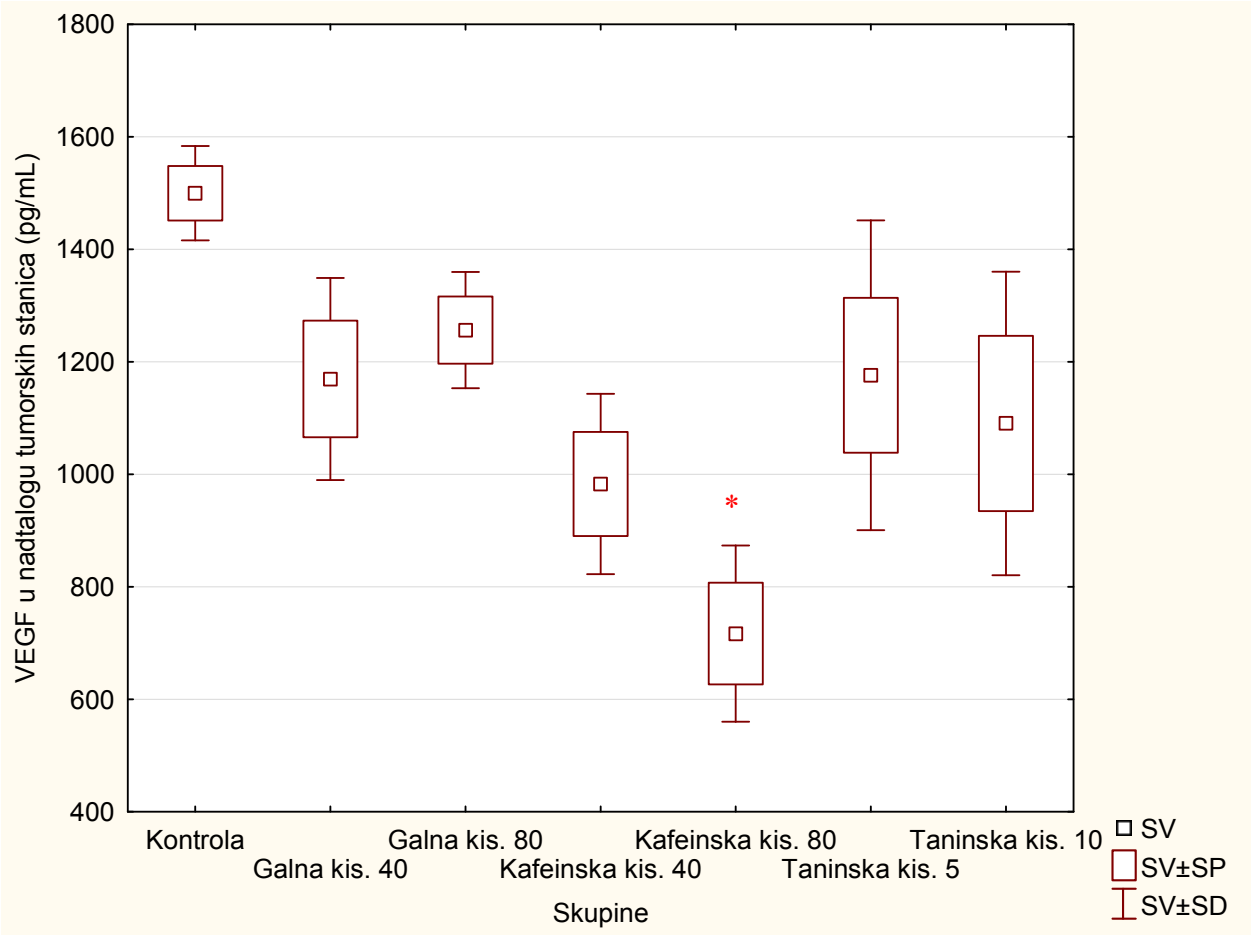


Slika 132. Razina VEGF-a u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$); TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (***$P < 0{,}001$) i između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg, TA 10 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$), TA 5 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦♦$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

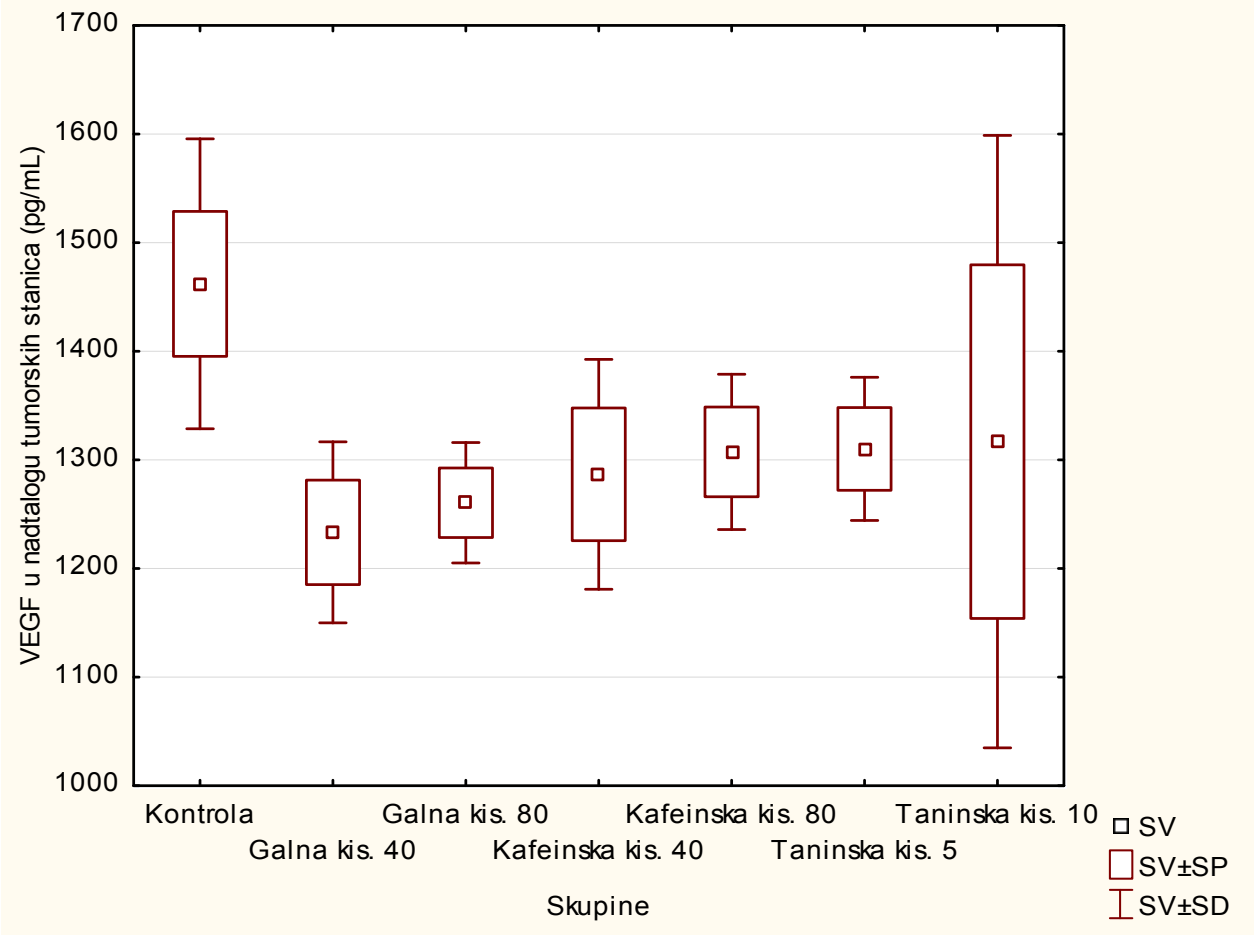
4.6.2.2. Razina VEGF-a u nadtalogu tumorskih stanica

Određivanje koncentracije čimbenika rasta krvožilnog endotela (VEGF-a) napravljena je pomoću sendvič ELISA metode prema uputama proizvođača očitavanjem vrijednosti apsorbancije na 450 nm. Iz rezultata proizlazi da je u uzorcima nadtaloga tumorskih stanica kod svih obrađenih skupina vidljivo smanjenje koncentracije VEGF-a u odnosu na kontrolu, ali statistički značajno smanjenje vidljivo je samo kod skupine obrađene s CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu tijekom kontinuirane obrade životinja (10X) (Slika 133). S druge strane, kod uzoraka kada su životinje bile obrađene samo 4X nisu zamijećene nikakve statistički značajne promjene kako u odnosu na kontrolu tako i između samih obrađenih skupina, iako sami rezultati pokazuju tendenciju smanjenja koncentracije VEGF-a kod svih obrađenih skupina u usporedbi s kontrolom (Slika 134).



Slika 133. Razina VEGF-a u nadtalogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

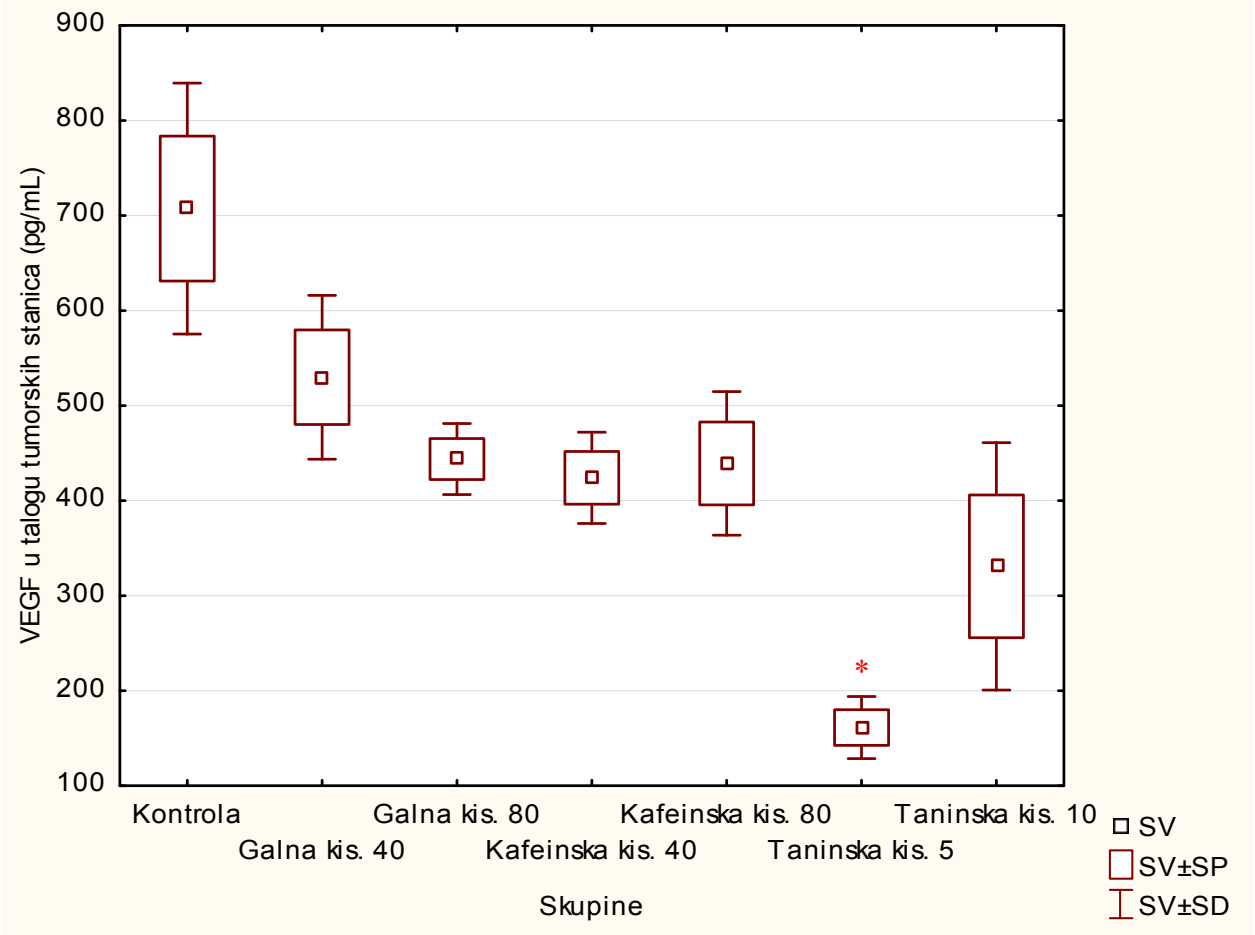


Slika 134. Razina VEGF-a u nadtalogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica (2,5x10^6) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

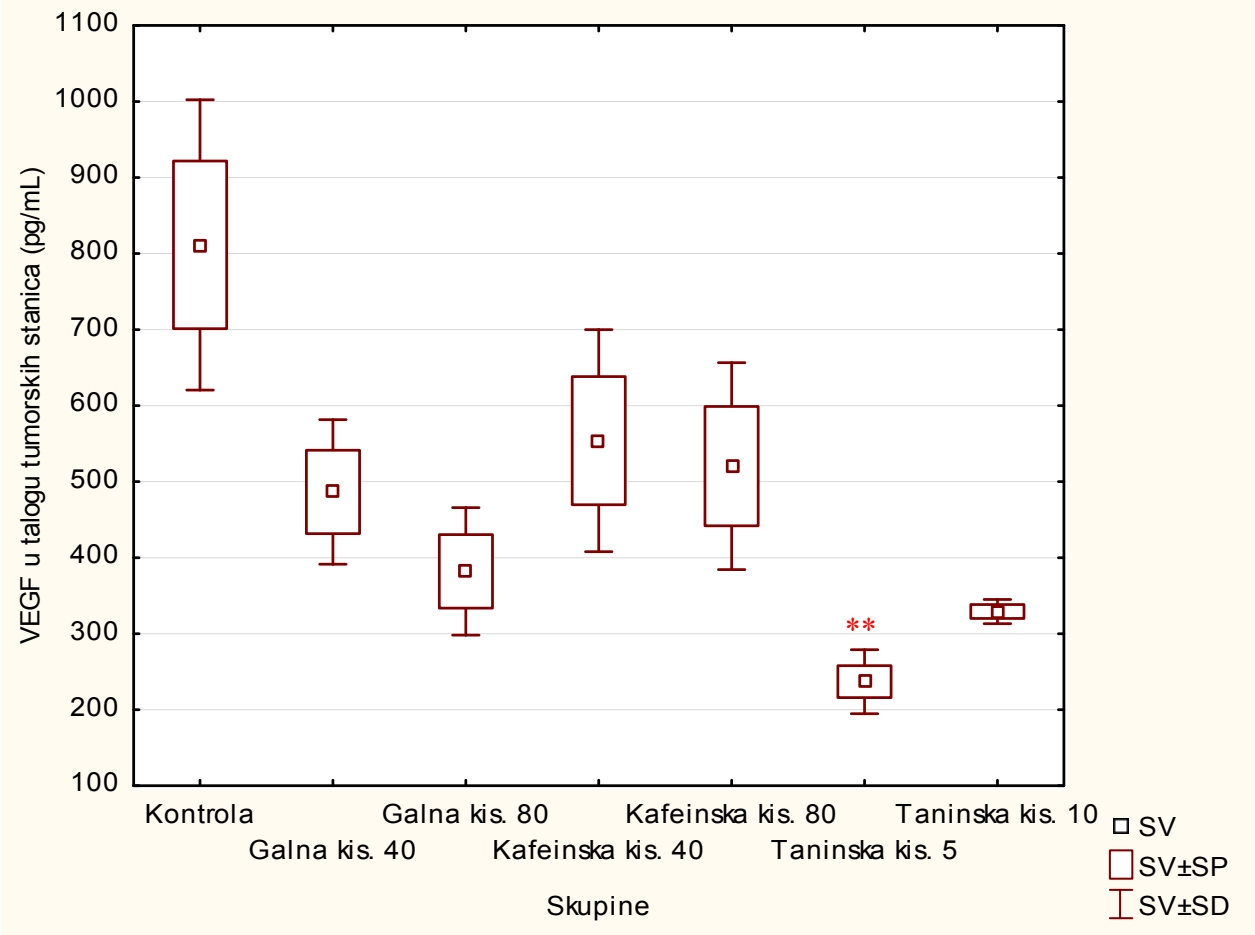
4.6.2.3. Razina VEGF-a u tumorskim stanicama

Analiza rezultata koncentracije VEGF-a u samim tumorskim stanicama pokazuje značajno smanjenje koncentracije kod skupine obrađene s TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) iako je kod svih obrađenih skupina zamijećen pad koncentracije VEGF-a u odnosu na kontrolu tijekom 10 dana obrade životinja (Slika 135). Također, slično je uočeno i nakon 4X obrade životinja počevši od 5. dana kada je tumor u eksponencijalnoj fazi rasta, pri čemu je vidljivo značajno smanjenje koncentracije VEGF-a kod skupine TA 5 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,01$) premda je i kod svih drugih skupina vidljivo smanjenje koncentracije VEGF-a (Slika 136).



Slika 135. Razina VEGF-a u talogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



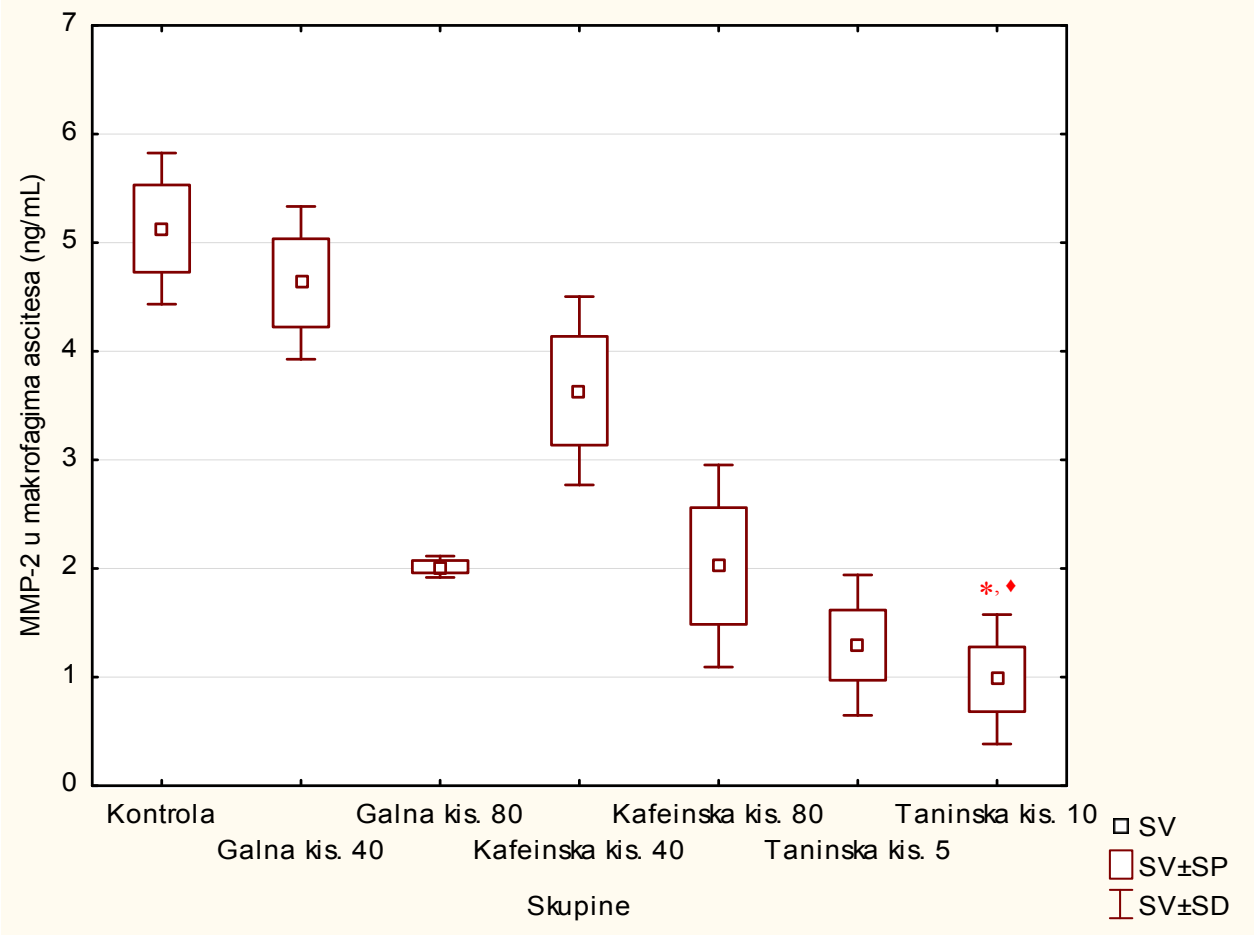
Slika 136. Razina VEGF-a u talogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.3. Koncentracija matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) u uzorcima

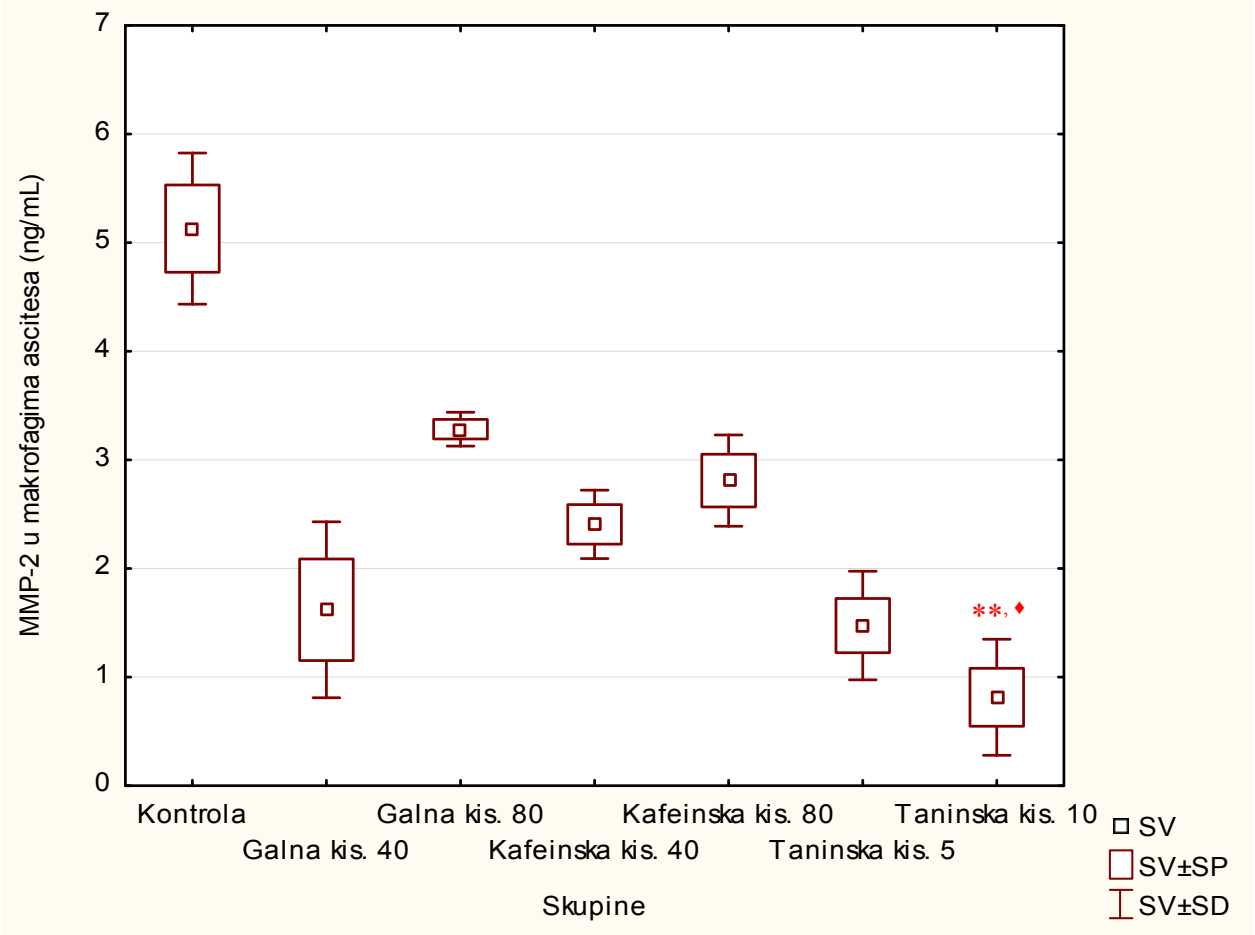
4.6.3.1. Koncentracija MMP-2 u nestimuliranim makrofagima ascitesa

Koncentracija MMP-2 koja je određena u uzorcima nestimuliranih makrofaga ascitesa ukazuje na smanjenje razine MMP-2 kod TA 10 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) te kod TA 10 mg/kg u odnosu na GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) kod dugotrajne obrade tumora (10X) (Slika 137). Isto tako, uočeno je značajno niža koncentracija MMP-2 kod TA 10 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,01$) i TA 10 mg/kg u odnosu na GA 80 mg/kg ($P < 0,05$) kod obrade životinja 4X (Slika 138). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da oba dva načina obrade životinja s fenolnim kiselinama dovode do smanjenja koncentracije MMP-2 i kod ostalih obrađenih skupina, iako ne postoje statistički značajne razlike.



Slika 137. Koncentracija MMP-2 u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$) i između obrađenih skupina: TA 10 mg/kg *vs* GA 40 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

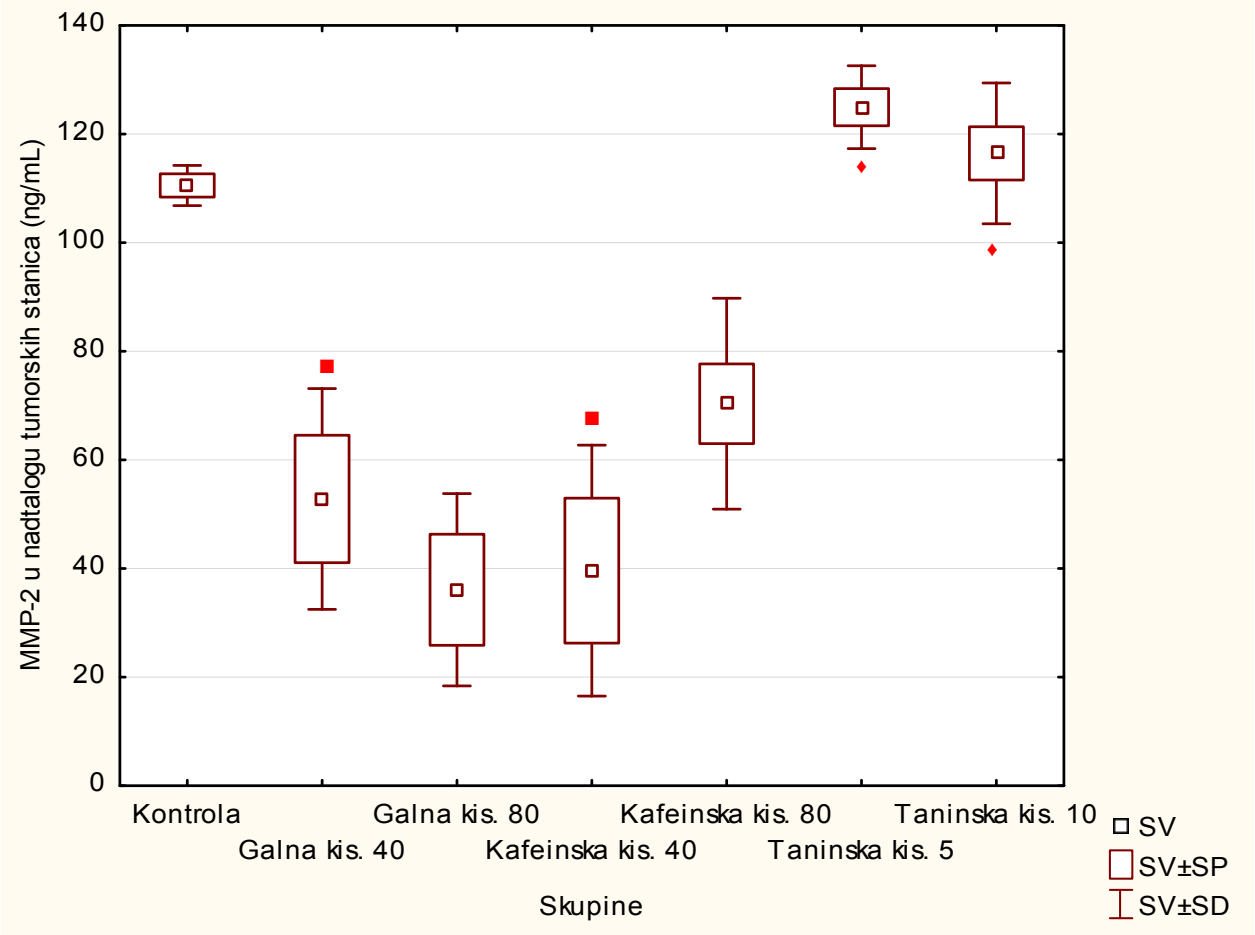


Slika 138. Koncentracija MMP-2 u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (**$P < 0{,}01$) i između obrađenih skupina: TA 10 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

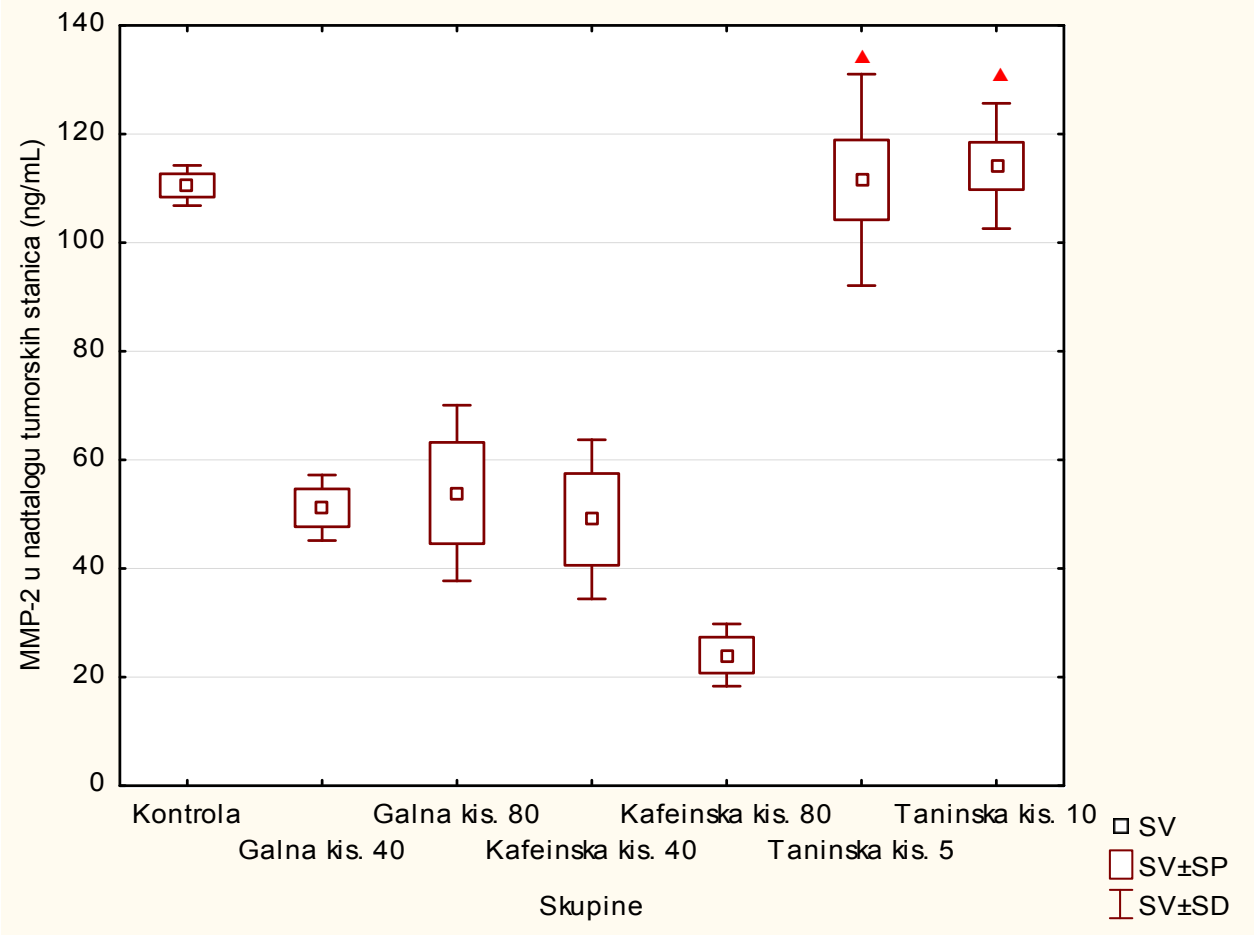
4.6.3.2. Koncentracija MMP-2 u nadtalogu tumorskih stanica

Kvantitativno određivanje matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) sendvič ELISA metodom u nadtalogu tumorskih stanica pokazalo je statistički značajno nižu razinu koncentracije MMP-2 kod sljedećih skupina: GA 40 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg; GA 80 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg; GA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg te CA 40 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) kod dugotrajne obrade tumora (Slika 139). Međutim, kod kratkotrajne obrade tumora kada se on nalazi u eksponencijalnoj fazi rasta uočeno je značajno smanjenje koncentracije MMP-2 kod CA 80 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg i kod CA 80 mg/kg u odnosu na TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 140).



Slika 139. Koncentracija MMP-2 u nadtalogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: GA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$); TA 5 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$); TA 10 mg/kg *vs* GA 80 mg/kg (♦$P < 0{,}05$); CA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

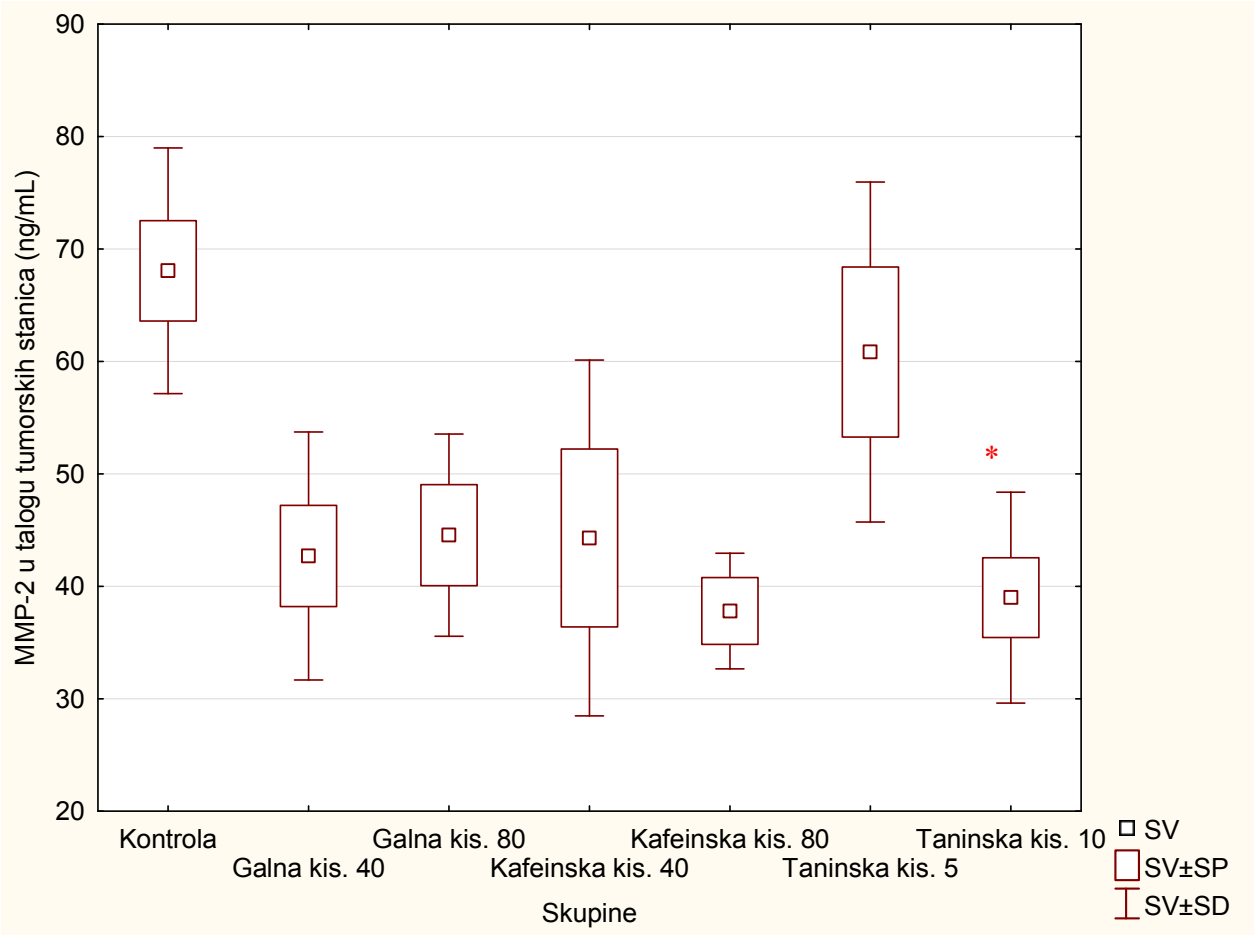


Slika 140. Koncentracija MMP-2 u nadtalogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica (2,5x10^6) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina: TA 5 mg/kg *vs* CA 80 mg/kg; TA 10 mg/kg *vs* CA 80 mg/kg (▲$P < 0,05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

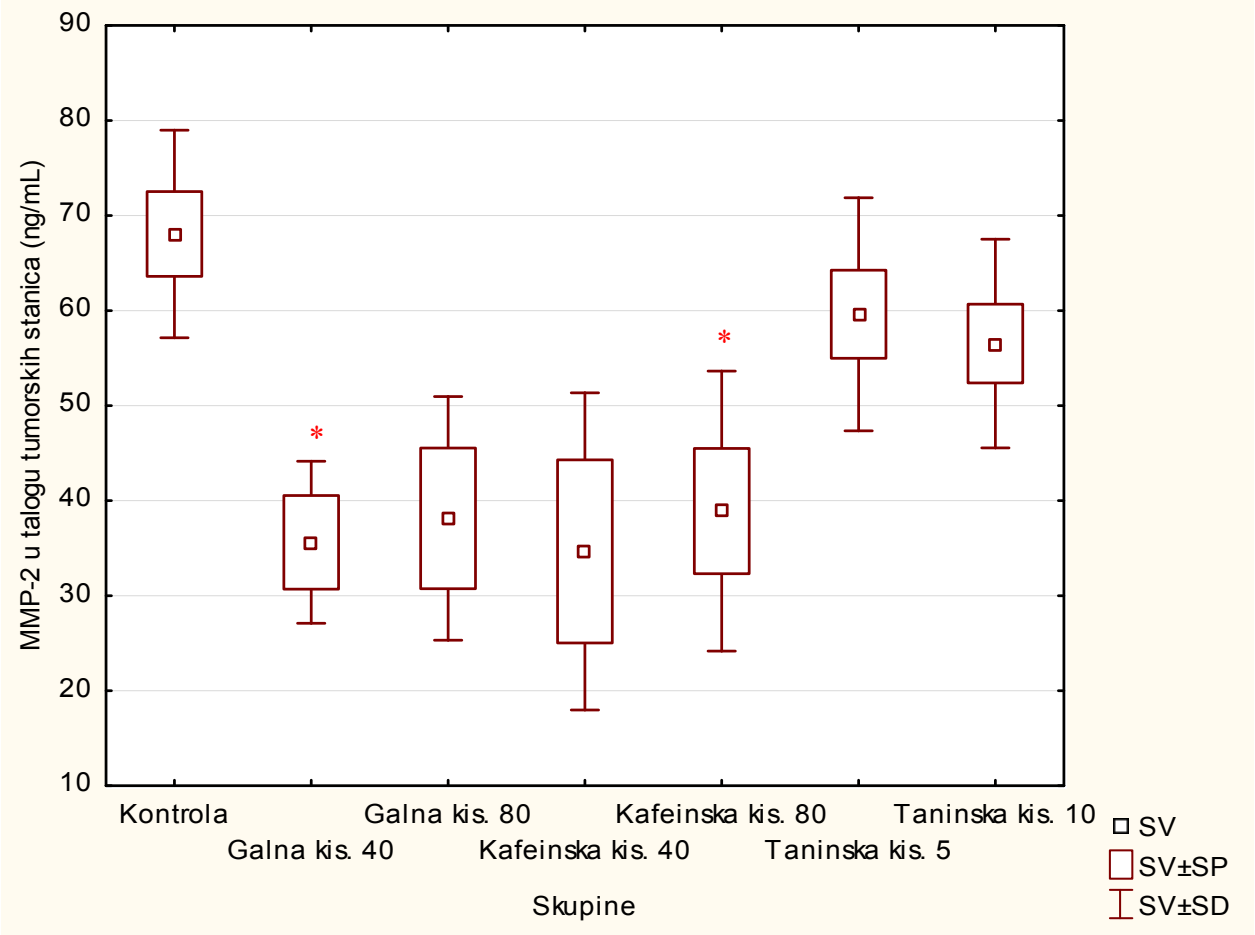
4.6.3.3. Koncentracija MMP-2 u tumorskim stanica

ELISA određivanje koncentracije MMP-2 u tumorskim stanicama ukazuje na značajno smanjenje razine MMP-2 kod TA 10 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) kod obrade miševa 10X svaki dan (Slika 141), iako je i kod ostalih obrađenih skupina vidljiva niža razina koncentracije MMP-2 u odnosu na kontrolu. Slika 142 prikazuje da skupine GA 40 mg/kg i CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) koje su obrađene 4X svaki drugi dan imaju značajno nižu razinu koncentracije MMP-2 u odnosu na kontrolu, premda je i kod ostalih obrađenih skupina uočeno smanjenje koncentracije MMP-2.



Slika 141. Koncentracija MMP-2 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



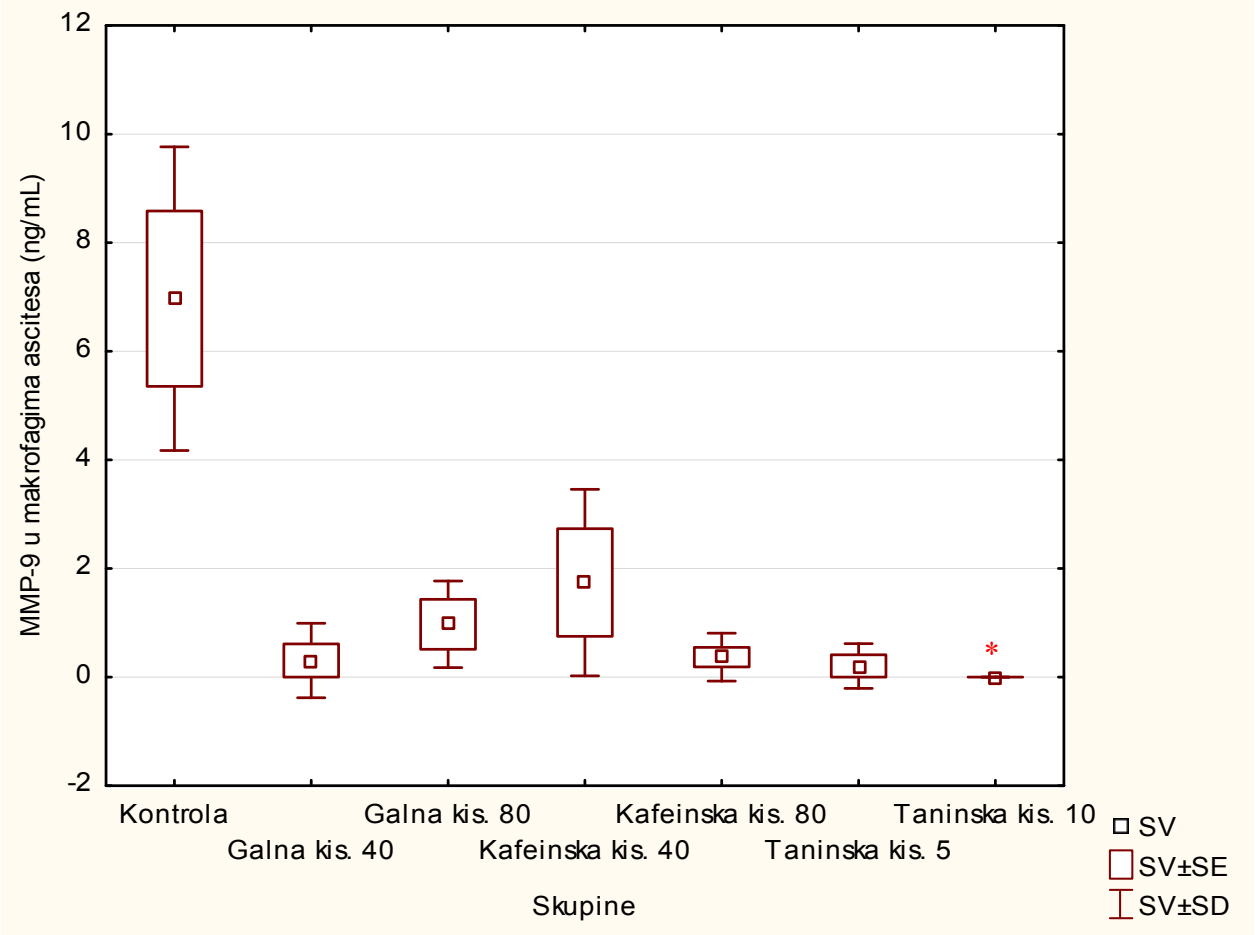
Slika 142. Koncentracija MMP-2 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica (2,5x10^6) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 40 mg/kg *vs* KONTR.; CA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.4. Koncentracija matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u uzorcima

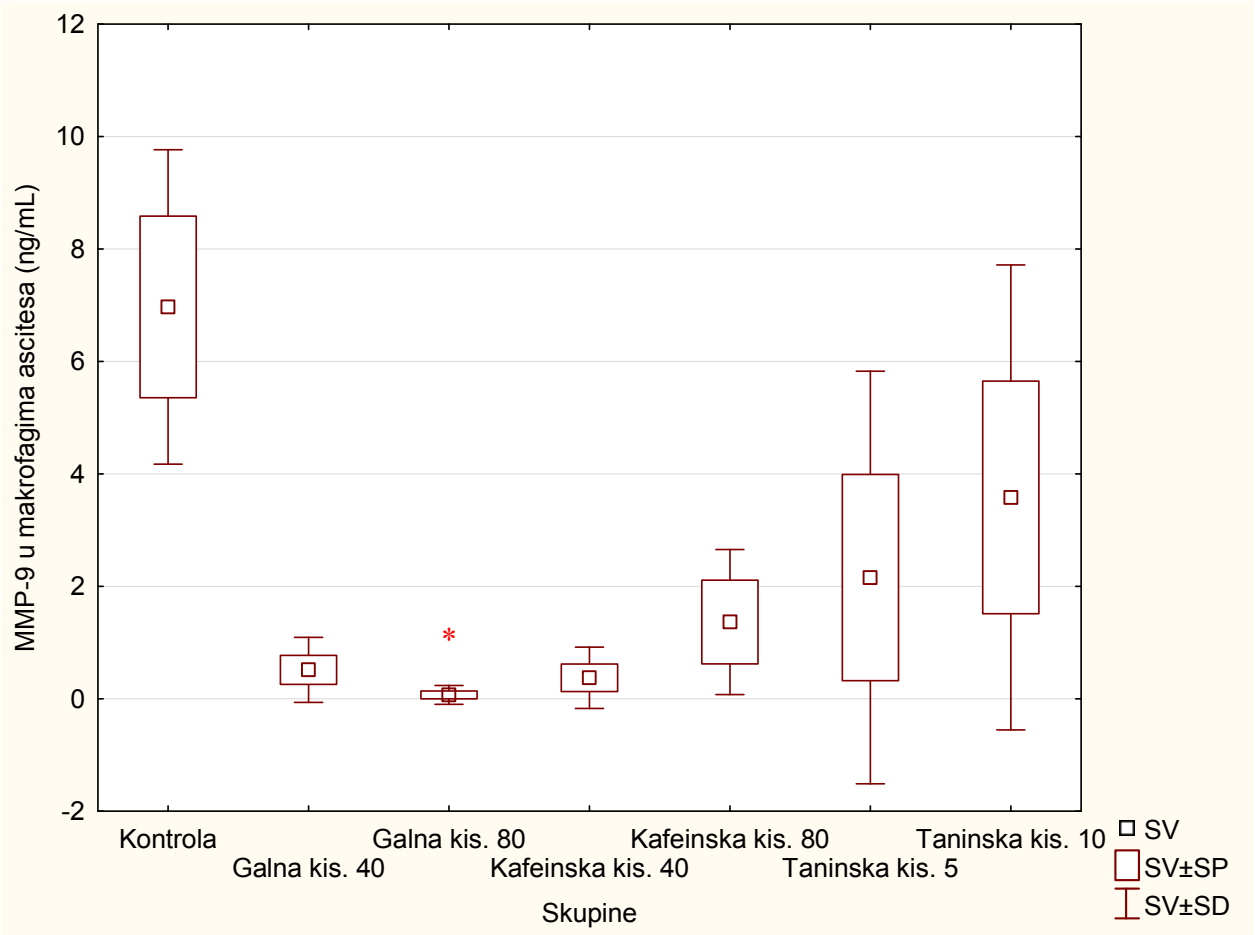
4.6.4.1. Koncentracija MMP-9 u nestimuliranim makrofagima ascitesa

Za matriks metaloproteinazu 9 (MMP-9) statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolu u nestimuliranim makrofagima ascitesa, uočili smo kod primjene TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) kod dugotrajne obrade životinja s fenolnim kiselinama, premda je i kod ostalih obrađenih skupina zamijećen pad koncentracije MMP-9 u odnosu na kontrolu (Slika 143). Isto takvo opažanje vidljivo je i kod obrade životinja 4X svaki drugi dan, s time da je statistički značajno smanjenje koncentracije MMP-9 uočeno samo kod GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu što je prikazano na Slici 144 ($P < 0,05$).



Slika 143. Koncentracija MMP-9 u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: TA 10 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

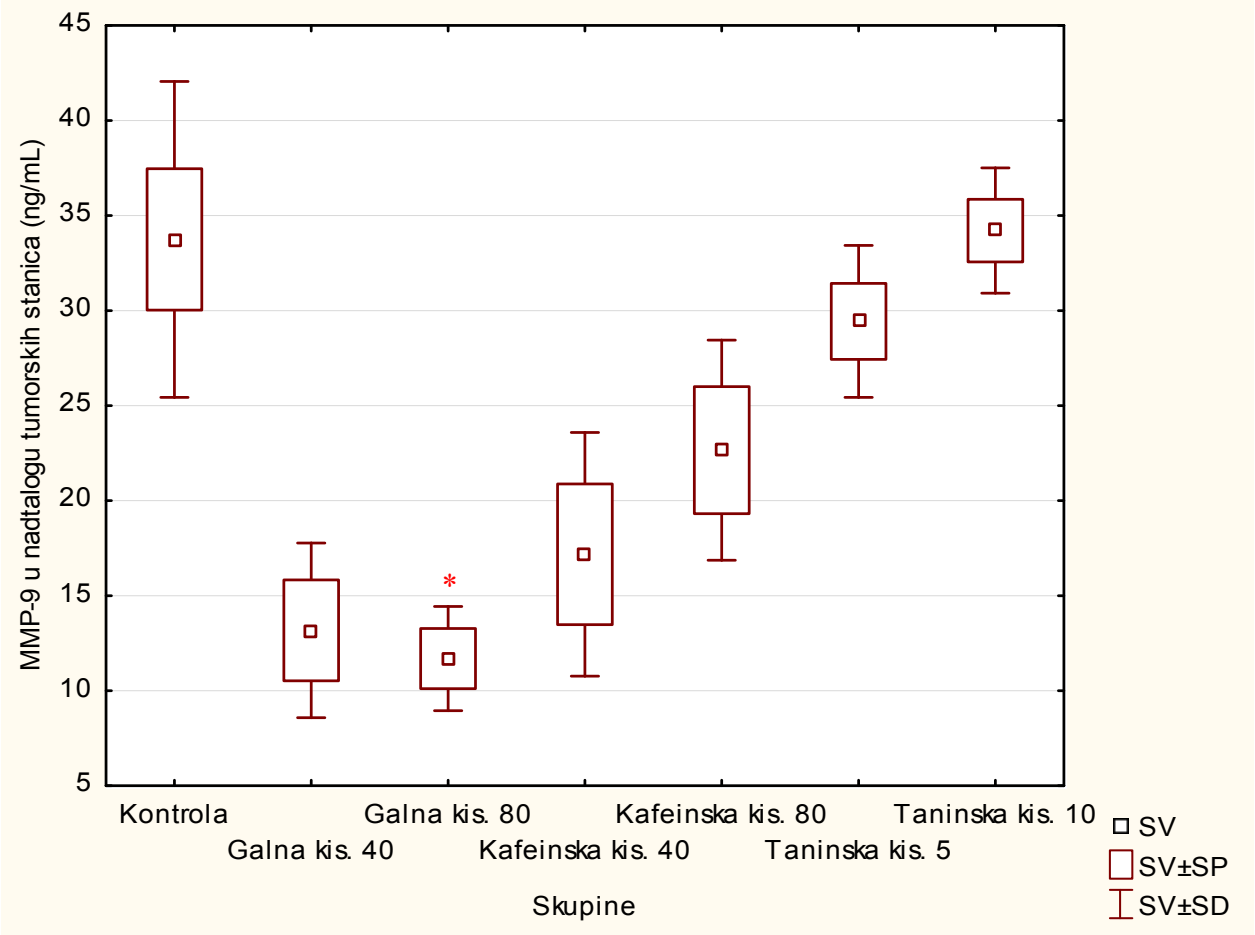


Slika 144. Koncentracija MMP-9 u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

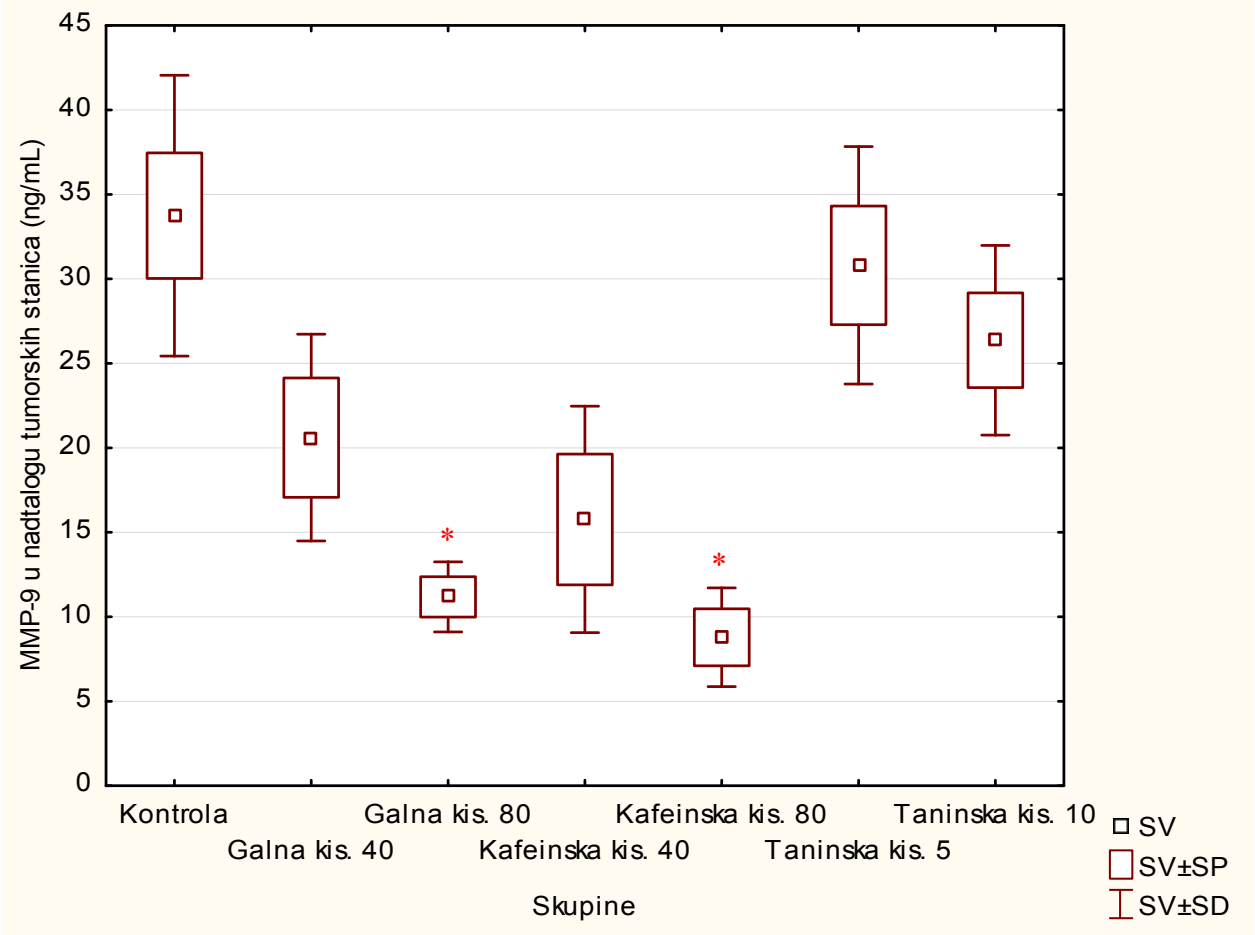
4.6.4.2. Koncentracija MMP-9 u nadtalogu tumorskih stanica

Matriks metaloproteinaza 9 (MMP-9) kvantitativno je određena ELISA metodom u uzorcima nadtaloga tumorskih stanica koje su *ip* izolirane iz ascitesne tekućine nakon obrade životinja 10X. Utvrđeno je da dolazi do smanjenja koncentracije MMP-9 kod skupine GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) što je prikazano na Slici 145. Također, do smanjenja koncentracije MMP-9 došlo je kod CA 80 mg/kg i GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) kod kratkotrajne obrade životinja (4X) kada se tumor nalazi u eksponencijalnoj fazi rasta (Slika 146).



Slika 145. Koncentracija MMP-9 u nadtalogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

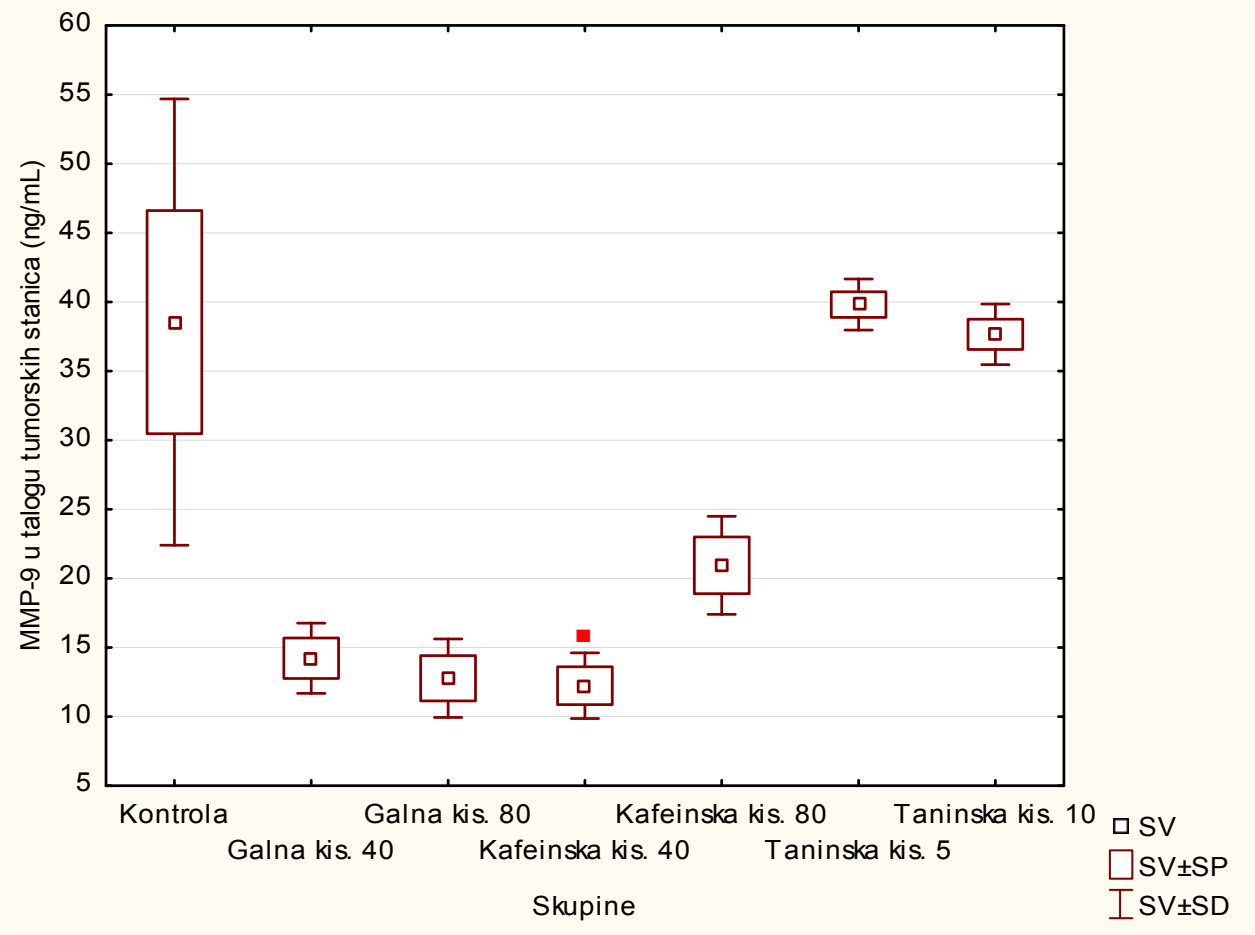


Slika 146. Koncentracija MMP-9 u nadtalogu tumorskih stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica (2,5x10^6) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu: CA 80 mg/kg *vs* KONTR.; GA 80 mg/kg *vs* KONTR. (*$P < 0,05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

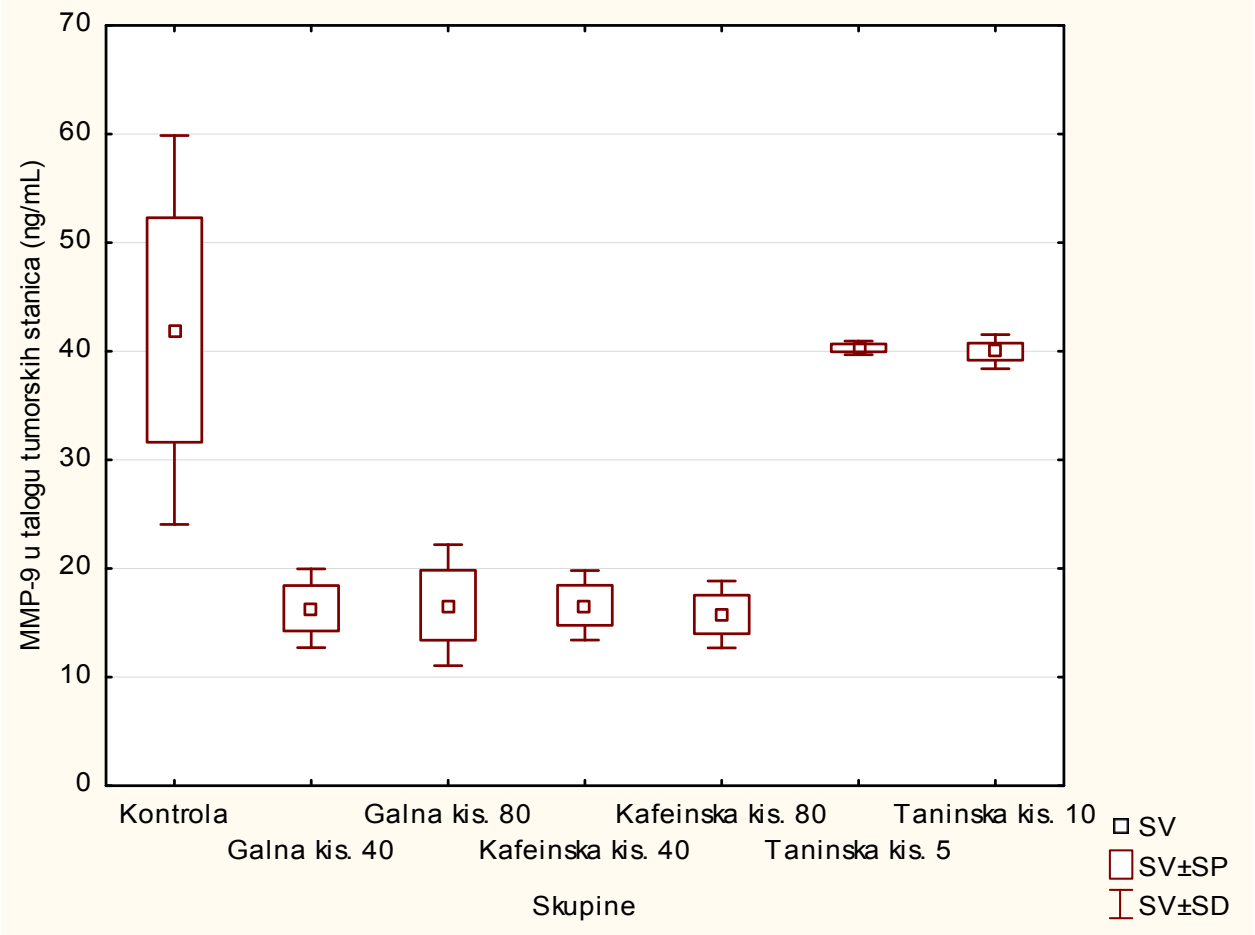
4.6.4.3. Koncentracija MMP-9 u tumorskim stanica

U tumorskim stanicama koje su dobivene nakon 10 uzastopnih dana obrade s fenolnim kiselinama razina koncentracije MMP-9 vidljivo je smanjena kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu, s time da je statistički značajna razlika vidljiva jedino kod CA 40 mg/kg u odnosu na TA 5 mg/kg ($P < 0,05$) (Slika 147). S druge strane, nakon kratkotrajne obrade životinja (4X) nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji MMP-9 (Slika 148), iako je također došlo do smanjenja razine koncentracija MMP-9 kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu.



Slika 147. Koncentracija MMP-9 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 10X svaki dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine između obrađenih skupina: CA 40 mg/kg *vs* TA 5 mg/kg (■$P < 0{,}05$).

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



Slika 148. Koncentracija MMP-9 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih s fenolnim kiselinama 4X svaki drugi dan. Miševi (N=3) nakon unosa EAT stanica ($2{,}5x10^6$) obrađeni su *ip* fenolnim kiselinama u dozama od 40 i/ili 80 mg/kg te 5 i/ili 10 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Rezultati su prikazani kao SV±SP. Nema statističke značajnosti između pojedinih skupina i kontrolne skupine.

Kratice: KONTR. – EAT kontrola; **GA** – galna kiselina; **CA** – kafeinska kiselina; **TA** – taninska kiselina; **SV** – srednja vrijednost; **SP** – standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

§ 5. RASPRAVA

U ovom radu istražen je učinak fenolnih kiselina (galne, kafeinske i taninske kiseline) na modelu angiogeneze u Swiss albino miša izazvanom Ehrlichovim ascitesnim tumorom primjenom dvaju različitih načina obrade životinja, a u svrhu procjene njihove antiangiogene, protutumorske, protumetastatske, protuupalne učinkovitosti kao i sposobnosti smanjenja stvaranja ascitesne tekućine u peritonealnoj šupljini životinja. Također su istraženi učinci fenolnih kiselina na ostale organske sustave kao i na cjelokupni organizam životinja, s ciljem utvrđivanja temeljnih mehanizama djelovanja fenolnih kiselina na rast tumora, oksidacijski stres i polarizaciju makrofaga koji bi se onda mogli primijeniti u daljnjim kliničkim istraživanjima sa znatno manje štetnim nuspojavama za razliku od primjene klasičnih metoda. Antioksidativna, protutumorska, antiangiogena, protuupalna djelotvornost svake pojedine fenolne kiseline praćena je analizom enzima oksidacijskog stresa u bubrezima, jetri, slezeni i ascitesu miševa mjerenjem razine enzimske aktivnosti SOD i CAT, koncentracije ukupnog GSH te razine MDA; zatim analizom hematoloških i biokemijskih parametara iz krvi i seruma, određivanjem pro- i protuupalnih (Th1/Th2/Th17) citokina iz nadtaloga tumorskih stanica; funkcionalne aktivnosti makrofaga; razine NO iz nadtaloga LPS stimuliranih makrofaga slezene i ascitesa, nadtaloga i taloga nestimuliranih makrofaga ascitesa te nadtaloga tumorskih stanica; enzimske aktivnosti Arg-1 u nadtalogu i talogu LPS stimuliranih makrofaga slezene, talogu LPS stimuliranih makrofaga ascitesa, nadtalogu i talogu nestimuliranih makrofaga ascitesa te nadtalogu tumorskih stanica; određivanjem koncentracije proangiogenih čimbenika poput MMP-2 i MMP-9 te VEGF-a u nestimuliranim makrofagima ascitesa, nadtalogu i talogu tumorskih stanica, kao i proupalnog čimbenika COX-2 u stimuliranim i nestimuliranim makrofagima ascitesa i tumorskim stanicama te kvantitativnom mjerenju prožiljenosti peritonealne ovojnice. Utvrđen je i utjecaj navedenih fenolnih kiselina na promjene tjelesne mase u Swiss albino miševa kao i na promjene mase svakog pojedinog unutarnjeg organa kao pokazatelja moguće toksičnosti istraživanih pripravaka na razini cjelokupnog organizma. Također je određen ukupni broj stanica i diferencijalna analiza stanica u peritonealnoj tekućini, ukupni volumen ascitesa u peritonealnoj šupljini, te je praćeno preživljenje životinja nakon obrade. Primjenom komet testa i mikronukleus testa utvrđeno je postojanje genotoksičnih oštećenja molekule DNA.

5.1. MODEL ANGIOGENEZE U SWISS ALBINO MIŠU IZAZVAN EAT-om

Učestalost malignih bolesti kao i njihova smrtnost sve je više u porastu. Pri tome tumori koji dovode do stvaranja peritonealne karcinomatoze popraćene stvaranjem ascitesa uzrokuju posebice brzu smrt. Maligni ascites čini oko 10 % svih slučajeva ascitesa i ukazuje na peritonealnu karcinomatozu odnosno prisutnost patološkog nakupljanja prekomjerne tekućine s malignim stanicama, makromolekulama i proteinima u peritonealnoj šupljini, a obično se javlja u kasnijoj fazi različitih vrsta karcinoma.

U ovom istraživanju koristili smo Ehrlichov ascitesni tumor (EAT), pogodan tumorski model za transplantaciju kako bismo proučavali protutumorske, antiangiogene i protuupalne učinke prirodnih komponenti. Odmah nakon intraperitonealne (*ip*) inokulacije Ehrlichovih tumorskih stanica, došlo je do drastičnog povećanja količine ascitesa i broja stanica (Slike 41-44). Radi se o angiogenetski ovisnom, brzo rastućem karcinomu s vrlo agresivnim ponašanjem, sposobnim rasti u gotovo svim sojevima miševa (Chen i Watkins, 1970; Fecchio i sur., 1990; Luo i sur., 1998; Segura i sur., 2000) na što ukazuju i naši rezultati (Slike 37-38, 43-44, 127-134). Injiciranje Ehrlichova ascitesnog tumora izaziva lokalnu upalnu reakciju (Slike 53-60), s povećanom propusnošću krvožilnog sustava što rezultira intenzivnim stvaranjem edema (Slike 41-42), staničnom migracijom i progresivnim stvaranjem ascitesne tekućine (Fecchio i sur., 1990). Ascitesna tekućina je neophodna za rast tumora, izravni je nutritivni izvor za tumorske stanice i peritonealne makrofage (Tablice 20-21, Slike 45-48) čija se sposobnost širenja povećava 24 sata nakon inokulacije tumora (Fecchio i sur., 1990; Gupta i sur., 2004). Stoga, čini se da je rast Ehrlichova ascitesnog tumora usko povezan s aktivnošću imunosnog sustava, što ga čini zanimljivim modelom za analizu međudjelovanja imunosnog sustava, angiogeneze i razvoja tumora (Fecchio i sur., 1990; Mondal i sur., 2002; Oršolić i sur., 2016; Palermo-Neto i sur., 2003).

5.2. UČINCI FENOLNIH KISELINA NA ANGIOGENEZU U MIŠA NOSITELJA EAT-a

Zbog neučinkovitosti i neselektivnosti primjene klasične terapije u liječenju malignih oboljenja kao i njezine toksičnosti na ostale organske sustave javlja se sve veća potreba za pronalazak novih i učinkovitijih protutumorskih lijekova kao i za novim terapijskim modalitetima. Više od 60 % protutumorskih lijekova dobiveno je izravno ili neizravno iz prirodnih izvora (Gordaliza i sur., 2007). Nedavna istraživanja dala su obećavajuće rezultate o djelovanju prirodnih spojeva u liječenju i prevenciji raka (Shirzad i sur., 2013a; Shirzad i sur., 2013b) zbog svojeg netoksičnog djelovanja s izraženim kemopreventivnim sposobnostima temeljenim na višestrukim mehanizmima koji inhibiraju i/ili usporavaju procese karcinomatoze i proliferaciju tumorskih stanica. Polifenolni spojevi su vrijedna alternativa za sintetičke lijekove, što dokazuje sve veći broj kliničkih ispitivanja vezanih uz upotrebu polifenolnih spojeva u kemoterapiji (Ramos, 2008). Strukturne razlike polifenolnih spojeva odgovorne su za njihov pleotropni način djelovanja, što uključuje i višestruku prevenciju raka (primjerice, supresija angiogeneze, invazije tumorskih stanica i metastaza, kao i indukcija apoptoze) (de Kok i sur., 2008; Zessner i sur., 2008).

5.2.1. Učinci GA na angiogenezu u miša nositelja EAT-a

Galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) je jedna od glavnih prirodnih polifenola koji se nalazi u biljkama kao sekundarni metabolit štiteći ih od biljojeda i biljnih mikroorganizama, a otkriveno je da djeluje antioksidativno, protuupalno, protuvirusno, protubakterijski, protugljivično i protukancerogeno zbog čega se sve više koristi u farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Pokazano je da citotoksično djeluje na određene tumorske stanice i to u različitim fazama razvoja tumora, primjerice smanjuje odgovor ornitin dekarboksilaze koji je vezan za promociju tumora kože, suprimira tumorsku angiogenezu, inhibira stvaranje metastaza u jetri i transkripcijsku aktivnost aktivatora protein 1 (AP-1) bez štetnog učinka na zdrave stanice (He i sur., 2015; 2016; Lu i sur., 2010).

Naši rezultati su u skladu s He i sur. (2015; 2016) gdje je vidljivo da primjena galne kiseline (GA) tijekom 10 dana obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora pokazuje inhibitorno djelovanje na sam rast tumorskih stanica pri čemu je manja doza GA (40 mg/kg) ostvarila statistički značajno smanjenje ukupnog broja stanica ($P < 0,05$) i volumena ascitesne tekućine ($P < 0,01$) u peritonealnoj šupljini u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 41, 43). S druge strane, prilikom obrade miševa svakog drugog dana (4X) bolje rezultate na smanjenje ukupnog broja stanica ($P < 0,001$) i volumena ascitesa ($P < 0,01$) polučila je primjena veće doze GA (80 mg/kg) u odnosu na kontrolu kada je tumor u kasnoj fazi rasta, premda je i kod primjene manje doze GA vidljivo statistički značajno smanjenje broja stanica ($P < 0,05$) i volumena ascitesa ($P < 0,05$) (Slika 42, 44).

U pogledu praćenja preživljenja životinja najbolji učinak ostvarila je primjena GA u dozi od 80 mg/kg tijekom 10 dana obrade životinja (% ILS = 30,27) (Tablica 18), kao i kod obrade životinja svakog drugog dana (% ILS = 18,82) (Tablica 19) u odnosu na kontrolu što nam govori da primjena veće doze GA ima bolji učinak i u ranoj i u kasnoj fazi rasta tumora što se ujedno podudara s rezultatima smanjenja mase tumora kod životinja obrađenih s GA u odnosu na kontrolu (Slike 37-40). Naime, praćenje promjene tjelesne mase miševa tijekom razdoblja obrade životinja dobar je pokazatelj brzine rasta tumora i/ili stvaranja ascitesa u pojedinim skupinama, gdje se rast tumora iskazuje kao postotak promjene tjelesne mase u odnosu na početnu masu miševa u skupini. U kontrolnoj skupini vidljiv je porast u tjelesnoj masi tijekom prvih 10 dana od inokulacije EAT stanica, nakon čega je porast mase tumora nešto usporeniji do 14. dana. U slučaju obrade miševa s GA kod oba načina obrade (10X i 4X) vidljivo je smanjenje tjelesne mase, pri čemu je obrada miševa s GA 80 mg/kg (4X) dovela do najvećeg smanjenja tjelesne mase u odnosu na kontrolu (Slika 38).

Iz diferencijalne analize stanica ascitesne tekućine vidljivo je da je skupina GA 80 mg/kg tijekom 10 dana obrade pokazala bolje rezultate u odnosu na skupinu GA 40 mg/kg budući da dolazi do statistički značajnog povećanja broja makrofaga u ascitesu u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 45) što posljedično vodi smanjenju broja tumorskih stanica u ascitesnoj tekućini, a uzrok tomu je najvjerojatnije aktivacija makrofaga potaknuta primjenom GA te stjecanje sposobnosti uništavanja tumorskih stanica izlučivanjem brojnih reaktivnih metabolita. S druge strane, kod obrade životinja 4X statistički značajno povećanje broja makrofaga ostvarila je skupina GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), što je ujedno

popraćeno sa smanjenjem broja tumorskih stanica u ascitesu (Slika 46). Smanjenju broja tumorskih stanica svakako pridonose i neutrofili u ascitesnoj tekućini; naime primjena GA u dozi od 40 mg/kg tijekom 10 dana dovodi do njihovog povećanja u odnosu na kontrolu, dok kod obrade životinja 4X takav učinak ostvaruje GA 80 mg/kg, iako u oba slučaja ne postoji statistička značajnost (Tablice 20-21).

Rezultati analize mase unutarnjih organa (bubrega, jetre i slezene) pokazuju da skupina GA 80 mg/kg tijekom 10 dana uzrokuje statistički značajno smanjenje mase jetre i slezene u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), premda je to smanjenje vidljivo i kod mjerenja mase bubrega, ali nije statistički značajno (Slika 49). Međutim, kod obrade miševa nakon 5. dana svaki drugi dan skupina GA 40 mg/kg uzrokuje statistički značajno smanjenje mase bubrega u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), premda ista skupina dovodi i do smanjenja mase jetre i slezene koje nije statistički značajno (Slika 50). Navedeni podaci potvrđuju protuupalnu učinkovitost GA na zdrava tkiva i organe što se može pripisati njezinoj antioksidativnoj učinkovitosti. Slični učinci GA na smanjenje mase slezene i jetre pokazani su u BALB/c miševa *ip* iniciranih s leukemijskim stanicama WEHI-3 nakon svakodnevne oralne primjene GA u dozi od 40 i 80 mg/kg tijekom 3 tjedna (Ho i sur., 2009).

Skupine obrađene s GA kod oba načina obrade životinja ne pokazuju statistički značajan utjecaj na hematološke (Tablice 22-25, Slike 47-48) i biokemijske (Tablice 26-29) parametre kod miševa nositelja EAT-a. Međutim, obrada životinja s GA tijekom 10 dana primjenom obje doze dovela je do smanjenja vrijednosti aktivnosti enzima aspartat - aminotransferaze (AST), alanin - aminotransferaze (ALT), laktat - dehidrogenaze (LDH) i amilaze (AMS) u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti što govori o protuupalnom učinku GA i sposobnosti zaštite jetre i drugih tkiva. S druge strane obrada životinja s GA svakog drugog dana polučila je suprotan učinak; odnosno došlo je do statistički neznačajnog ($P > 0,05$) porasta vrijednosti aktivnosti enzima AST, ALT, LDH i AMS u odnosu na kontrolu. Vrijednosti glukoze, ureje i ukupnih bilirubina kod oba načina obrade s GA su nešto više u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Razlog navedenom je prisutnost većeg broja stanica tumora i obrada tumora u eksponencijalnoj fazi rasta.

Protuupalni učinak GA potvrđuje i COX-2 analiza ELISA metodom kod LPS stimuliranih makrofaga ascitesa, ali i kod nestimuliranih makrofaga ascitesa. Naime, u oba slučaja GA i u većoj i u manjoj dozi tijekom 10 dana obrade (Slika 51 i 53) , ali i kod svakog drugog dana obrade životinja dovodi do smanjenja COX-2 razine u navedenim stanicama (Slika 52 i 54). Pri tome, bolji učinak tijekom 10 dana obrade životinja ostvaruje GA u dozi od 40 mg/kg, dok kod obrade životinja svakog drugog dana (4X) bolje rezultate ostvaruje GA 80 mg/kg kada je tumor u uznapredovaloj fazi rasta i sadrži stanice različite osjetljivosti. Isto tako, uočeno je inhibitorno djelovanje GA u većoj i manjoj dozi na razinu COX-2 u tumorskim stanicama kod oba načina obrade životinja (Slika 55 i 56).

Objašnjenje COX-2 inhibicije pokazuje García-Rivera i sur. (2011) koji navode da GA inhibira klasičnu aktivaciju NF-κB pomoću IKKα/β kinaza, što rezultira smanjenom razgradnjom IκB, translokacijom NF-κB i vezanjem na DNA. Osim toga, GA inhibira dodatne NF-κB signalne puteve vezane uz preživljenje tumorskih stanica i terapijsku rezistenciju, kao što su MEK1, JNK1/2, MSK1 i p90RSK što dovodi do snažne inhibicije ciljanih gena NF-κB čimbenika kao što su IL-6, IL-8, COX-2, CXCR4, XIAP, bcl2, VEGF koji su uključeni u procese upale, metastaziranja, anti-apoptoze i angiogeneze (García-Rivera i sur., 2011). GA je sposobna inhibirati aktivnost COX-1 i COX-2 u *in vitro* uvjetima (Madlener i sur., 2007) što je od velike značajnosti budući da se povećanje COX-2 ekspresije povezuje s napredovanjem tumora kroz poticanje diobe stanica, angiogeneze i rasta tumora, te inhibiciju apoptoze (Rizzo, 2011; Tang i sur., 2002). Nadalje, GA u *in vivo* uvjetima značajno inhibira LPS-om induciranu ekspresiju tioredoksina-4B (TXNL4B) u tankom crijevu miševa te ekspresiju TXNL4B, iNOS i COX-2 u *in vitro* uvjetima kod mišjih makrofaga RAW 264.7 (Hsiang i sur., 2013). GA u dozi od 5 mg/kg inhibira LPS-om induciranu upalu u transgeničnim miševima kroz inhibiciju ekspresije čimbenika NF-κB, IL-1β i TNF-α (Hsiang i sur., 2013).

Važan učinak u imunosnom nadzoru rasta tumora i angiogeneze imaju makrofagi. Poznato je da M1 makrofagi imaju imunostimulatorna Th1-orijentirana svojstva te da izlučuju visoke razine klasičnih proupalnih citokina kao što su TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 ili IL-23 te povećavaju koncentracije dušikova(II) oksida (NO), superoksidnog aniona i radikala kisika (Modolell i sur., 1995; Través i sur., 2012). S druge strane, različiti signali kao što su IL-4,

IL-13, glukokortikoidi, IL-10 induciraju različite M2 funkcije koje su sposobne regulirati upalne odgovore i stečenu Th2 imunost, ukloniti oštećenja, potaknuti angiogenezu, remodeliranje i popravak tkiva (Mantovani i sur., 2004). Kvantificirali smo učinak GA na razinu Th1/Th2/Th17 citokina u peritonealnoj tekućini miševa nositelja EAT-a. Uočeno je povećanje razina proupalnih citokina IL-2, IL-6, IL-12, IFN-γ i TNF-α prilikom obrade miševa s GA u većoj i manjoj dozi tijekom 10 dana (Slika 57), dok je prilikom obrade miševa svakog drugog dana (4X) vidljivo povećanje razina IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 i IFN-γ u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 58). Istovremeno, razine protuupalnih Th2 citokina, IL-4 i IL-5 u miševa obrađenih s GA tijekom 10 dana te IL-4, IL-10 i IL-13 u miševa obrađenih s GA svakog drugog dana su smanjene (Slike 57-58).

Nadalje, istražili smo funkcionalnu aktivnost makrofaga kao i njihovu ulogu u stvaranju aktivnih molekula poput molekule NO koja ima citotoksični učinak na stanice tumora, i Arg-1 koja stimulirajuće djeluje na rast tumora. Obrada životinja s GA doprinosi povećanju funkcionalne aktivnosti makrofaga u miševa nositelja EAT u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 96 i 98); aktivirani makrofagi s GA pokazuju pojačanu citotoksičnost za stanice tumora, bolju sposobnost fagocitiranja oštećenih i raspadnutih stanica, bolju pokretljivost, prianjanje za podlogu kao i enzimsku aktivnost (Oršolić, 2010) za razliku od normalnih makrofaga. Ho i sur. (2009) uočili su da GA u dozi od 40 i 80 mg/kg potiče fagocitnu aktivnost makrofaga iz periferne krvi BALB/c miševa *ip* iniciranih s leukemijskim stanicama WEHI-3, dok doza GA od 80 mg/kg vodi smanjenju sposobnosti fagocitoze makrofaga u izoliranim peritonealnim stanicama.

Mehanizam citotoksičnog djelovanja makrofaga na stanice tumora temelji se na indukciji programirane stanične smrti (apoptoze) u tumorskim stanicama (Slika 45) što se može pripisati povećanoj razini NO čija aktivnost može biti ključna za tumorocidnu aktivnost stanica imunosnog sustava, posebice makrofaga M1 čija je osnovna značajka povećanje sinteze NO aktivacijom iNOS-a. Povećana razina NO u nadtalogu makrofaga ascitesa (Slike 104-105), kao i u nadtalogu LPS stimuliranih makrofaga ascitesa (Slike 102-103), posebice statistički značajno povećanje razine NO u skupini obrađenoj s GA 80 mg/kg (4X) ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu stimuliranih makrofaga potvrđuje da GA povećava M1 tumorocidnu djelotvornost TAMs te blokira M2 tumorsku aktivnost TAMs.

Smanjenu polarizaciju M1 makrofaga u M2 makrofage potvrđuju i rezultati analize Arg-1 u nadtalogu LPS makrofaga slezene (Slike 110-111) kao i u samim LPS makrofagima slezene (Slike 112-113) i ascitesa (Slike 114-115), gdje je vidljivo smanjenje razine Arg-1 u svim skupinama obrađenim s GA u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajno smanjenje razine Arg-1 u odnosu na kontrolu pokazuje obrada životinja s GA u dozi od 40 mg/kg (4X) u nadtalogu tumorskih stanica ($P < 0{,}01$) (Slika 120).

Temeljem navedenog možemo zaključiti da GA može aktivirati makrofage i povećati njihov citotoksični učinak kroz povećanje proizvodnje NO, a smanjenje razine Arg-1 čime se istodobno sprječava polarizacija makrofaga, rast tumora, stvaranje i nakupljanje ascitesne tekućine u peritonealnoj šupljini kao i sam proces angiogeneze i metastaziranja tumorskih stanica.

Poznato je da alternativni metabolički put L-arginina kataliziran Arg-1 daje još jednu osobitost razlikovanja između dva aktivacijska stanja makrofaga. Naime, M1 makrofagi povećavaju regulaciju iNOS enzima koji katalizira L-arginin u NO i citrulin, dok M2 makrofagi pokazuju visoku ekspresiju Arg-1, citosolnog enzima koji katalizira alternativni metabolički put L-arginina u ornitin i poliamine, koji su prekursori u sintezi kolagena i stanične proliferacije (Rodríguez i Ochoa, 2008). Također, treba istaknuti da dušikov(II) oksid (NO) je pleotropni regulator i uključen je u brojne biološke procese, posebice u fazi inicijacije i progresije tumora, vazodilatacije, angiogeneze i metastaziranja. Osim toga, NO je ključan i za tumorocidnu aktivnost imunosnog sustava.

Stoga, određivanje aktivnosti NO i Arg-1 u makrofagima slezene i peritoneuma može biti važan čimbenik za polarizaciju makrofaga. Nadalje, zapaženo je da obrada miševa s GA vodi smanjenju razine NO u nadtalogu LPS stimuliranih makrofaga slezene (Slike 100-101), što može imati pozitivne učinke budući da dovodi do izostanka vazodilatacije u krvnim žilama čime se ujedno smanjuje dostava kisika i nutrijenata potrebnih za rast tumorskih stanica. Međutim, paradoks leži u tome što NO i RNS mogu imati genotoksična i angiogena svojstva; niska razina NO ima stimulirajući učinak na rast tumora dok visoka ima citostatski i citotoksični učinak na stanice tumora (Xu i sur., 2002). Naši rezultati ekspresije iNOS protein u tumorskim stanicama (Slika 126) su u skladu s navodima Xu i sur. (2002); naime GA dovodi do smanjenja iNOS ekspresije u tumorskim stanicama primjenom manje doze GA, dok veća doza GA bez obzira na način obrade životinja dovodi do povećanja iNOS ekspresije.

Osim uloge GA na imunosni sustav i njezine uloge u nadzoru angiogeneze i rasta tumora, GA ima izraziti antioksidativni učinak koji može biti važan u sprječavanju genetske nestabilnosti, inhibiciji polarizacije M2 makrofaga te posljedično, inhibiciji angiogeneze i rasta tumora (Oršolić i sur., 2016). Prema Liu i sur. (2006) GA može biti odgovorna za smanjenje angiogeneze u *in vitro* i *in viv*o uvjetima, ali može pridonijeti i apoptozi i genotoksičnosti stanica tumora svojim prooksidativnim svojstvima (Sun i sur., 2007).

Analizom oksido-redukcijskog statusa vidljivo je da GA nije imala utjecaja na količinu glutationa (GSH) u stanicama ascitesa, iako je kod obrade miševa tijekom 10 dana vidljivo povećanje (Slika 63), a kod obrade miševa svakog drugog dana smanjenje GSH u odnosu na kontrolu koje nije statistički značajno (Slika 64). U bubregu, jetri i slezeni nisu uočene statistički značajne promjene razine GSH u odnosu na kontrolu kod oba načina obrade životinja, iako je kod bubrega i slezene vidljivo smanjenje razine GSH, dok kod jetre u načelu prevladava porast razine GSH u odnosu na kontrolu. Analiza CAT aktivnosti u ascitesu je povećana, pri čemu je statistički značajno povećanje vidljivo samo kod skupine GA 40 mg/kg (4X) u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 72). Također, kod iste skupine u slezeni uočeno je statistički značajno povećanje CAT aktivnosti u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 78), dok ostali organi ne pokazuju značajne promjene CAT aktivnosti u odnosu na kontrolnu skupinu. SOD enzimska aktivnost u ascitesu je povećana u svim obrađenim skupinama s GA bez obzira na način obrade životinja, ali statistički značajno povećanje pokazuje samo GA 80 mg/kg (10X) u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 79). Kod bubrega u svim obrađenim skupinama s GA vidljivo je smanjenje aktivnosti SOD u usporedbi s kontrolom, iako nije statistički značajno, dok s druge strane slezena i jetra pokazuju povećanje SOD aktivnosti, pri čemu je u jetri kod skupine GA 40 mg/kg (10X) došlo do značajnog povećanja SOD aktivnosti u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 83). MDA razina u stanicama ascitesa je povećana u GA obrađenim miševima tijekom 10 dana primjenom obiju doza (Slika 87), dok je tijekom obrade miševa svakog drugog dana (4X) uočen suprotan učinak (Slika 88). Objašnjenje navedenog može biti prisutnost populacije stanica različite osjetljivosti s obzirom da je tumor u eksponencijalnoj fazi rasta. Moguće je da prooksidativni učinak u stanicama tumora pridonosi pojačanoj citotoksičnosti i apoptozi osjetljivih stanica EAT (Slika 45). Razina lipidne peroksidacije kod svih skupina obrađenih s GA u stanicama bubrega, jetre i slezene u odnosu na kontrolu je bez statističke značajnosti (Slike 89-94).

Da povećana razina oksidacijskog stresa u tumorskim stanicama može biti uzročnik smrti stanica kroz pokretanje apoptoze potvrđuje i Locatelli i sur. (2009). Ovi autori navode da galati (derivati estera GA) induciraju smrt tumorskih stanica melanoma (B16F10) pomoću apoptoze kao posljedica oksidacijskog stresa što je vidljivo iz fragmentacije genomske DNA, značajne proizvodnje slobodnih radikala, smanjenja razine glutationa i ATP-a, aktivacije čimbenika NF-κB i inhibicije adhezije stanica. Ova otkrića su važna budući da su stanice melanoma rezistentne na smrt zbog visoke razine antioksidativne obrane, sposobnosti adhezije i sklonosti stvaranja metastaza.

Također, You i Park (2010) te You i sur. (2010) navode da GA inducira apoptozu i/ili nekrozu u HeLa, HUVEC stanicama te stanicama raka pluća (Calu-6 i A549) što je popraćeno gubitkom potencijala mitohondrijske membrane te povećanjem razine ROS-a i trošenjem GSH u HeLA stanicama i stanicama raka pluća. Osim toga, pokazalo se je da GA selektivno inducira apoptozu u tumorskim stanicama gušterače bez utjecaja na preživljenje normalnih stanica u *in vitro* uvjetima (Liu i sur., 2012) što je u skladu s našim rezultatima.

Poznato je da su procesi angiogeneze i metastaziranja popraćeni s raznim fiziološkim promjenama koje su vezane uz razaranje izvanstaničnog matriksa, kao što je prekomjerna ekspresija aktivnosti proteolitičkih enzima, uključujući matriks metaloproteinaza (npr. MMP-2 i MMP-9), te migracija i invazija tumorskih stanica u krvotok ili limfni sustav radi širenja u okolna tkiva i organe (Kleiner i Stetler-Stevenson, 1999). Iz tog razloga radi utvrđivanja opsega krvožilja u peritonealnoj šupljini mikroskopski je analizirana peritonealna ovojnica kako u EAT kontroli tako i u obrađenim skupinama s GA, pri čemu rezultati jasno pokazuju inhibiciju neovaskularizacije u svim skupina obrađenim s GA u usporedbi s peritoneumom EAT kontrole bez obzira na način obrade životinja, ali bez statističke značajnosti (Slike 125-126). Nadalje, hemalaun-eozinom (H&E) obojani dijelovi peritoneuma pokazuju da postoji smanjenje gustoće prožiljenosti (MVD) (Slike 129-130) kod životinja obrađenih s GA. Budući da GA inhibira izlučivanje ascitesa *in vivo*, istražili smo učinak GA na razinu VEGF čimbenika u nadtalogu i talogu tumorskih stanica te u nestimuliranim makrofagima ascitesa. GA je pokazala doza ovisno smanjenje sekrecije VEGF-a u tumorskim stanicama u odnosu na kontrolnu skupinu u *in vivo* uvjetima (Slike 135-136), ali bez statističke značajnosti. Također, isti učinak smanjenja razine VEGF-a uočen je i u nadtalogu tumorskih stanica (Slike 133-134), ali i kod nestimuliranih makrofaga ascitesa (Slike 131-132). Životinje obrađene s GA u dozi od 40 mg/kg (10X) smanjile su VEGF sekreciju u

stanicama makrofaga ascitesa za 59,50 %, odnosno u dozi od 80 mg/kg (10X) za 57,87 % u odnosu na kontrolu, dok je kod obrade životinja svakog drugog dana rezultat bio nešto manji, točnije 32,76 % za GA 40 mg/kg (4X) odnosno 25,18 % za GA 80 mg/kg (4X). GA obrada smanjila je razinu VEGF-a u izoliranim tumorskim stanicama od ukupnog broja stanica iz peritonealne šupljine za 25,09 % tijekom primjene manje doze GA odnosno za 37,27 % kod primjene veće doze GA tijekom 10 dana obrade, dok je prilikom 4X obrade životinja došlo do redukcije razine VEGF-a za 40,05 % u manjoj dozi GA odnosno za 52,93 % u većoj dozi GA u usporedbi s kontrolnim stanicama. Nadalje, postotak smanjenja VEGF-a u nadtalogu tumorskih stanica tijekom 10 dana obrade životinja s GA iznosi 22,02 % za GA 40 mg/kg (10X) i 16,22 % za GA 80 mg/kg (10X), odnosno kod obrade životinja svakog drugog dana (4X) 15,65 % i 13,79 % u odnosu na EAT kontrolu.

Čini se da brojni biljni pripravci sadrže sastavnice koje mogu biti učinkovite u kontroli rasta tumora i inhibiciji angiogeneze uključujući kurkumu i sladić. Primjerice, Sheela i sur. (2006) navode da vodeni pripravak korijena sladića (lat. *Glycyrrhiza glabra*) inhibira proliferaciju EAT stanica u *in vivo* i *in vitro* uvjetima kao i angiogenezu u *in vivo* uvjetima što je vidljivo u smanjenju razine VEGF-a i mikrožilne gustoće u peritoneumu miša nakon obrade s navedenim biljnim pripravkom. Nadalje, etanolni pripravak osušenog gomolja divlje kurkume (lat. *Curcuma aromatica*) inducira proapoptotičku aktivnost te inhibira rast EAT stanica, a inhibicijom VEGF-a posljedično inhibira stvaranje ascitesa u peritoneumu miša nositelja EAT-a (Thippeswamy i Salimath, 2006).

Literaturni podaci govore da su MMPs uključene u sve faze karcinogeneze, osobito kod invazije i migracije tumorskih stanica, angiogeneze i metastaziranja stanica (McCawley i Matrisian, 2000; Somerville i sur., 2003). Iz tog razloga, MMPs smatraju se važnim molekularnim ciljevima u protutumorskoj terapiji (Fingleton, 2007). Istraživanja su pokazala snažan antiangiogeni potencijal polifenola koji rezultira inhibicijom ekspresije i sekrecije MMPs, kao i izravne inhibicije aktivnosti MMPs (Cheng i sur., 2003; Katiyar, 2006). Ovi enzimi, posebice MMP-9 (kolagenaza tipa IV) igraju važnu ulogu u napredovanju karcinoma (Egeblad i Werb, 2002) budući da razgrađuju kolagen tipa IV, glavni sastojak stanične membrane te predstavljaju lošu prognozu kod bolesnika.

Naši rezultati analize MMP-2 i MMP-9 pokazuju da GA inhibira sekreciju MMP-2 i MMP-9 u nestimuliranim makrofagima ascitesa te nadtalogu i talogu tumorskih stanica, pri čemu je statistički značajno smanjenje MMP-2 u odnosu na kontrolu uočeno kod obrade miševa s GA 40 mg/kg (4X) u talogu tumorskih stanica ($P < 0,05$) (Slika 142), zatim značajno smanjenje MMP-9 kod GA 80 mg/kg (4X) u nestimuliranim makrofagima ascitesa ($P < 0,05$) (Slika 144) i kod GA 80 mg/kg (10X i 4X) u nadtalogu tumorskih stanica ($P < 0,05$) (Slike 145-146) u odnosu na kontrolu. Prema učinkovitosti, najveći postotak inhibicije sekrecije MMP-2 ostvaren je kod primjene GA 40 mg/kg (4X) u nestimuliranim makrofagima (68,42 %); zatim kod primjene GA 80 mg/kg (10X) u nadtalogu tumorskih stanica (67,34 %) te kod primjene GA 40 mg/kg (4X) u talogu tumorskih stanica (47,66 %). S druge strane, najveći postotak inhibicije sekrecije MMP-9 vidljiv je kod primjene GA 80 mg/kg (4X) u makrofazima ascitesa gdje iznosi čak 99,01 % te u nadtalogu tumorskih stanica sa 66,88 %, dok je u samom talogu tumorskih stanica najveći postotak inhibicije sekrecije MMP-9 ostvaren kod skupine GA 80 mg/kg (10X) za 66,84 %.

Dobivene rezultate protutumorske učinkovitosti GA možemo usporediti s rezultatima Agrawal i sur. (2011) i Saraswati i sur. (2013) koji su upotrijebili isti tumorski model. Agrawal i sur. (2011) navode da *ip* primjena tamjanske kiseline u dozi od 6,5 mg/kg, 12,5 mg/kg i 25 mg/kg tijekom 14 dana ili u dozi od 25 mg/kg tijekom 30 dana značajno inhibira ascitesni i solidni model Ehrlichova tumora u Swiss albino miševa; tamjanska kiselina smanjuje volumen ascitesa, volumen solidnog tumora kao i tjelesnu masu u odnosu na kontrolnu skupinu EAT miševa te vodi povećanom preživljenju miševa (% ILS=139,77) nositelja EAT tumora (Agrawal i sur., 2011). Također, rezultati Saraswati i sur. (2013) pokazuju da *ip* primjena urosolične kiseline (UA) u dozi od 25 mg/kg, 50 mg/kg i 100 mg/kg tijekom 14 dana kod EAT ascitesnog tumora značajno dovodi do smanjenja tjelesne mase u odnosu na EAT kontrolu, posebice primjena UA u dozi od 100 mg/kg kod solidnog EAT tumora u *in vivo* uvjetima značajno smanjuje volumen i masu tumora u odnosu na kontrolu i vodi povećanju životnog vijeka miševa. UA slično GA pokazuje antiangiogeni učinak kod EAT ascitesnog i solidnog tumora *in vivo*; smanjuje razinu VEGF-a, iNOS ekspresije, razinu NO i čimbenika TNF-α te povećava razinu IL-12 i ekspresiju bax i kaspaze-3 (Saraswati i sur., 2013). Antiangiogeni učinak GA potvrđuju brojni autori u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Lee i sur., 2013; Lu i sur., 2010; Zhao i Hu, 2013).

Ho i sur. (2010) navode da GA ima snažni inhibitorni učinak na migraciju metastaza adenokarcinoma želudca kroz inhibiciju ekspresije MMP-2 i MMP-9 u navedenim stanicama primjenom 2,0 μM GA tijekom 48 sati u *in vitro* uvjetima. Ovom učinku doprinosi inhibicija proteina poput Ras, Cdc42, Rac1, RhoA, RhoB, PI3K i p38MAPK koji su uključeni u proces metastaziranja i signalni put reorganizacije citoskeleta (aktina). Lo i sur. (2011) ustvrdili su da GA inhibira migraciju i invaziju humanih stanica melanoma (A375.S2) u *in vitro* uvjetima kroz inhibiciju MMP-2.

Nadalje, utvrđeno je da topikalna primjena GA u dozi od 25 mg/kg inhibira rak kože u miševa kroz povećanje razine enzimskih (GST, SOD, CAT i GPx) i neenzimskih antioksidansa (GSH) kao i smanjenja razine lipidne peroksidacije te ekspresije i aktivnosti MMP-2 i MMP-9 (Subramanian i sur., 2014). Belotti i sur. (2003) uočili su da se razine MMP-9 (pro- i aktiviranog oblika) i proMMP-2 u ascitesu podudaraju s VEGF-om i volumenom ascitesa kod golih miševa nositelja ksenografta humanog karcinoma jajnika na što ukazuju i naši rezultati (Slike 133-150). Osim toga, isti autori navode da MMPs, i to uglavnom MMP-9, a u manjoj mjeri MMP-2 potiču oslobađanje biološki aktivnog VEGF-a u stanicama karcinoma jajnika i posljedičnog stvaranja ascitesa.

Naši rezultati u skladu su i s istraživanjem Raina i sur. (2008) koji su pokazali da oralna primjena 0,3 % i 1 % vodene otopine GA tijekom 20 tjedana inhibira rast i progresiju raka prostate kod transgeničnih miševa s adenokarcinomom prostate kroz snažno suzbijanje progresije staničnog ciklusa i proliferacije te povećanja apoptoze. Chen i sur. (2009) pokazuju da GA inhibira rast DU145 stanica raka prostate u G2/M fazi, vodi smanjenju stanične jezgre te pojavnosti apoptotičkih vakuola ovisno o primjeni doze i vremenu u *in vitro* uvjetima. Nadalje, Kaur i sur. (2009) navode da GA u *in vitro* uvjetima smanjuje vijabilnost stanica ovisno o dozi kod humanih androgen-neovisnih DU145 i androgen-ovisnih 22Rv1 tumorskih stanica prostate uglavnom putem indukcije apoptoze. Isti autori pokazuju da GA inhibira rast DU145 i 22Rv1 stanica u ksenograft modelu kod golih miševa gdje imunohistokemijska analiza pokazuje značajnu inhibiciju proliferacije tumorskih stanica, indukciju apoptoze kao i smanjenje gustoće krvnih žila u ksenograft modelu miševa nakon unosa 0,3 % i 1 % vodene otopine GA. Na humanim stanicama osteosarkoma u *in vitro* i *in vivo* uvjetima utvrđeno je da GA inducira apoptozu kroz regulaciju MAPK signalnih puteva (Liang i sur., 2012).

Da Silva i sur. (2009) utvrdili su da derivati GA (izobutil galat-3,5-dimetil eter i metil galat-3,5-dimetil eter) koji su dobiveni izolacijom iz lišća biljke *Casearia sylvestris* povećavaju preživljenje BALB/c miševa s inokuliranim EAT stanicama te ujedno dovode do smanjenja volumena Lewisovog tumora pluća (LLC1, engl. *Lewis lung cancer cells*) kod C57bl/6 miševa u odnosu na kontrolu. Isti autori ukazuju i na povećanu citotoksičnost NK stanica protiv EAT stanica, za razliku od kontrolnih miševa gdje tumorski rast značajno suprimira citolizu NK stanica (Da Silva i sur., 2009). Prema navedenim literaturnim podacima vidljivo je da naši rezultati u potpunosti potvrđuju mogućnost primjene GA kao imunostimulatora, inhibitora angiogeneze i rasta tumora.

5.2.2. Učinci CA na angiogenezu u miša nositelja EAT-a

Kafeinska kiselina je biološki aktivna sastavnica propolisa koja pokazuje antioksidativna, protuproliferativna, antiangiogena, protutumorska, protuupalna i citostatska svojstva. Poznato je da su flavonoidi koji su nazočni u propolisu (35-50 %) prirodni široko rasprostranjeni polifenolni spojevi u biljnom carstvu, koji pokazuju razne biološke aktivnosti, uključujući i inhibiciju rasta tumora. Kafeinska kiselina (CA) pokazala je inhibicijski učinak na rast EAT stanica koji je vidljiv i kod skupina koje su obrađene s manjom i većom dozom CA kod oba načina obrade životinja. Pri tome najznačajnije rezultate dala je skupina obrađena s CA 80 mg/kg tijekom 10 dana obrade (Slike 41, 43) iz koje je vidljivo najveće smanjenje ukupnog broja stanica i volumena ascitesa u odnosu na kontrolu (P < 0,001). Međutim, tijekom praćenja perioda preživljenja ova skupina nije dala najbolji učinak u preživljenju (% ILS = 12,32) u odnosu na kontrolu (Slika 39, Tablica 18); najbolji učinak na preživljenje ostvarila je skupina obrađena CA u dozi od 80 mg/kg s početkom obrade od 5. dana svaki drugi dan (4X) (% ILS = 52,93) (Slika 40, Tablica 19), a što se ujedno podudara s najmanjim povećanjem mase tumora, točnije inhibicijom ukupnog broja stanica u trbušnoj šupljini tijekom obrade životinja (Slika 38). Temeljem navedenog, bolji protutumorski učinak na EAT tumor ima primjena CA u ranoj fazi rasta tumora, ali njezina dugotrajna primjena tijekom 10 dana nije dovoljna za zaustavljanje proliferacije EAT stanica u peritonealnoj šupljini, što se može povezati sa svojstvima brzorastućeg zloćudnog EAT tumora koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti. Rezultati određivanja ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini ukazuju da je srednja vrijednost broja stanica kod obrađenih CA skupina statistički

značajno manja kod oba načina obrade životinja ($P < 0,001$ kod obrade 10X te $P < 0,01$ i $P < 0,05$ kod obrade 4X) u odnosu na kontrolu (Slike 43-44).

Navedeni podaci potvrđuju da CA uzrokuje izravne citotoksične učinke na tumorske stanice kroz indukciju apoptoze (Slika 95) i nekroze (Oršolić i sur., 2003) izazvanu povećanjem razine ROS-a i lipidne peroksidacije u tumorskim stanicama nakon obrade s CA (Slika 89).

Diferencijalna analiza stanica u ascitesnoj tekućini pokazuje povećanje broja makrofaga kod svih skupina obrađenih s CA u odnosu na kontrolu bez obzira na način obrade miševa (Tablice 20-21) kao odrazom sposobnosti CA da aktivira makrofage i inducira apoptozu (Slike 45-46) što u svom radu potvrđuju i Orban i sur. (2000), iako to povećanje nije statistički značajno. Također, gotovo kod svih skupina obrađenih s CA vidljivo je da dolazi do smanjenja broja tumorskih stanica u ascitesu (Tablice 20-21). Kod skupine CA 80 mg/kg obrađene 4X vidljivo je neznatno povećanje broja neutrofila u odnosu na kontrolu, koje također nije statistički značajno. Iz rezultata mjerenja težine unutarnjih organa (bubrega, jetre i slezene) proizlazi da manja doza CA od 40 mg/kg kod oba načina obrade životinja izaziva veće smanjenje težine unutarnjih organa (bubrega, jetre i slezene) u odnosu na kontrolu premda je samo kod skupine CA 80 mg/kg tijekom 10 dana obrade vidljivo statistički značajno smanjenje težine bubrega u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), dok kod ostalih skupina ne postoje statističke značajne razlike (Slike 49-50), ali je vidljiv značaj CA kao snažne antioksidativne i protuupalne sastavnice.

Osim reduciranog broja stanica i smanjenja volumena ascitesa u peritonealnoj šupljini, protutumorski i antiangiogeni učinak CA potvrđen je smanjenjem broja novonastalih krvnih žila u potrbušnici miša, pri čemu je kod CA 80 mg/kg ($P < 0,05$) tijekom 10 dana obrade (Slika 125, 129) te CA 40 mg/kg ($P < 0,05$) tijekom 4X obrade životinja uočeno statistički značajno smanjenje peritonealne angiogeneze u odnosu na kontrolu (Slika 126 i 130). Navedeni rezultati smanjenja peritonealne angiogeneze odnosno mikrožilne gustoće (MVD) pokazuju da CA posjeduje snažan antiangiogeni potencijal u *in vivo* uvjetima te da bi dugotrajnija obrada s CA mogla polučiti bolji protutumorski i antiangiogeni učinak. MVD jest zlatni morfološki standard za procjenu neovaskularizacije tumora jer MVD broj odražava antiangiogena svojstva tumora i predstavnik je prosječne interkapilarne udaljenosti kao važnog parametra angiogene terapije; smanjenje interkapilarne udaljenosti može biti ograničavajući čimbenik u brzini rasta tumora (Rak i sur., 1995).

Skupine obrađene s CA kod oba načina obrade životinja ne pokazuju statistički značajan utjecaj na hematološke (Tablice 22-25, Slike 47-48) i biokemijske (Tablice 26-29) parametre kod miša nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora u odnosu na kontrolu. Međutim, praćenjem vrijednosti aktivnosti enzima aspartat - aminotransferaze (AST), alanin - aminotransferaze (ALT), laktat - dehidrogenaze (LDH) i amilaze (AMS) kod miševa koji su obrađeni tijekom 10 dana s CA zapažaju se u pravilu niže vrijednosti u odnosu na kontrolu (Tablica 26), dok je kod obrade miševa svakog drugog dana uočeno povećanje vrijednosti ALT i AMS kod skupina CA 40 mg/kg i 80 mg/kg kao i neznatno povećanje AST kod CA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu (Tablica 27), što se može povezati s izraženijom upalnom reakcijom i njenim posljedicama budući da se tumor nalazi u uznapredovaloj fazi rasta. Vrijednosti C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu, kod obrađenih skupina s CA su niže ili jednake vrijednosti kao i u kontrolnoj skupini (Tablice 28-29) na temelju čega se može zaključiti da CA pozitivno utječe u inhibiranju upalne reakcije uzrokovane kancerogenezom. Drugi važan čimbenik koji se vezuje uz upalne procese je enzim COX-2 koji katalizira sintezu prostaglandina (PGG_2) iz arahidonske kiseline. Na temelju dobivenih rezultata ELISA analize vidljivo je da CA u svim dozama kod oba načina primjene dovodi do smanjenja koncentracije COX-2 u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa, pri čemu je primjena CA svakog drugog dana (4X) ostvarila nešto bolje rezultate (Slika 52) u odnosu na 10X obradu miševa (Slika 51). Također, kod skupine CA 80 mg/kg (4X) u LPS stimuliranim makrofagima ascitesa uočeno je statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolu ($P < 0{,}01$) što nam ujedno govori da veća doza CA u kasnoj fazi rasta tumora učinkovito smanjuje simptome upale. Rezultati COX-2 analize dobiveni ELISA testom u nestimuliranim makrofagima ascitesa, također pokazuju smanjenje COX-2 koncentracije u odnosu na kontrolu bez statističke značajnosti kod oba načina obrade životinja (Slike 53-54), ali s nešto slabijim uspjehom u odnosu na same LPS stimulirane makrofage ascitesa.

Nadalje, COX-2 koncentracija kod tumorskih stanica je smanjenja u odnosu na kontrolu; veća doza CA kod oba načina obrade životinja ima veći inhibitorni učinak na stvaranje COX-2, ali bez statističke značajnosti (Slike 55-56). Također, obrada miševa s CA svakog drugog dana s većom i manjom dozom kada je tumor u eksponencijalnoj fazi rasta ima veći učinak na smanjenje COX-2 koncentracije u odnosu na obradu životinja tijekom 10 dana. Inhibicija COX-2 aktivnosti je u skladu s inhibicijom angiogeneze (Slike 125-126), što je u skladu s

podacima (Ono, 2008) gdje se inhibicija COX-2, NF-κB i TAMs smatra ključnim ciljem za inhibiciju angiogeneze i rasta tumora (Oršolić i sur., 2016).

Prema Ono (2008), TAMs predstavljaju primamljivi pristup u novim terapijskim strategijama. Tri su glavna razloga zbog kojih su TAMs potencijalno pogodni za terapijske intervencije: a) inhibicija njihovog novačenja i/ili njihovog preživljenja u samom tumoru; b) inhibicija njihovih pozitivnih učinaka na angiogenezu i remodeliranje tkiva; c) preokret njihove imunosne supresije i uspostavljanje protutumorske citotoksičnosti (Oršolić i sur., 2016). Naši rezultati također ukazuju da CA posjeduje sposobnost aktivacije makrofaga koji stvaraju čimbenike potrebne za reguliranje funkcija limfocita T i drugih imunosnih stanica (Oršolić i Bašić, 2005; Oršolić i sur., 2003; 2004). Makrofagi su jedni od glavnih, široko rasprostranjenih, urođenih imunosnih stanica koje imaju važnu ulogu u primarnom odgovoru na patogene, tumorske stanice, upale, jačanju imunosnog odgovora te održavanju homeostaze tkiva (Oršolić i Bašić, 2005; Oršolić i sur., 2003; 2004). Štoviše, brojni podaci ukazuju na to da makrofagi imaju ključnu ulogu ne samo u ubijanju tumorskih stanica, nego također i u rastu samog tumora.

CA također inhibira stvaranje M2 makrofaga TAMs, inhibira njihov pozitivan učinak na angiogenezu i remodeliranje tkiva što dovodi do preokreta njihove imunosne supresije i uspostavljanja protutumorske citotoksičnosti. Čini se da imunomodulatorna aktivnost CA kao i njezin učinak na povećanje M1 tumorocidne učinkovitosti TAMs i blokiranje M2 tumorske aktivnosti TAMs predstavljaju ključne mehanizme u inhibiciji angiogeneze i rasta tumora.

Blokiranje M2 aktivnosti TAMs potvrđuje smanjena aktivnost Arg-1 dobivena spektrofotometrijskom analizom u LPS stimuliranim (Slike 114-115) i nestimuliranim makrofagima (Slike 118-119) peritonealne šupljine kod oba načina obrade životinja s CA te nepromijenjene ili neznatno niže razine NO u nadtalogu LPS stimuliranih makrofaga ascitesa (Slike 102-103) i nestimuliranih makrofaga ascitesa (Slike 106-107) dobivene primjenom Griessovog reagensa.

Također, rezultati analize aktivnosti Arg-1 i u nadtalogu tumorskih stanica pokazuju smanjenje njezine aktivnosti u odnosu na kontrolu (Slike 120-121) što je ujedno potvrđeno i Western blot analizom u tumorskim stanicama (Slika 123) pri čemu je statistički značajno smanjenje aktivnosti Arg-1 uočeno kod skupine CA 80 mg/kg (10X) ($P < 0,05$) (Slika 120), dok je razina NO gotovo kod svih skupina obrađenih s CA smanjena u odnosu na kontrolnu

skupinu, ali bez statističke značajnosti što u načelu potvrđuju i rezultati analize iNOS ekspresije Western blotom u tumorskim stanicama (Slika 124). Prema Migliori i sur. (2015) CA u jako niskim dozama može imati zaštitni učinak na funkciju endotelnih stanica kroz modulaciju oslobađanja NO neovisno o ekspresiji i fosforilaciji eNOS te tako ograničiti napredovanje bolesti povezane s oštećenjem endotela uzrokovane oksidacijskim stresom.

Poznato je da povećana aktivnost Arg-1 može potaknuti rast tumora putem nekoliko mehanizama uključujući smanjenje regulacije NO-posredovane tumorske citotoksičnosti (Chang i sur., 2001), povećanje stanične proliferacije kroz sudjelovanje u sintezi poliamina i prolina, disregulacije signalizacije T staničnog receptora (TCR) i indukcije neaktivnosti $CD8^+$ limfocita T (Bak i sur., 2008) te povećanja sposobnosti mijeloidnih supresorskih stanica da inhibiraju proliferaciju limfocita T (Rodríguez i Ochoa, 2008). Naši rezultati ukazuju da CA smanjuje imunosupresivnu aktivnost Arg-l u LPS makrofagima slezene te stimuliranim i nestimuliranim makrofagima peritonealne šupljine. Također, naši rezultati kao i oni drugih autora (Su i sur., 2015; Zhai i sur., 2007) sugeriraju da se imunostimulirajuća i protutumorska aktivnost CA može povezati s aktivacijom makrofaga i povećanjem njihove sposobnosti fagocitoze. Štoviše, povećanje aktivnosti makrofaga pomoću CA može biti odgovorno za usporavanje rasta stanica tumora. Točnije, u miševa nositelja stanica EAT obrađenih s CA vidljivo je povećanje indeksa širenja makrofaga te povećanje citotoksičnosti na EAT stanice kroz indukciju apoptoze u EAT stanicama (Slika 95). Najveću sposobnost indeksa širenja makrofaga postigla je skupina obrađena s CA u dozi od 80 mg/kg (4X) (Slika 97 i 99).

Prema autorima Prada i sur., (2013) te Wang i sur. (2011) M1 makrofagi TAMs mogu pojačati stečene imunosne odgovore, posebice $CD4^+$ Th1 stanica, koje zatim pojačavaju tumorocidnu aktivnost makrofaga kroz lučenje IFN-γ (Corthay i sur., 2005).
Predloženi mehanizmi citotoksičnosti posredovani makrofagima mogu biti topljivi citotoksični čimbenici oslobođeni od strane makrofaga, koji mogu mijenjati cjelovitost membrane tumorskih stanica i/ili peristaničnog okoliša tih istih stanica, povećati razinu pH, osiromašiti okoliš kisikom te povećati razinu lizosomalnih enzima (Oršolić i Bašić, 2005; Oršolić i sur., 2005).

Proces tumorske angiogeneze povezan je s pojavom hipoksije ili ishemije tumora koju kontrolira poseban transkripcijski čimbenik zvan HIF-1α koji je odgovoran za

induciranje transkripcije brojnih angiogenih čimbenika, kao što je primjerice VEGF (Gerald i sur., 2004) koji dovode do razgradnje bazalne membrane i širenja endotelnih stanica venula kroz njihovu stijenku tvoreći novu mrežu kapilara u tumoru (Lešin i sur., 2008). Angiogeni čimbenici potrebni za neovaskularizaciju tumora stvaraju se iz najmanje tri izvora: sintezom u tumorskim stanicama, sekrecijom iz makrofaga koji infiltriraju tumor, te enzimskom razgradnjom međustaničnog matriksa od strane makrofaga i/ili tumorskih stanica (Dedić Plavetić i sur., 2003). Stoga je istražen antiangiogeni učinak CA od strane tumorskih stanica u ascitesu, ali i od makrofaga izoliranih iz ascitesne tekućine analizom koncentracije VEGF-a, MMP-2 i MMP-9 pomoću ELISA metoda. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da je kod oba načina obrade životinja razina VEGF kod svih obrađenih skupina s CA smanjena u odnosu na kontrolu i to kod makrofaga ascitesa (Slike 131-132), zatim u nadtaloga tumorskih stanica (Slike 133-134), ali i kod samih tumorskih stanica (Slike 135-136), pri čemu je statistička značajnost uočena jedino prilikom obrade s CA 80 mg/kg (10X) ($P < 0,05$) u nadtalogu tumorskih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 133). Dobiveni podaci ukazuju da CA uspješno inhibira sintezu VEGF-a u stanicama tumora i makrofagima te posljedično inhibira sintezu proteaza i receptora važnih za širenje tumora u lokalna tkiva. Pri tome najbolji inhibitorni učinak na sekreciju VEGF-a u stanicama makrofaga ascitesa ostvarila je skupina CA 80 mg/kg (4X) sa 66, 29 %, dok je u nadtalogu tumorskih stanica to bila skupina CA 80 mg/kg (10X) sa 52,20 % odnosno u talogu tumorskih stanica primjena CA 40 mg/kg (10X) sa 40,06 %.

Nedavno je dokazano da smanjenje permeabilnosti krvnih žila pomoću inhibicije tirozin kinazne aktivnosti receptora VEGF-a dovodi do inhibicije stvaranja malignog ascitesa u animalnim modelima (Xu i sur., 2000) što ujedno potvrđuju i naši rezultati budući da je kod svih obrađenih skupina s CA došlo do smanjenja stvaranja ascitesne tekućine u odnosu na kontrolu (Slike 41-42).

Prema Jung i sur. (2007), CA i njezin sintetski derivat CAPE [3-(3,4-dihidroksi-fenil)-akrilna kiselina 2-(3,4-dihidroksi-fenil)-etil ester] suprimiraju tumorsku angiogenezu blokiranjem STAT3-posredovane VEGF ekspresije kao i smanjenjem regulacije aktivnosti HIF-1α u humanim stanicama karcinoma bubrega. Nadalje, Chung i sur. (2013) navode da CAPE suprimira VEGF-om induciranu proliferaciju, stvaranje krvožilja kao i stvaranje stresnih vlakana aktina i gubitak krvožilno-endotelnog kadherina kod kontakta stanica-stanica u

endotelnim stanicama što ukazuje na inhibiciju VEGF-VEGFR-2 i njegove nizvodne aktivacije signala *in vitro*.

Osim toga, utvrđeno je da CAPE blokira VEGF-om stimuliranu neovaskularizaciju i smanjuje krvožilnu permeabilnost u kapilarama kože miša *in vivo* (Chung i sur., 2013). Isti autori navode da CAPE inhibira rast i neovaskularizaciju primarnih tumorskih stanica u C57BL/6 i BALB/c miševima s inokuliranim stanicama melanoma, karcinoma debelog crijeva i Lewisovog karcinoma pluća iz čega se može zaključiti da CAPE negativno modulira angiogenezu induciranu VEGF-om kroz supresiju VEGFR-2 aktivacije te da se može upotrijebiti u antiangiogenom terapijskom pristupu (Chung i sur., 2013).

Iz navedenog je vidljivo da naši rezultati potvrđuju činjenicu da ROS regulira angiogenezu i rast tumora putem čimbenika VEGF-a. Istu potvrdu o antiangiogenom i protumetastatskom učinku CA dobili smo i analizom koncentracija MMP-2 i MMP-9 koje su inače odgovorne i za proces metastaziranja gdje je također utvrđeno smanjenje njihovih koncentracija u odnosu na kontrolu i kod makrofaga ascitesa (Slike 137-138; 143-144), i u nadtalogu (Slike 139-140; 145-146), i u talogu tumorskih stanica (Slike 141-142; 147-148), pri čemu je statistički značajno smanjenje koncentracije MMP-2 uočeno kod primjene CA 80 mg/kg (4X) ($P < 0,05$) u tumorskim stanicama (Slika 142), kao i smanjenje koncentracije MMP-9 prilikom primjene CA 80 mg/kg (4X) ($P < 0,05$) u nadtalogu tumorskih stanica (Slika 146), u odnosu na kontrolu. Kod nestimuliranih makrofaga ascitesa skupina CA 80 mg/kg (10X) najviše je inhibirala sekreciju MMP-2 i MMP-9 i to za 60,56 % odnosno za 94,69 %, u nadtalogu tumorskih stanica takav učinak ostvarila je CA 80 mg/kg (4X) gdje je postotak inhibicije iznosio čak 78,23 % za MMP-2 odnosno 73,96 % za MMP-9. U tumorskim stanicama najveća inhibicija sekrecije MMP-2 ostvarena je kod skupine CA 40 mg/kg (4X) za 49,07 %, a za MMP-9 kod skupine CA 40 mg/kg (10X) za 68,25 %.

Naši rezultati su u skladu s rezultatima Shi i sur. (2012) koji su pokazali učinak CA amida kao selektivnih inhibitora MMP-2 i MMP-9. Chung i sur. (2004) u svom istraživanju pokazali su da CA i CAPE selektivno inhibiraju MMP-2 i MMP-9 u stanicama hepatokarcinoma. Naime, obrada HepG2 stanica s CA (100 μg/mL) i CAPE (5 μg/mL) suprimirala je PMA-induciranu MMP-9 ekspresiju kroz inhibiciju funkcije NK-κB. Također, isti autori potvrdili su da CA i CAPE suprimiraju rast HepG2 stanica injiciranih u gole miševe (ksenograft model). Osim toga, subkutana i oralna primjena CA i CAPE značajno je

reducirala broj metastaza u jetri. Na temelju ovih rezultata, Chung i sur. (2004) potvrdili su terapijski potencijal CA i CAPE u terapiji tumora.

Prema tome, sažimajući dobivene rezultate smatramo da povećanje aktivnosti M1 makrofaga uzrokuje povećanje predočavanja tumorskih antigena kao i povećanje imunoreaktivnosti imunosnih stanica koje zajedno s drugim mehanizmima CA učinkovito inhibiraju angiogenezu, tumorski rast i time povećavaju životni vijek životinja. Povećanje životnog vijeka životinja izravno je povezano sa smanjenjem broja vijabilnih stanica, smanjenjem akumulacije ascitesne tekućine, imunomodulacijom i redukcijom gustoće krvnih žila (MVD) što je u konačnici uzrokovano smanjenom razinom lučenja VEGF-a te MMP-2 i MMP-9.

Naši rezultati potvrdili su da CA, kao i mnogi prehrambeni spojevi dobiveni iz biljaka, pokazuje višestruku sposobnost djelovanja na različite ciljeve, uključujući preživljenje, proliferaciju, invaziju, angiogenezu i metastaziranje te mogu utjecati na različite korake razvoja tumorskih stanica ciljajući jednu ili više molekula vezenih za upalu. Osim toga, prednost ovih proizvoda je da su ovi proizvodi jeftiniji, sigurniji i bolje dostupni od sintetskih spojeva (Oršolić i Bašić, 2005; 2007; Oršolić, 2010).

Temeljem svih rezultata možemo zaključiti da je protutumorska aktivnost CA rezultat sinergističkog djelovanja različitih mehanizama kojima CA djeluje na proliferaciju, angiogenezu, imunomodulaciju i preživljenje životinja. Ovi rezultati ističu novi mehanizam djelovanja CA u miševa nositelja EAT tumora koji ukazuje na izravnu ulogu CA u blokiranju rasta tumora kroz inhibiciju M2 makrofaga, sposobnosti povećanja protutumorskog odgovora limfocitima T te poboljšanja učinkovitosti imunoterapije.

CA može povećati citotoksičnost djelovanjem M1 makrofaga i inhibirati rast tumora; inhibicija aktivnosti TAMs može biti posredovana antioksidativnim djelovanjem CA. Kontinuirana primjena CA kao inhibitora ROS-a učinkovito blokira pojavu TAMs i značajno suprimira tumorigenezu u mišjim modelima karcinoma. Ove rezultate potvrđuje i ELISA analiza Th1/Th2/Th17 citokina u nadtalogu tumorskih stanica gdje je vidljivo povećanje proupalnih citokina IL-2, IL-6, IFN-γ i TNF-α kod skupine CA 80 mg/kg (10X) te IL-2, IFN-γ i TGF-β1 kod skupine CA 40 mg/kg (10X) u odnosu na kontrolu, ali bez statističke

značajnosti (Slika 57). Povećanje IL-12 u većoj i manjoj dozi CA tijekom 10 dana obrade životinja povezano je s antiangiogenim svojstvima CA, a temelji se na povećanju proizvodnje IFN-γ te podržavanju M1 makrofaga i produkciji M1 kemokina uključujući inducibilni protein 10 (IP-10 ili CXCL-10). Slični rezultati dobiveni su s obradom životinja svakog drugog dana u kasnoj fazi rasta tumora (Slika 58). I u ovom slučaju vrijednost IL-12 je povećana kod CA 40 i 80 mg/kg u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti, a istovremeno dolazi do smanjenja vrijednosti proupalnog TGF-β1 kod obje skupine obrađene s CA i TNF-α kod CA 80 mg/kg (4X) u odnosu na kontrolu, dok su vrijednosti IL-2 za CA 40 mg/kg ($P < 0,05$) i CA 80 mg/kg te IFN-γ kod obje skupine obrađene s CA još uvijek povećane u odnosu na kontrolu.

Rezultati analize funkcionalne aktivnosti makrofaga pokazuju povećanje srednje vrijednosti broja aktiviranih makrofaga kod skupina obrađenih s CA bez obzira na način obrade životinja u odnosu na kontrolu što je ujedno popraćeno povećanjem citotoksičnosti prema EAT stanicama i njihovom sposobnošću induciranja apoptoze u stanicama tumora (Slike 95 A, B). Stanice s morfološkim dokazima apoptoze imale su izbočenja plazmatske membrane te nastanak apoptotičkih tjelešaca, agregirani kromatin, fragmentirane jezgre i kondenziranu bazofilnu citoplazmu (Slike 95 B1-B4). Za razliku od stanica iz peritonealne šupljine miša koje su podvrgnute obradi s CA, kontrolne EAT stanice obojane s Giemsom pokazivale su jezgru s raspršenim kromatinom i organiziranom/cjelovitom plazmatskom membranom (Slika 95 B5).

Stoga, prema našim rezultatima, čini se da CA povećava funkcionalnu sposobnost makrofaga i dovodi do povećanja razine proupalnih citokina, osobito Th1 citokina, kao što su IL-2, IFN-γ i IL-12 koji povećavaju tumorocidnu aktivnost makrofaga. IL-12 je proupalni citokin koji ima središnju ulogu u proizvodnji IFN-γ aktiviranjem limfocita Th1, $CD8^+$ citotoksičnih stanica i NK stanica, a ujedno igra važnu ulogu u diferencijaciji populacija Thl stanica. Na taj način, IL-12 ima važnu ulogu i kod urođene i stečene imunosti (Corthay i sur., 2005; Oršolić i sur., 2016; Zhai i sur., 2007). Osim stvaranja Th1 imunosnog odgovora od strane IL-12 i njegove pozitivne povratne regulacije tijekom proizvodnje IFN-γ u makrofagima, IL-12 ujedno povećava proizvodnju protutijela za aktivaciju kaskade komplementa i opsoniziranje tumorskih stanica čineći ih time osjetljivima na citotoksičnu aktivnost mijeloidnih i NK stanica, što u konačnici dovodi do smrti tumora (Oršolić i sur.,

2016). Dakle, čini se da CA povećava razinu M1 makrofaga koji ubijaju tumorske stanice i proizvode obilne količine proupalnih citokina.

Mnogi znanstvenici smatraju da su TAMs važni koordinatori u upalnim procesima koja se javljaju u mikrookolišu tumora. Stoga, TAMs imaju ključnu ulogu u putevima koji povezuju upalu i rak, budući da proizvode brojne čimbenike rasta epitelnih i endotelnih stanica, kao i upalnih citokina i kemokina koji pridonose preživljenju tumora, proliferaciji i invaziji. Nadalje, imunosupresivni posrednici koje oslobađaju lokalne upalne ili tumorske stanice ugušuju posredovani protutumorski odgovor domaćina i time olakšavaju napredovanje tumora (Oršolić i sur., 2016). Osim TAMs-a, još jedan važan čimbenik koji doprinosi razvoju tumora je ROS. ROS pozitivno pridonosi na različite načine karcinogenezi i malignoj progresiji tumorskih stanica: potiče oštećenje genoma i gensku nestabilnost, kao signalni posrednici prenose informacije za mitozu i preživljenje pomoću receptora čimbenika rasta i adhezijskih molekula, potičući pokretljivost stanica i oblikuju mikrookoliš tumora induciranjem upale/popravka i angiogeneze (Baay i sur., 2011; Siveen i Kuttan, 2009;).

Međutim, mnoga istraživanja su pokazala da visoke razine ROS-a mogu uzrokovati stanična oštećenja (Hseu i sur., 2008; Li i sur., 2007; Pelicano i sur., 2004; Valko i sur., 2006; Zhao i sur., 2006) i igrati važnu ulogu u posredovanju apoptoze (Coyle i Puttfarcken, 1993; Garcia-Ruiz i sur., 1997; Kim i sur., 2005; Kuo i sur., 2007). Povećanje proizvodnje ROS-a odavno se povezuje s apoptotičkim odgovorom izazvanim protukancerogenim spojevima (McCollum i sur., 2006; Trachootham i sur., 2006). Zanimljivo je da se je pokazalo da ROS selektivno ubija stanice raka (Kim i sur., 2005; Kuo i sur., 2007; McCollum i sur., 2006;) te da igra ključnu ulogu u diferencijaciji alternativno aktiviranih makrofaga i pojavljivanju tumoru pridruženih makrofaga (TAMs) (Zhang i sur., 2013). Međutim, izravna uloga i mehanizam djelovanja ROS-a u stvaranju tumora, angiogenezi i polarizaciji makrofaga i dalje ostaju nerazjašnjeni.

Oršolić i Bašić (2007) navode da flavonoidi ne samo da djeluju selektivno na tumorske stanice u odnosu na normalne već i da pokazuju imunostimulatorno djelovanje u odbacivanju tumora koji se prvenstveno temelji na aktivaciji makrofaga, a preko njih i na stimulaciju limfocita T, B i NK stanica. Budući da su reaktivne vrste kisika povezane s mnogobrojnim staničnim ulogama (poput stanične proliferacije, diferencijacije, apoptoze i

angiogeneze), njihova inhibicija predstavlja potencijalno obećavajući pristup u kemoprevenciji i terapiji raka.

Ovisno o koncentraciji ROS-a u stanici/organizmu, njegova uloga može biti dvojaka. Naime, niske koncentracije ROS-a u visoko proliferativnim tkivima (nediferencirane, prekancerozne, kancerozne ili transformirane stanice) i u mitotski aktivnim tkivima koja podržavaju proliferaciju mogu predstavljati dodatni signal za proliferaciju, dok visoke koncentracije ROS-a u tim istim tkivima mogu inducirati apoptozu i time potencijalno spriječiti daljnju diobu i karcinogenezu čime se uočava veća osjetljivost nediferenciranih stanica na citotoksičnost prouzročenu ROS-om od diferenciranih (Oršolić i sur., 2008).

Temeljem brojnih čimbenika koji mogu utjecati na rast i širenje tumora uključujući epigenetske i genetske čimbenike, reaktivne vrste kisika kao i oslabljeni imunosni nadzor istražili smo kakva je imunomodulatorna i antioksidativna uloga CA u regulaciji rasta EAT tumora i tumorske angiogeneze.

Što se tiče antioksidativne zaštite CA, uočeno je da sve obrađene skupine s CA bez obzira na način obrade životinja izazivaju kod ascitesne tekućine povećanje razine lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, pri čemu je statistički značajno povećanje kod CA 80 mg/kg (10X) (Slika 87) i CA 40 mg/kg (4X) ($P < 0,05$) (Slika 88). Malondialdehid (MDA), kao krajnji proizvod lipidne peroksidacije, vidljivo je veći u tumorskom tkivu nego u zdravim organima (Yagi, 1991). Poznato je da prekomjerna proizvodnja ROS-a uzrokuje ireverzibilno oštećenje DNA kao i oštećenje membranskih lipida što dovodi do proizvodnje MDA.

Budući da je razina GSH u ascitesu kod većine pokusnih skupina bila smanjena u odnosu na kontrolu (Slike 63-64), smatramo da se radi o nesposobnosti transformiranih stanica da sintetiziraju glutation kao odgovor na oksidacijski stres što se odražava kao pojačana osjetljivost transformiranih stanica na CA. Izuzetak je skupina obrađena s CA 40 mg/kg (10X) kod koje je uočeno povećanje razine GSH u odnosu na kontrolu (Slika 63), što se može pripisati velikoj heterogenosti EAT stanica.

Isto tako, uočeno je povećanje CAT i SOD aktivnosti u ascitesnoj tekućini u odnosu na kontrolu (Slike 71-72; 79-80), pri čemu je statistički značajno kod skupine CA 80 mg/kg (10X) ($P < 0,01$). Čini se da povišene SOD i CAT aktivnosti mogu ukazivati na povećanu razinu oksidacijskog stresa u tumorskim stanicama obrađenim s CA te da stvaranje slobodnih radikala može izazvati indukciju sinteze enzima SOD i CAT koji su u skladu s povećanim

ROS signalizacijskim učincima CA. Povećanje SOD aktivnosti ovisno o dozi u miševa obrađenih s CA utječe na usporavanje rasta tumorskih stanica zbog povećane proizvodnje vodikovog peroksida (Wang i sur., 2005).

S obzirom na razlike vezane za različite tumore često redukcija oksidacijskog stresa pomoću reducirajućih tvari sprječava proces apoptoze u nekim stanicama, dok u drugim redukcija oksidacijskog stresa uzrokuje proces apoptoze (Oršolić i Bašić, 2007), tako da vanjske tvari mogu izazvati suprotne učinke unutar različitih okolnosti. Budući da su stanična proliferacija i apoptoza dva alternativna načina djelovanja koja prvenstveno ovise o specifičnoj staničnoj redoks ravnoteži u dato vrijeme, poželjno bi bilo istovremeno tijekom obrade životinja mjeriti apoptozu i razinu GSH u različito vrijeme kako bi se vidjelo da osjetljive stanice povećanjem razine ROS-a propadaju, dok opstaju otporne stanice koje uz mnoge prilagodbe imaju i povećanu razinu GSH koja vodi stvaranju rezistencije na primjenjenu terapiju.

Bubreg, jetra i slezena ne pokazuju statistički značajne razlike u razini MDA, GSH, CAT i SOD u odnosu na kontrolnu skupinu; vrijednosti su uglavnom niže što ukazuje na antioksidativnu sposobnost CA u zdravom tkivu. Međutim, polifenolne sastavnice, uključujući CA mogu imati antioksidativnu i prooksidativnu sposobnost što ovisi o brojnim čimbenicima u organizmu poput pH vrijednosti, prisutnosti prijelaznih metala s promijenjivom valencijom (poput Fe ili Cu) kao i različitoj antioksidativnoj sposobnosti stanica u različitim tkivima i organima te njihovoj produkciji reaktivnih radikala.

Pretpostavljamo da bi unutarstanična proizvodnja ROS-a mogla biti ključan čimbenik u CA-induciranoj staničnoj smrti u tumorskim stanicama (Slika 95) dok su normalne stanice zaštićene od djelovanja ROS-a. Međutim, ovaj mehanizam trebalo bi potvrditi mjerenjem unutarstanične razine ROS-a u tumorskim i normalnim stanicama. Ti su podaci u skladu s podacima drugih autora koji su pokazali da nesrazmjerno povećanje unutarstaničnog ROS-a može inducirati zaustavljanje staničnog ciklusa raka, starenje i apoptozu (Simon i sur., 2000). Nasuprot tome, normalne stanice mogu bolje tolerirati oksidacijska oštećenja zbog njihove niske bazalne proizvodnje ROS-a i normalne metaboličke regulacije (Trachootham i sur., 2006). Dakle, naši rezultati potvrđuju da biokemijska razlika između normalnih stanica i stanica raka može biti temelj za modulaciju staničnog ROS-a kao način za selektivno ubijanje stanica.

Slične podatke pokazali su i Kanimozhi i Prasad (2015) koji su ustvrdili da CA ima antioksidativno djelovanje u normalnim stanicama, a prooksidativna svojstva u tumorskim stanicama što dovodi do oksidacijskog oštećenja DNA i induciranja stanične smrti (apoptoze) u tumorskim stanicama popraćene s povećanjem apoptotičkih morfoloških promjena u staničnim linijama HeLa i ME-180. CA u dozama od 30-50 µg/mL povećava biljege lipidne peroksidacije kao što su reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline, konjugirani dieni i lipidni hidroperoksid, a ujedno smanjuje razinu SOD, CAT, GSH i glutation peroksidaze (GPx) u odnosu na kontrolu te vodi promijeni membranskog potencijala mitohondrija.

5.2.3. Učinci TA na angiogenezu u miša nositelja EAT-a

Taninska kiselina (TA) je najjednostavniji široko rasprostranjeni biljni hidrolizirajući taninski polifenol prisutan u voću, povrću, žitaricama, bilju, čaju, crnom vinu i kavi, a ujedno je glikozidni polimer galne kiseline koji se odlikuje antioksidativnim, protuproliferativnim, protutumorskim, protubakterijskim i protuvirusnim svojstvima.

Taninska kiselina prema rezultatima analize ukupnog broja stanica u ascitesnoj tekućini inhibira rast tumorskih stanica što je vidljivo kod primjene oba načina obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora, s time da je obrada miševa u većoj i manjoj dozi svakog drugog dana (Slika 44) pokazala nešto bolje rezultate od uzastopne obrade miševa tijekom 10 dana (Slika 43). Najveće smanjenje volumena ascitesa u peritonealnoj šupljini u odnosu na kontrolu dala je primjena TA 10 mg/kg tijekom 10 dana (Slika 41) kao i kod obrade životinja svakog drugog dana (Slika 42) iako rezultati nisu statistički značajni. Međutim, najbolji učinak na preživljenje životinja u odnosu na kontrolu imala je skupina TA 5 mg/kg tijekom 10 dana obrade (% ILS = 24,05) (Slika 39), dok su ostale skupine koje su obrađene s TA polučile dosta slabije rezultate (Tablice 18-19). Razlog tome može biti nešto veća toksičnost primjene same TA na cjelokupni organizam iako se je TA primjenjivala u znatno nižim koncentracijama od CA i GA pa bi se u daljnjim istraživanjima mogle razmotriti još i manje doze TA. Najsporiji rast tumorskih stanica u peritonealnoj šupljini tijekom 10 dana obrade ostvarila je skupina TA 5 mg/kg (Slika 37) što se podudara s rezultatima ukupnog broja stanica u peritonealnoj šupljini i preživljenja životinja. S druge strane, tijekom obrade miševa svakog drugog dana takav učinak imala je skupina TA 10 mg/kg (4X) s još značajnijim smanjenjem mase tumora od TA 5 mg/kg (10X) (Slika 38). Rezultati diferencijalne analize

stanica iz ascitesa ukazuju da je tijekom 10 dana obrade životinja primjena TA 10 mg/kg dovela do većeg povećanja broja makrofaga, dok je skupina TA 5 mg/kg uzrokovala veći pad broja tumorskih stanica, a istovremeno utjecala na povećanje broja neutrofila u ascitesnoj tekućini (Slika 45). Međutim, kod obrade miševa svakog drugog dana (4X) značajniji porast broja makrofaga, a istovremeno smanjenje broja tumorskih stanica imala je primjena TA 10 mg/kg, dok je u pogledu povećanja broja neutrofila znatno veći utjecaj imala skupina TA 5 mg/kg (Slika 46). Aktivnost makrofaga i neutrofila može biti ključna za inhibiciju rasta tumora (Oršolić i sur., 2005) kroz pojačanu sintezu reaktivnih radikala poznatiju kao ”oksidacijski prasak“ te brojnih litičkih molekula i enzima.

Kemoprotektivno djelovanje TA davno su pokazali Nepka i sur. (1999) koji smatraju da TA primijenjena u niskoj dozi može imati snažan doza ovisni učinak na razvoj spontanih neoplazmi jetre kod C3H miševa ili spriječiti razvoj karcinoma; pojavnost karcinoma nakon unosa TA tijekom 9 mjeseci je bila 4,44 % u odnosu na 33,3 % u kontrolnoj grupi miševa.

Naši rezultati mikroskopske analize broja krvnih žila u peritoneumu potvrđuju najbolji antiangiogeni učinak TA u odnosu na sve primijenjene skupine fenolnih kiselina (Slike 125-126). Kod svih obrađenih skupina s TA uočeno je statistički značajno smanjenje broja krvnih žila u odnosu na kontrolnu skupinu; statistička značajnost TA 5 i 10 mg/kg (10X) i TA 10 mg/kg (4X) je (P < 0,001) te TA 5 mg/kg (4X) je (P < 0,05). Ovaj antiangiogeni učinak može se povezati s koncentracijom COX-2 u LPS stimuliranim i nestimuliranim makrofagima ascitesa kao i u tumorskim stanicama. Rezultati pokazuju da primjena manje doze TA kod oba načina obrade životinja dovodi do statistički značajno veće inhibicije stvaranja COX-2 enzima u navedenim stanicama u odnosu na kontrolu: TA 5 mg/kg (10X i 4X) kod LPS makrofaga ascitesa (P < 0,05) (Slike 51-52), TA 5 mg/kg (10X i 4X) kod nestimuliranih makrofaga ascitesa (P < 0,05; P < 0,01) (Slike 53-54), TA 5 mg/kg (4X) u tumorskim stanicama (P < 0,05) (Slika 56). Primjena TA 5 mg/kg svakog drugog dana (4X) jedino je kod tumorskih stanica dovela do značajnog smanjenja COX-2 koncentracije u odnosu na kontrolu (P < 0,05). Temeljem navedenog možemo zaključiti da TA kroz inhibiciju COX-2 aktivnosti (Slike 55-56) inhibira angiogeni proces ključan za rast i metastaziranje tumora (Slike 125-126). Osim inhibicije COX-2 aktivnosti čini se da TA stimulira proizvodnju Th1 citokina što je vidljivo iz povećanja IL-6 i IL-12 kod oba načina obrade životinja, posebice u ranoj fazi obrade tumora (Slike 57-58). Međutim, Park i sur. (2006)

pokazali su da TA inhibira UVB-om pojačanu ekspresiju upalnih medijatora, IL-1, IL-6, TNF-α, COX-2 i prostaglandina E2 kod UVB-ozračenih humanih keratinocita (HaCaT).

Th1 citokini pripadaju klasičnim M1 makrofagima koje karakterizira povećani oksidacijski prasak i povećana razina NO i smanjena razina Arg-1. TA je pokazala najbolji učinak na aktivaciju makrofaga od svih primijenjenih fenolnih kiselina; statistički značajno povećanje uočeno je kod TA 5 mg/kg (10X i 4X) ($P < 0,05$) i TA 10 mg/kg (10X i 4X) ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolu (Slike 96-97). TA kod oba načina obrade miševa dovodi do povećanja razine NO u nadtalogu stimuliranih (Slike 102-103) i nestimuliranih (Slike 104-105) makrofaga ascitesa, zatim u samim nestimuliranim makrofagima ascitesa (Slike 106-107) te u nadtalogu tumorskih stanica (Slike 108-109) u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Ovo povećanje razine NO zasigurno pridonosi citostatičkom i citolitičkom učinku makrofaga na rast tumorskih stanica u ascitesu. Citolitički učinak makrofaga nakon obrade s TA pridonosi smanjenju volumena ascitesa (Slike 41-42) i broja tumorskih stanica u peritonealnoj šupljini miševa u odnosu na kontrolu (Slike 43-44). S druge strane, vidljivo je smanjenje razine Arg-1 u nadtalogu i talogu LPS makrofaga slezene i ascitesa te nadtalogu i talogu nestimuliranih makrofaga ascitesa u odnosu na kontrolu što ukazuje na inhibiciju polarizacije makrofaga M1 u M2. Pri tome se zamjećuje statistički značajno smanjenje razine Arg-1 kod TA 5 mg/kg (10X) i TA 10 mg/kg (4X) ($P < 0,05$) u nadtalogu LPS makrofaga slezene (Slike 110-111), zatim kod TA 10 mg/kg (10X) ($P < 0,05$), TA 5 mg/kg (4X) ($P < 0,05$) i TA 10 mg/kg (4X) ($P < 0,01$) u LPS makrofagima ascitesa (Slike 114-115) te kod TA 10 mg/kg (10X) ($P < 0,05$) u nadtalogu makrofaga ascitesa (Slika 116) odnosno kod TA 5 mg/kg (10X) ($P < 0,05$) u makrofagima ascitesa (Slika 118). Istovremeno, u nadtalogu tumorskih stanica uočeno je doza ovisno smanjenje razine Arg-1 u odnosu na kontrolu (Slike 120-121), ali bez statističke značajnosti što je ujedno potvrđeno i analizom ekspresije proteina Arg-1 u tumorskim stanicama (Slika 122-123) s time da je jedino kod TA 10 mg/kg (4X) vidljivo povećanje ekspresije Arg-1 što se može pripisati heterogenosti stanica u EAT tumoru.

Smanjenoj angiogenezi osim aktivacije makrofaga pridonosi i učinak TA u inhibiciji sinteze VEGF-a kako u makrofagima ascitesa (Slike 131-132) tako i kod nadtaloga (Slike 133-134) i taloga tumorskih stanica (Slike 135-136) pri čemu je znatno veći inhibitorni učinak na razinu VEGF-a ostvaren kod makrofaga ascitesa u odnosu na same tumorske stanice.

Naime, kod makrofaga ascitesa uočeno je značajno smanjenje razine VEGF-a kod TA 5 mg/kg (10X i 4X) ($P < 0,001$) za 75,85 % odnosno 83,18 % te TA 10 mg/kg (4X) ($P < 0,01$) za 74,65 %. Statistički značajno smanjenje razine VEGF-a za 77,20 % uočeno je i kod skupine TA 5 mg/kg (10X) u talogu tumorskih stanica u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Najveći postotak inhibicije stvaranja VEGF-a u nadtalogu tumorskih stanica uočen je kod primjene TA 10 mg/kg (10X) pri čemu je razina koncentracije VEGF-a smanjena za 27,29 % u odnosu na kontrolnu skupinu.

Razina koncentracije VEGF-a usko je povezana s aktivnosti MMPs koje su čvrsto kontrolirane ravnotežom između sinteze aktivnog enzima i prisutnosti endogenih inhibitora kao što su primjerice tkivni inhibitori metaloproteinaza (Nagase i Woessner, 1999). Međutim, tijekom progresije tumora dolazi do gubitka te ravnoteže te povećana ekspresija određenih MMPs dovodi do prijelaza iz benignog u maligni fenotip za koji se vjeruje da je uključen u metastatsko širenje tumora i angiogenezu (MacDougall i Matrisian, 1995; Stetler-Stevenson, 1999). Prekomjerna ekspresija MMPs uočena je u različitim metastatskim tumorskim tkivima, dok protutumorski lijekovi djeluju na smanjenje ekspresije MMPs (Rasmussen i McCann, 1997). Zhang i sur. (2009) uočili su da primjena TA u koncentraciji od 0,05 % kod štakora inhibira aktivnost MMP-2 i MMP-9 te povećava sadržaj kolagena u ranoj fazi nakon srčanog infarkta. Jimenez i sur. (2006) otkrili su da u *in vitro* uvjetima hidrofilna TA u dozi od 1μg/mL kod dermalnih fibroblasta dovodi do značajnijeg učvršćivanja elastičnih vlakana u odnosu na neobrađenu kontrolnu skupinu, pojačava biostabilnost tropoelastina i elastina, značajno smanjuje proteolitičku razgradnju elastina od strane elastolitičkih enzima koji pripadaju obitelji serin proteinaza, cistein proteinaza i metaloproteinaza. Za razliku od Jimenez i sur. (2006) te Zhang i sur. (2009), Chu i sur. (2016) otkrili su u svom istraživanju učinka TA na jetrenu fibrozu induciranu kod miševa da TA povećava ekspresiju MMP-1 i MMP-9, dok s druge strane smanjuje ekspresiju receptora angiotenzina II (ART-1), IL-1β, TNF-α, TGF-β, kaspaze-3, c-fos, c-jun, omjer Bax/bcl-2 te tkivnog inhibitora metaloproteinaze 1 (TIMP-1).

Naši rezultati analize koncentracije MMP-2 pokazuju inhibitorni doza ovisni učinak TA na smanjenje razine MMP-2 u makrofagima ascitesa (Slike 137-138) i u tumorskim stanicama (Slike 141-142) pri čemu je najbolji učinak ostvarila primjena TA 10 mg/kg (10X) (80,90 %; $P < 0,05$) i TA 10 mg/kg (4X) u makrofagima ascitesa (84,11 %; $P < 0,01$) odnosno

TA 10 mg/kg (10X) u tumorskim stanicama (42,71 %; $P < 0,05$) u odnosu na kontrolu. Međutim, kod svih skupina koje su obrađene s TA nije uočeno smanjenje razine MMP-2 u nadtalogu tumorskih stanica (Slike 139-140) kod oba načina obrade životinja. S druge strane, analiza koncentracija MMP-9 pokazala je da je primjena TA u većoj i manjoj dozi tijekom 10 dana ostvarila bolji inhibitorni učinak na razinu MMP-9 u makrofagima ascitesa (Slika 143) u odnosu na obradu miševa svakog drugog dana (4X) (Slika 144) pri čemu postotak inhibicije razine MMP-9 iznosi 97,05 % za TA 5 mg/kg odnosno 100,00 % za TA 10 mg/kg ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu. U samim tumorskim stanicama uočeno je neznatno smanjenje koncentracije MMP-9 u odnosu na kontrolu (Slike 147-148), pri čemu je najbolji rezultat u inhibiciji razine MMP-9 polučila primjena TA 10 mg/kg (4X) (4,76 %). Također, kod iste skupine uočeno je najveće smanjenje koncentracije MMP-9 u nadtalogu tumorskih stanica (Slika 146) pri čemu je razina MMP-9 smanjena za 21,86 % u odnosu na kontrolu, ali bez statističke razlike. Ova odstupanja TA na razinu MMP-9 mogla bi se objasniti polimernom strukturom i prisutnošću velikog broja hidroksilnih i karboksilnih skupina na TA molekuli čime TA može stvarati čvrste komplekse s različitim makromolekulama uključujući MMPs i regulatorne molekule MMPs.

Stoga na temelju svih rezultata možemo zaključiti da se protutumorska sposobnost TA u Swiss albino mišu temelji na inhibiciji proliferacije stanica EAT tumora, angiogeneze, antioksidativnom učinku te imunomodulacijskom učinku kroz povećanje M1 tumorocidne djelotvornosti TAMs i blokiranja M2 tumorske aktivnosti TAMs.

TA pokazuje i pozitivan učinak na težinu unutarnjih organa (bubreg, jetra i slezena); veće smanjenje težine svih unutarnjih organa kod oba načina obrade životinja imala je primjena manje doze TA (5 mg/kg) (Slike 49-50). Prema Chu i sur. (2016) TA u dozi od 25 g/kg ili 50 g/kg može značajno poboljšati morfologiju jetre kod miševa s induciranom fibrozom jetre te smanjiti aktivnosti AST i ALT enzima kao i koncentraciju MDA i razinu endotelina 1 (ET-1) u serumu. Kod predobrade miševa s TA (25 ili 50 mg/kg) kojima je naknadno inducirana hepatotoksičnost s acetaminofenom (APAP), razine ALT, AST, endotelina 1 (ET-1), NO i MDA bile su također smanjene u odnosu na kontrolnu skupinu (Zhang i sur., 2017).

TA u našim pokusima, kod oba načina obrade životinja, ne pokazuje statistički značajan utjecaj na hematološke (Tablice 22-25, Slike 47-48) i biokemijske (Tablice 26-29) parametre kod miša nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora u odnosu na kontrolu, osim kod primjene TA 5 mg/kg (10X) gdje je uočeno statistički značajno smanjenje prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) kao i postotka eozinofila u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$).

Prilikom analize razine GSH u ascitesu pokusnih skupina uočeno je smanjenje njegove razine kod svih skupina obrađenih s TA u odnosu na kontrolu (Slike 63-64), pri čemu je statistički značajno smanjenje vidljivo kod TA 5 mg/kg (4X) u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Također, značajno smanjenje razine GSH u odnosu na kontrolu zapaženo je kod skupine TA 10 mg/kg (4X) u stanicama bubrega ($P < 0,05$) (Slika 66) što govori o mogućoj nefrotoksičnosti taninske kiseline u većoj dozi ili mogućoj prilagodbi stanica bubrega na mikrookoliš obogaćen povećanim unosom izvanstaničnog antioksidansa kao što je TA dok je kod jetre (Slike 67-68) i slezene (Slike 69-70) u pravilu vidljivo povećanje razine GSH u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Zapažena je jedino smanjena razina lipidne peroksidacije (MDA) u stanicama bubrega (Slike 89-90) i jetre (Slike 91-92), što je u skladu s podacima Zhang i sur. (2017) gdje TA sprječava APAP izazvanu hepatotoksičnost kroz značajno povećanje razine SOD, CAT i GSH-Px u odnosu na kontrolu. Također, oralna primjena TA (25 ili 50 mg/kg) u predobradi miševa tijekom 3 dana prije unošenja APAP dovela je do supresije prekomjerne ekspresije IL-1β, TNF-α, c-fos, c-jun, NF-κB (p65) i kaspaze-3; također smanjuje regulaciju bax, a povećava regulaciju bcl-2, Nrf2 čimbenika (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) i hem oksigenaze-1 (HO-1) u jetri što ukazuje na hepatoprotektivno djelovanje TA koje se može povezati s antioksidativnim, protuupalnim i antiapoptotskim mehanizmom (Zhang i sur., 2017).

5.3. PROCJENA STUPNJA OŠTEĆENJA DNA U MIŠA NOSITELJA EAT-a NAKON OBRADE FENOLNIM KISELINAMA

Za procjenu genotoksičnosti koristili smo mikronukleus i alkalni komet test budući da je jedan od ciljeva bio ukazati na neškodljivost upotrebe fenolnih kiselina kao antioksidansa u terapiji karcinoma. Mikronukleusi su male kromatinske strukture koje svojom strukturom nalikuju jezgri, ali su samostalno smještene unutar interfazne citoplazme (Baatout i Derradji, 2004; Bombail i sur., 2001; Fenech i sur., 2003). Nastaju uslijed lomova kromosoma i kondenzacije acentričnih kromosomskih ulomaka (klastogeni učinak) ili kromosoma zaostalih u citoplazmi anafaze uslijed oštećenja i nefunkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena (aneugeni učinak) čime je onemogućeno putovanje jednog ili više kromosoma na pol stanice (Grisolia i Starling, 2001). Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice (Nath i Ong, 1990), te se stoga učestalost mikronukleusa može koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma izazvanih u stanicama u uvjetima *in vitro* i *in vivo* pod utjecajem različitih genotoksičnih spojeva (Baatout i Derradji, 2004; Fenech, 1993a, 1993b; Fenech i sur., 2003; Nusse i sur. 1996). Kvantitativna korelacija između kromosomskih aberacija i učestalosti mikronukleusa nije uvijek prisutna jer je opisano da se neki acentrični fragmenti ne odstranjuju putem mikronukleusa, nego neki od njih mogu i opstati u stanici dijeleći se i formirajući mikronukleus u nekoj od sljedećih dioba (Fučić i Mijić, 1999). Stoga stvaranje mikronukleusa tako ovisi o tipu stanica, mehaničkim karakteristikama stanice te veličini i broju kromosoma (Fučić, Mijić, 1999). Niska učestalost mikronukleusa može govoriti u prilog boljeg mehanizma popravka DNA, ali isto tako i sposobnosti stanica da uđu u apoptozu prije završetka ciklusa dijeljenja (Fučić, Mijić, 1999), dok je povišena učestalost mikronukleusa znak povećanog rizika karcinogeneze (Scott i sur., 1998).

Naši rezultati mikronukleus testa na retikulocitima periferne krvi miševa koji je ujedno i pokazatelj postojanja dvostrukih lomova (kidanja i gubljenja kromosomskog materijala ili zaostajanja i gubljenja cijelog kromosoma u anafazi tijekom diobe stanice) pokazuju da nije došlo do promjene broja mikronukleusa u svim obrađenim skupinama u odnosu na EAT kontrolu bez obzira na način obrade životinja iz čega se može zaključiti da su

oštećenja DNA leukocita više vezane za jednostruke lomove u DNA molekuli za koje je više pogodna analiza komet testom nego za dvostruke lomove kao i veliku mogućnost popravka.

Komet test poznat i pod nazivom mikrogel elektroforeza je vrlo osjetljiva i djelotvorna metoda za procjenu veličine i vrste oštećenja genoma (npr. jednolančane i dvolančane lomove DNA, adukte u molekuli DNA, apurinska i apirimidinska mjesta, mjesta DNA-protein veza (Kopjar i sur., 2002) kao i popravaka molekule DNA na razini pojedinačnih stanica (Collins i sur., 1997) koja se može izvoditi u *in vitro* i *in vivo* uvjetima, a u svrhu procjene genotoksičnosti određenog spoja, praćenja popravka stanične DNA te otkrivanje stanica u apoptozi i nekrotičnih stanica (Collins, 2004; Tice i sur., 2000; Wada i sur., 2003). Osim osjetljivosti i jednostavnosti izvedbe, ova metoda ističe se kratkim vremenom izvođenja unutar nekoliko sati i malom količinom uzoraka (stanica/tkiva) potrebnog za analizu bilo biljnog, životinjskog ili ljudskog podrijetla te stanica u kulturi (Tice i sur., 2000) što otvara velike mogućnosti usporedbe dobivenih rezultata. Ime je dobila prema obliku kometa koje poprimaju oštećene fluorescirajuće stanice točnije stanična jezgra i odlomljeni negativno nabijeni ulomci DNA koji se uslijed djelovanja električnog polja slobodno kreću kroz pore agaroznog gela od jezgre prema anodi oblikujući "glavu" i "rep" kometa (Singh i sur., 1988) pri čemu brzina kretanja ovisi o veličini nastalih slobodnih DNA ulomaka pa se DNA ulomci razdvajaju prema veličini. Olive i sur. (1990) predložili su izvedbu komet testa koja se odvija u neutralnim uvjetima i omogućuje specifično otkrivanje dvolančanih lomova DNA molekule u repu kometa, a za razliku od alkalnog komet testa (pH > 13) kojeg su predložili Singh i sur. (1988) koji omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova, mjesta osjetljiva na lužine koja mogu nastati pod utjecajem različitih tvari koje izazivaju uklanjanje baza (npr. alkilirajući kemijski spojevi) (Fortini i sur., 1996) te su zbog toga podložnija oštećenjima i lomovima (tzv. AP mjesta odnosno apurinska i apirimidinska mjesta) te ukriženog povezivanja između molekula DNA-DNA i DNA-proteina.

U ovom istraživanju analizirani su uzorci leukocita periferne krvi miša kao i tumorske stanice iz ascitesa radi provjere genotoksičnih učinaka istraživanih fenolnih kiselina (GA, CA, TA) primjenom alkalnog komet testa. Oštećenje DNA procjenjuje se na osnovi udjela DNA u "repu" kometa i udjela DNA u "glavi" kometa. Osnovni pokazatelji koji definiraju komet su dužina repa (udaljenost najkraćih odlomljenih ulomaka DNA), intenzitet

repa (% DNA u repu) i repni moment koji se definira kao umnožak dužine repa i postotka (%) DNA u repu.

Prijašnja istraživanja navode da dužina repa i repni moment mogu poslužiti kao kvantitativni pokazatelji analize oštećenja DNA molekule (Lee i Steinert, 2003). Prema Yasuhara i sur. (2003) stanica koja sadrži više od 50% ukupne DNA u repu kometa definira se kao apoptotička stanica. Chen i sur. (2009) pokazali su primjenom neutralnog komet testa na DU145 stanicama raka prostate da GA u dozi od 100 μg/mL uzrokuje značajno oštećenje (dvolančane lomove) DNA molekule ovisno o vremenu i dovodi do povećanja repnog momenta u odnosu na kontrolu što ukazuje da se stanice raka prostate nalaze u stanju apoptoze. Ferk i sur. (2011) u svom istraživanju navode da je kod osoba koje su konzumirale vodu za piće s GA (12,8 mg GA/dnevno) tijekom 3 dana došlo do značajnog smanjenja migracije DNA u perifernim limfocitima zdravih osoba što se pripisuje oksidaciji pirimidina (osjetljiva mjesta endonukleaze III) za 75 % i oksidaciji purina (osjetljiva mjesta formamidopirimidin glikozilaze) za 64 %. Također je uočeno da je nakon primjene spojeva koji povećavaju razinu ROS-a došlo do smanjenja oštećenja DNA u stanicama za 41 % što je ujedno bilo popraćeno s povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, glutation peroksidaze i glutation-S-transferaze-π) i smanjenjem unutarstanične ROS koncentracije u limfocitima. S druge strane, nisu utvrđene promjene ukupnog antioksidativnog kapaciteta u plazmi, razine malondialdehida u serumu i izlučivanja izoprostana u urinu. Stoga se antioksidativna svojstva GA u *in vivo* uvjetima ne povezuju s izravnim uklanjanjem radikala već s indirektnim mehanizmima (npr. zaštita od ROS-a kroz aktivaciju transkripcijskih čimbenika) (Ferk i sur., 2011).

Istraživanja na štakorima koji su konzumirali vodu za piće s GA u dozi od 2,31 mg/L pokazala su da GA smanjuje oksidacijska oštećenja DNA u limfocitima, jetri, debelom crijevu i plućima te im ujedno pruža zaštitu od lančanih lomova izazvanih γ-zračenjem i stvaranja oksidacijskih oštećenja DNA baza (Ferk i sur., 2011). Nadalje, broj preneoplastičnih jetrenih žarišta izazvanih zračenjem smanjen je za 43 % nakon oralne primjene GA (Ferk i sur., 2011). Na temelju svojih rezultata Ferk i sur. (2011) došli su do zaključka da GA može doprinijeti prevenciji stvaranja oksidacijskih oštećenja DNA u ljudi.

Primjenom alkalnog komet testa utvrđeno je da je CA u dozi od 200 μM i 400 μM sposobna izazvati cijepanje DNA u humanim perifernim limfocitima dok je inkubacija limfocita s neokuproinom, Cu(I)-specifičnim kelatorom, inhibirala razgradnju DNA što potvrđuje da je

Cu(I) intermedijer u reakciji cijepanja DNA (Bhat i sur., 2007). U istom radu, pokazano je da CA uzrokuje oksidacijski stres u limfocitima koji se inhibira sakupljačima ROS-a i neokuproinom čime se potvrđuje da mehanizam protutumorskog djelovanja biljnih polifenola uključuje mobilizaciju endogenog bakra, vjerojatno bakra vezanog za kromatin i posljedičnog prooksidativnog djelovanja (Bhat i sur., 2007).

Naši rezultati alkalnog komet testa na leukocitima periferne krvi ukazuju da su sve fenolne kiseline tijekom 10 dana obrade životinja pokazale statistički niže vrijednosti dužine repa u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$) pri čemu GA 40 mg/kg (10X) pokazuje najmanju dužinu repa u odnosu na kontrolu (Slika 59 a, Tablica 31). Nasuprot tome, tijekom 4X obrade životinja svakog drugog dana najmanju dužinu repa u odnosu na kontrolu pokazala je primjena GA 80 mg/kg ($P < 0,001$) (Slika 61 a, Tablica 37).

Intenzitet repa tijekom 10 dana obrade životinja je najveći nakon obrade GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) i TA 10 mg/kg ($P < 0,001$) na leukocitima periferne krvi u odnosu na kontrolu što ukazuje da je došlo do nastanka većih ulomaka DNA koji kratko putuju u agaroznom gelu zbog svoje veličine, dok s druge strane najmanji intenzitet repa ima GA 80 mg/kg ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolu (Slika 59 b, Tablica 32). TA obrada leukocita periferne krvi pokazuje najveći intenzitet repa i moment repa u obje primijenjene doze kod oba načina obrade životinja (u ranoj i kasnoj fazi prisutnosti tumora) što ukazuje na pojačanu genotoksičnost TA na leukocitne stanice (Slike 59 b-c; 61 b-c Tablice 32-33; 38-39). Najmanji intenzitet repa i moment repa ima CA 80 mg/kg u obje primijenjene doze i oba načina obrade u odnosu na kontrolu, vrijednosti su niže od kontrole, ali bez statističke značajnosti (Slike 59 b-c; 61 b-c Tablice 32-33; 38-39) što ukazuje na zaštitni učinak CA u krvi temeljen na antioksidativnoj aktivnosti CA što je u skladu s našim podatcima analize leukocita periferne krvi (Slike 59, 61) gdje je vidljivo da je dužina repa manja u odnosu na kontrolu. Nadalje, vjerujemo da je prooksidativni učinak CA u stanicama tumora izazvao smrt stanica procesom apoptoze (Slike 65-66, 89).

Rezultati analize alkalnog komet testa na tumorskim stanicama tijekom 10X i 4X obrade životinja ukazuju da GA 40 mg/kg ima najmanju dužinu repa u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$), dok se kod ostalih obrađenih skupina vrijednosti dužine repa nisu razlikovale od vrijednosti EAT kontrole (Slike 60 a i 62 a, Tablice 34 i 40).

Intenzitet repa kod tumorskih stanica tijekom 10 dana obrade kao i kod obrade životinja svakog drugog dana najveći je kod TA 5 i 10 mg/kg u odnosu na kontrolu (Slike 60 b i 62 b, Tablice 35 i 41) što se podudara s povećanim vrijednostima repnog momenta kod skupina TA 5 mg/kg i TA 10 mg/kg kod oba načina obrade životinja ($P < 0,05$ kod 10X obrade te $P < 0,01$ i $P < 0,05$ kod 4X obrade) čime se potvrđuje snažan genotoksični učinak TA na EAT stanice (Slike 60 c i 62 c, Tablice 36 i 42). Sličan genotoksični učinak pokazuje CA tijekom 10 dana obrade životinja.

Temeljem dobivenih rezultata čini se da samo TA može imati jači genotoksični učinak na leukocitne stanice periferne krvi kao i na stanice EAT u odnosu na druge fenolne kiseline.

§ 6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo izvesti zaključke kako slijedi:

1. Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) inokuliran *ip* u Swiss albino miševe uspješno prouzrokuje angiogene i proupalne promjene peritoneuma u miša. Navode temeljimo na:
    - povećanju mase tumora u miševa nositelja EAT-a,
    - povećanju mase unutarnjih organa (bubreg, jetra i slezena) u miševa nositelja EAT-a,
    - povećanom volumenu ascitesne tekućine u peritonealnoj šupljini,
    - povećanom broju krvnih žila u peritoneumu miša,
    - povećanim razinama proangiogenih čimbenika poput VEGF-a, MMP-2 i MMP-9,
    - povećanoj razini proupalnog čimbenika COX-2,
    - povećanoj razini oksidacijskog stresa,
    - povećanju M2 tumorske aktivnosti TAMs,
    - povećanoj razni Arg-1,
    - smanjenoj aktivnosti dušikova(II) oksida (NO).

2. Fenolne kiseline (GA, CA i TA) imaju imunostimulatorni, antiangiogeni i protutumorski učinak koji se temelji na:
    - izravnom toksičnom učinku na stanice EAT,
    - značajnom smanjenju broja tumorskih stanica i volumena ascitesa u peritonealnoj šupljini miševa nositelja EAT-a te povećanju životnog vijeka miševa,
    - indukciji apoptoze u stanicama tumora,
    - povećanoj funkcionalnoj aktivnosti makrofaga,
    - sprječavanju polarizacije M1 aktivnosti TAMs u M2 aktivnost TAMs,
    - povećavaju M1 tumorocidne aktivnosti TAMs,
    - smanjenoj razni Arg-1,

- povećanoj aktivnosti dušikova(II) oksida (NO) u peritonealnim makrofagima,
- povećanoj aktivnosti Th1 stanica i produkciji Th1 citokina,
- inhibiciji produkcije proangiogenih čimbenika: VEGF čimbenika, MMP-2 i MMP-9 u ascitesu, tumorskim stanicama i makrofagima ascitesa,
- inhibiciji COX-2 aktivnosti u tumorskim stanicama te LPS stimuliranim i nestimuliranim makrofagima ascitesa.

3. Fenolne kiseline (GA, CA i TA) povećavaju M1 tumorocidnu djelotvornost TAMs kroz mehanizme kako slijedi:
   - povećavaju razinu NO u peritonealnim makrofagima i makrofagima slezene,
   - inhibiraju aktivnost Arg-1 u peritonealnim makrofagima i makrofagima slezene,
   - povećavaju broj i funkcionalnu aktivnost makrofaga,
   - povećavaju razinu proupalnih Th1 citokina i smanjuju razinu protuupalnih Th2 citokina,
   - povećana razina IL-12 i IFN-γ ključna je za povećanje stanične imunosti važne za protutumorsku učinkovitost,
   - IFN-γ je ključan za pojačanu makrofagnu aktivnost, izražaj tkivnih antigena klase II i predočavanje tumorskih antigena te regulaciju i stimulaciju protutumorske aktivnosti T, B i NK stanica.

4. Antioksidativnu aktivnost i uspješnu kontrolu upalnog odgovora fenolnih kiselina (GA, CA, TA) na zdrava tkiva i organe temeljimo na:
   - smanjenju težine unutarnjih organa (bubrega, jetre i slezene),
   - povećanju broja i funkcionalne aktivnosti makrofaga kao i njihove uloge u regulaciji i održavanju homeostaze u organizmu,
   - smanjenju razine COX-2 u stimuliranim i nestimuliranim makrofagima ascitesa kao i u tumorskim stanicama,
   - povećanju ili prilagodbi tkiva i organa na vanjske antioksidanse i mikrookoliš putem regulacije GSH, SOD i CAT aktivnosti u bubregu, jetri i slezeni,

- smanjenju parametara alkalnog komet testa nakon obrade s GA i CA na leukocitima periferne krvi u miša nositelja EAT dok TA pokazuje pojačani genotoksični učinak na leukocitima periferne krvi.

5. Postoji izravna veza između antioksidativne aktivnosti GA i CA, angiogeneze, razine VEGF-a, MMPs, COX-2, razine ascitesa i broja stanica u trbušnoj šupljini. Navode temeljimo na dokazima da:
   - snižena razina VEGF-a vodi inhibiciji aktivnosti matriks metaloproteinaza i inhibiciji rasta krvožilja,
   - snižena razina VEGF-a je u skladu s redukcijom volumena ascitesa u peritonealnoj tekućini,
   - smanjeni volumen ascitesa izravno se podudara sa smanjenim brojem stanica u peritonealnoj tekućini; CA je polučila najbolji učinak u oba modela angiogeneze,
   - inhibicija COX-2 aktivnosti je usko povezana s inhibicijom rasta krvožilja; TA je primjer navedenog,
   - snižena razina MMP-2 i MMP-9 je u izravnom odnosu s razinom VEGF-a kod obrade miševa s GA i CA dok TA pokazuje odstupanja. Smatramo da TA zbog svoje polimerne strukture i prisutnosti velikog broja hidroksilnih i karboksilnih skupina stvara čvrste komplekse s različitim makromolekulama uključujući MMPs i regulatorne molekule MMPs.

6. GA i CA imaju prooksidativni učinak na stanice EAT tumora. Navode temeljimo na:
   - povećanoj razini lipidne peroksidacije u stanicama tumora nakon obrade s GA i CA,
   - povećanoj smrti stanica procesom apoptoze i brzog propadanja oštećenih stanica te njihove fagocitoze putem funkcionalno aktivnih makrofaga,
   - povećanoj razini SOD i CAT aktivnosti zbog povećane razine oksidacijskog stresa,
   - sniženoj razini GSH zbog gubitka i nedostatne sinteze GSH u oksido-redukcijskim procesima,

- TA pokazuje najjači genotoksični učinak na DNA tumorskih stanica iako MDA aktivnost nije promijenjena kod stanica tumora moguće je da se prooksidativni učinak TA odnosi na njegove metabolite kao što je GA i elagična kiselina,
- za jasnije oksido-redukcijske procese u stanicama tumora trebalo bi napraviti enzimski komet test koji pokazuje oksidaciju pirimidinskih i purinskih baza te ukupnu razinu ROS-a u stanicama tumora neposredno nakon obrade te u tijeku prva 24 sata. Heterogenost EAT stanica prisutnih u trbušnoj šupljini kao i nedostatnost odgovarajućih metoda doprinosi nejasnoći zaključaka o pro-/anti-oksidativnoj ulozi fenolnih sastavnica na EAT stanice.

7. Sumirajući navedene zaključke smatramo da fenolne kiseline mogu biti primijenjene u terapiji tumora i da se njihov biološki učinak temelji na višestrukim molekularnim ciljevima što zasigurno doprinosi boljoj protutumorskoj učinkovitosti. Djelotvornost fenolnih kiselina kao snažnih antioksidativnih spojeva, lako dostupnih i ekonomski isplativih mogla bi se iskoristiti u liječenju drugih kroničnih bolesti posljedično nastalih povećanom razinom ROS-a gdje MMPs, VEGF i pojačana angiogeneza mogu imati štetne posljedice, primjerice, dijabetička retinopatija, reumatoidni artritis, endometrioze, kronične opstruktivne bolesti pluća itd.

§ 7. LITERATURA

1. Adams DO, Hamilton TA (1984) The cell biology of macrophage activation, Annu Rev Immunol 2:283–318.
2. Aebi H (1984) Catalase in vitro, Methods Enzymol. 105:121–126.
3. Aggarwal BB, Shishodia S (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer, Biochem Pharmacol. 14:1397–1421.
4. Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M (2011) Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse, Food Chem Toxicol. 49(9):1924–34.
5. Ahmad A, Asad SF, Singh S, Hadi SM (2000) DNA breakage by resveratrol and Cu(II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation, Cancer Lett. 154:24–27.
6. Ahmad MS, Fazal F., Rahman A, Hadi SM, Parish, JH (1992) Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): correlation with the generation of active oxygen species, Carcinogenesis 13:605–608.
7. Ahsan H, Hadi SM (1998) Strand scission in DNA induced by curcumin in the presence of Cu(II), Cancer Lett. 124:23–30.
8. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE (1995) Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins, Proc Natl Acad Sci USA. 92(23):10457–61.
9. Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K (2001) Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus, J Antimicrob Chemother. 48:487–491.
10. Allavena P, Mantovani A (2012) Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment, Clin. Exp. Immunol. 167 (2):195–205.
11. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity, Nat Med. 1(10):1024–8.
12. Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Ćetković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Mihaljević S, Slade N,

Vujaklija D (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

13. Andrade RG, Dalvi LT, Silva JMC, Lopes GKB, Alonso A, Hermes-Lima M (2005) The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals, Arch Biochem Biophys. 437(1):1–9.
14. Andreis I, Lukinović-Škudar V (2010) Imunost na infekcije. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada, 270–287.
15. Andreotti C, Ravaglia D, Ragaini A (2008) Phenolic compounds in peach (Prunus persica) cultivars at harvest and during fruit maturation, Ann Appl Bio. 153:11–23.
16. Angelo LS, Kurzrock R (2007) Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators, Clin Cancer Res. 13:2825–2830.
17. Angiolilli AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis *in vivo*, J Exp Med. 182:155–62.
18. Arts ICW Hollman PCH (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, Am J Clin Nutr. 81:317S–25S.
19. Asano A, Morimatsu M, Nikami H, Yoshida T, Saito M (1997) Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis, Biochem. J. 328(Pt 1):179–183.
20. Athar M, Khan WA, Mukhtar H (1989) Effect of dietary tannic acid on epidermal, lung, and forestomach polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and tumorigenicity in Sencar mice, Cancer Res. 49(21):5784–8.
21. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells, Annu Rev Immunol. 27:669–92.
22. Auger MJ, Ross JA (1992) The biology of macrophage. U: Lewis CE, McGee JO, ur. The macrophage. Oxford: Oxford University Press. 2–74.
23. Azmi AS, Bhat SH, Hadi SM (2005) Resveratrol–Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: implications for anticancer properties, FEBS Lett. 579(14):3131–3135.
24. Baatout S, Derradji H (2004) Cytometric methods to analyze radiation effects, J. Biol. Regul. Homeost Agents 18(2):101–5.

25. Baay M, Brouwer A, Pauwels P, Peeters M, Lardon F (2011) Tumor cells and tumor associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy, Clin. Dev. Immunol. 2011:565187.
26. Bak SP, Alonso A, Turk MJ, Berwin B (2008) Murine ovarian cancer vascular leukocytes require arginase-1 activity for T cell suppression, Mol Immunol. 46(2):258–68.
27. Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network, Nat Rev Cancer 4(7):540–550.
28. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease, Cancer Cell. 7:211–7.
29. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow?, Lancet. 357:539–45.
30. Ban J, Osmak M (1996) Načela proliferacije tumora. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 37–55.
31. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ (1998) Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology, Br J Cancer. 77(6):956–64.
32. Barr MP, Byrne AM, Duffy AM, Condron CM, Devocelle M, Harriott P, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH (2005) A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF (165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells, Br J Cancer 92:328–33.
33. Bašić M, Malenica B, Eljuga D (1996) Biologija metastaziranja tumora. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 99–124.
34. Bautz F, Rafii S, Kanz L, Möhle R (2000) Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells. Possible role in the hematopoietic microenvironment, Exp Hematol. 28(6):700–6.
35. Beissert S, Hosoi J, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD (1995) IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells, J Immunol. 154(3):1280–6.
36. Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Giavazzi R (2003) Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular

endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation, Cancer Res. 63(17):5224–9.

37. Benkovic V, Orsolic N, Horvat Knezevic A, Ramić S, Đikic D, Basic I, Kopjar N (2008), Evaluation of radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: the alkaline comet assay study, Biol. Pharm. Bull. 31:167–172.
38. Benlloch M, Ortega A, Ferrer P, Segarra R, Obrador E, Asensi M, Carretero J, Estrela JM (2005) Acceleration of glutathione efflux and inhibition of γ-glutamyltranspeptidase sensitiza metastatic B16 melanoma cells to endothelium induced cytotoxicity, J. Biol. Chem. 280(8):6950–6959.
39. Berend S, Grabarić Z (2008) Determination of total polyphenol content in food with the flow-injection method, Arh. Hig. Rada. Toksikol. 59(3):205–212.
40. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis, Nat Cell Biol. 2(10):737–44.
41. Bhat SH, Azmi AS, Hadi SM (2007) Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties, Toxicol Appl Pharmacol. 218(3):249–55.
42. Bhatia M, Karlenius TC, Di Trapani G, Tonissen KF (2013) The Interaction Between Redox and Hypoxic Signalling Pathways in the Dynamic Oxygen Environment of Cancer Cells, U: Carcinogenesis, Tonissen K, ur., In Tech, 124–152.
43. Bhatti SK, O'Keefe JH, Lavie CJ (2013) Coffee and tea: perks for health and longevity?, Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 16(6):688–97.
44. Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, Schumacher KR, Feng Z, Porter AG, Castle VP, Opipari AW Jr. (2001) NF-κB activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells, J. Biol. Chem. 276(52):48921–48929.
45. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002) The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies, J Pathol 196:254–65.
46. Bir SC, Kolluru GK, Fang K, Kevil CG (2012) Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling, Semin Cell Dev Biol. 23(7):745–757.

47. Biroccio A, Benassi B, Filomeni G, Amodei S, Marchini S, Chiorino G, Rotilio G, Zupi G, Ciriolo MR (2002) Glutathione influences c-Myc-induced apoptosis in M14 human melanoma cells, J. Biol. Chem. 277(46):43763–43770.
48. Blasco AJ, Rogerio MC, González MC, Escarpa A (2005) "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal, Anal Chim Acta. 539:237–44.
49. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance, Nature. 390:404–7.
50. Bombail V, Aw D, Gordon E, Batty J (2001) Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. Chemosphere. 44(3):383–92.
51. Botting R (2003) COX-1 and COX-3 inhibitors, Thromb. Res. 110(5-6):269–72.
52. Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: A physiologic messenger molecule, Annu. Rev. Biochem. 63:175–95.
53. Breier G (2000) Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system, Semin Thromb Hemost. 26:553–559.
54. Brigati C, Noonan DM, Albini A, Libby A, Benelli R (2002) Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?, Clin Exp Metastasis 19:247–58.
55. Brooks PC1, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3, Cell. 85(5):683–93.
56. Burnet FM (1971) Immunological surveillance in neoplasia, Transplant Rev. 7:3–25.
57. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH (2005) Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF), J Cell Mol Med. 9(4):777–94.
58. Cao DW, Li XQ, Wang X, Li T, Chen X, Liu SB, Meia QB (2010) Characterizations and anti-tumor activities of three acidic polysaccharides from Angelica sinensis (Oliv.), Int. J. Biol. Macromol. 46:115–122.
59. Cao Q, Lin Z, (2004) Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide, Acta Pharmacol Sin. 25(6):833–838.
60. Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease, Nat. Med. 9:653–660.

61. Carmeliet P, Collen D (1999) Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development, Curr Top Microbiol Immunol. 237:133-58.
62. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases, Nature. 407:249–57.
63. Carvalho JF, Blank M, Shoenfeld Y (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases, J Clin Immunol. 27:246–56.
64. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A (2003) Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells, Proc Natl Acad Sci USA. 100(7):4120–5.
65. Cerda B, Espin JC, Parra S, Martinez P, Tomas-Barberan FA (2004) The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans, Eur J Nutr. 43:205–220.
66. Cerutti PA (1994) Oxy-radicals and cancer, Lancet. 344:862–863.
67. Chang CI, Liao JC, Kuo L (2001) Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity, Cancer Res. 61(3):1100–6.
68. Chen CH, Lin WC, Kuo CN, Lu FJ (2011) Role of redox signaling regulation in propyl gallate-induced apoptosis of human leukemia cells, Food Chem. Toxicol. 49:494–501.
69. Chen CH, Liu TZ, Chen CH, Wong CH, Chen CH, Lu FJ, Chen SC (2007) The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells, Mol Nutr Food Res. 518:962–968.
70. Chen G, Perchellet EM, Gao XM, Newell SW, Hemingway RW, Bottari V, Perchellet JP (1995) Ability of m-chloroloperoxybenzoic acid to induce the ornithine decarboxylase marker of skin tumor promotion and inhibition of this response by gallotannins, oligomeric proanthocyanidins and their monomeric units in mouse epidermis in vivo, Anticancer Res. 15(4):1183–9.

71. Chen HM, Wu YC, Chia YC, Chang FR, Hsu HK, Hsieh YC, Chen CC, Yuan SS (2009) Gallic acid, a major component of Toona sinensis leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells, Cancer Lett. 286(2):161–71.
72. Chen L, Watkins JF (1970) Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells, Nature. 225:734–735.
73. Chen SC, Chung KT (2000) Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds, Food Chem Toxicol. 38(1):1–5.
74. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebti SM (2000) Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice, J. Biol. Chem. 275:17974–17978.
75. Cheng XW, Kuzuya M, Kanda S, Maeda K, Sasaki T, Wang QL, Tamaya-Mori N, Shibata T, Iguchi A (2003) Epigallocatechin-3-gallate binding to MMP-2 inhibits gelatinolytic activity without influencing the attachment to extracellular matrix proteins but enhances MMP-2 binding to TIMP-2, Arch Biochem Biophys 415:126–132.
76. Chi A, Norden AD, Wen PY (2007) Inhibition of angiogenesis and invasion in malignant gliomas, Expert Rev Anticancer Ther. 7(11):1537–60.
77. Chien MH, Ying TH, Hsieh YS, Chang YC, Yeh CM, Ko JL, Lee WS, Chang JH, Yang SF (2012) Dioscorea nipponica Makino inhibits migration and invasion of human oral cancer HSC-3 cells by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase-2 through modulation of CREB and AP-1 activity, Food Chem. Toxicol. 50(3-4):558–66.
78. Choudhury SM, Roy G, Gupta M, Majumder UK (2008) The central nervous system depressant activities of Mycotoxin MT81 and its acetylated and benzoylated analogues, Al Ameen J. Med. Sci. 1:104–114.
79. Chu X, Wang H, Jiang YM, Zhang YY, Bao YF, Zhang X, Zhang JP, Guo H, Yang F, Luan YC, Dong YS (2016) Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in vivo and in vitro, J Pharmacol Sci. 130(1):15–23.
80. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH (1998) Upregulation of vascular endothelial growth factor by H2O2 in rat heart endothelial cells. Free Radic Biol Med. 25(8):891–897.

81. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y (1998a) Tannins and human health: a review, Crit Rev Food Sci Nutr. 38(6):421–64.
82. Chung TW, Kim SJ, Choi HJ, Kwak CH, Song KH, Suh SJ, Kim KJ, Ha KT, Park YG, Chang YC, Chang HW, Lee YC, Kim CH (2013) CAPE suppresses VEGFR-2 activation, and tumor neovascularization and growth, J Mol Med (Berl). 91(2):271–82.
83. Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim CH (2004) Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism, FASEB J 18:1670–1681.
84. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI (1993) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolaktin is a potent inhibitor of angiogenesis, Endocrinology 133:1292–9.
85. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE (2009) Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression, Biochim Biophys Acta. 1796(1):11–8.
86. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T (2002) Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR, J Biol Chem. 277(5):3101–3108.
87. Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, Mol. Biotechnol. 26(3):249–61.
88. Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štětina R (1997) The comet assay: what can it really tell us?, Mutation Res. 375:183–193.
89. Condeelis J, Pollard JW (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis, Cell. 124(2):263–6.
90. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod, J. Immunol. Methods. 174 231–235.
91. Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Røsjø E, Omholt H, Hofgaard PO, Haraldsen G, Bogen B (2005) Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells, Immunity 22:371–383.
92. Coso S, Harrison I, Harrison CB, Vinh A, Sobey CG, Drummond GR, Williams ED, Selemidis S (2012) NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis:current and emerging concepts, Antioxid Redox Signal. 16(11):1229–1247.

93. Costa C, Incio J, Soares R (2007) Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence?, Angiogenesis. 10(3):149–166.
94. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations, Science. 295(5564):2387–92.
95. Coussens LM,Werb Z (2002) Inflammation and cancer, Nature 420:860–7.
96. Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, Science. 262:689–695.
97. D'Angelo S, Morana A, Salvatore A, Zappia V, Galletti P (2009) Protective effect of polyphenols from Glycyrrhiza glabra against oxidative stress in Caco-2 cells, J. Med. Food. 12:1326–1333..
98. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies, Int J Mol Sci. 11:1321–1342.
99. Da Silva SL, Chaar Jda S, Yano T (2009) Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of Casearia sylvestris Sw (Flacourtiaceae), Eur J Pharmacol. 608(1-3):76–83.
100. Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, Ratcliffe PJ, Townsend KM, Stratford IJ, Harris AL (1997) Targeting gene expression to hypoxic tumor cells, Nat Med. 3(5):515–20.
101. Dai J, Rabie AB (2007) VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification, J Dent Res. 86:937–950.
102. Dawson TM, Dawson VL (1995) Nitric oxide: Actions and pathological roles, The Neuroscientist. 1:7–18.
103. de Cordova CA, Locatelli C, Assunção LS, Mattei B, Mascarello A, Winter E, Nunes RJ, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB (2011) Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line, Toxicol In Vitro. 25:2025–2034.
104. Dedić Plavetić N, Letilović T, Vrbanec D (2003) Uloga angiogeneze u rastu i progresiji tumora, Liječ. Vjesn. 125:260–265.
105. de Kok TM, van Breda SG, Manson MM (2008) Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review, Eur J Nutr. 47:51–59.
106. Demeron KM, Volpert OV, Tainsley MA, Bouck N (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of trombospondin D, Science. 265:1582–4.

107. Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R (2000) Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins, Biochim Biophys Acta. 1478:51–60.

108. Denekamp J (1993) Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy, Br J Radiol. 66:181–96.

109. deVisser KE, Eichten A, Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development, Nat Rev Cancer 6:24–37.

110. Dias S, Boyd R, Balkwill F (1998) IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model, Int J Cancer. 78:361–5.

111. Dias S, Hattori K, Heissig B, Zhu Z, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, Tateno M, Bohlen P, Moore MA, Rafii S (2001) Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce longterm remission of xenotransplanted human leukemias, Proc Natl Acad Sci USA. 98:10857–62.

112. Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane, W, Wu Y, Chadburn A, Hyjek E, Gill M, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S (2000) Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration, J Clin Invest. 106:511–21.

113. Diaz BV, Lenoir MC, Ladoux A, Frelin C, Demarchez M, Michel S (2000) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids, J Biol Chem. 275:642–650.

114. Dodo K, Minato T, Noguchi-Yachide T, Suganuma M, Hashimoto Y (2008) Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate, Bioorg Med Chem. 16(17):7975–82.

115. Dong Z, Kumar R, Zang X, Fidler IJ (1997) Macrophage-derived metalloelastaze is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma, Cell. 88:801–10.

116. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis, Am J Pathol 146:1029–39.

117. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of

microvascular hyperpermeability in angiogenesis, Curr Top Microbiol Immunol. 237:97–132.

118. Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, Nat. Rev. Cancer 2:161–174.
119. Ehrlich P (1909) Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung, Ned. Tijdschr. Geneeskd. 5:273–290.
120. Elli L, Bergamini CM, Bardella MT, Schuppan D (2009) Transglutaminases in inflammation and fibrosis of the gastrointestinal tract and the liver, Dig Liver Dis.41:541–550.
121. Ellis LM (2002) Tumor angiogenesis: Meniscus Educational Institute; 1532–3048, U: Horizons in cancer therapeutics 3:4–22.
122. Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, Jung DY, Shaheen RM, Reinmuth N (2001) Biologic implications of antiangiogenic therapy, Semin Oncol 28:94–104.
123. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S (2015) The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis, Angiogenesis. 18(4):433–48.
124. Erez A (2013) Argininosuccinic aciduria: from a monogenic to a complex disorder, Genet. Med. 15:251–257.
125. Fairweather D, Cihakova D (2009) Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity, J Autoimmun. 33(3-4):222–30.
126. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C (2010) Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models, Biochim Biophys Acta. 1803(1):3–19.
127. Faried A, Kurnia D, Faried LS, Usman N, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H (2007) Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines, Int J Oncol. 30:605–613.
128. Fazary AE, M Taha, YH Ju (2009) Iron complexation studies of gallic acid, J. Chem. Eng. Data 54:35–42.
129. Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S (1990) Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity, Inflammation 14:125–132.

130. Fenech M (1993a) The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations, Environ Health Perspect. 101 (Suppl. 3): 101–7.

131. Fenech M (1993b) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, Mutat. Res. 285(1):35–44.

132. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003) Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutat. Res. 534(1-2):65–75.

133. Ferguson LR (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability, Mutat Res. 475(1-2):89–111.

134. Ferk F, Chakraborty A, Jäger W, Kundi M, Bichler J, Mišík M, Wagner KH, Grasl-Kraupp B, Sagmeister S, Haidinger G, Hoelzl C, Nersesyan A, Dušinská M, Simić T, Knasmüller S (2011) Potent protection of gallic acid against DNA oxidation: results of human and animal experiments, Mutat Res. 715(1-2):61–71.

135. Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, Endocr. Rev. 25:581–611.

136. Ferrara N (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects, Curr Top Microbiol Immunol. 237:1–30.

137. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis, Nat Med. 4(3):336–40.

138. Fiddler RM (1977) Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products, J. AOAC. 60:594–599.

139. Fingleton B (2007) Matrix metalloproteinases as valid clinical targets, Curr Pharm Des. 13:333–346.

140. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girão da Cruz MT, Cordeiro MND, Milhazes N, Borges F, Marques MP (2004) Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure–activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids, Bioorg. Med. Chem. 12:3581–3589.

141. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P (2010) The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta, Nat Rev Immunol. 10(8):554–67.

142. Flohé L, Ötting F (1971) Superoxide dismutase assays, Methods Enzymol. 105:70–76.

143. Folkman J (1995) Clinical applications of research on angiogenesis, N Engl J Med 333:1757–63.

144. Folkman J (1995) Tumor angiogenesis. U: Mendelson J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, ur. The molecular basis of cancer, Philadelphia: WB Saunders; 206–32.

145. Folkman J (2001) Angiogenesis. Braunwald E, Hauser SL, Fauci AS, Longo DL, Kasper DL, Jameson LJ, ur. Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill. 517–30.

146. Folkman J (2006) Angiogenesis, Annu Rev Med 57:1–18.

147. Folkman J (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?, Nat Rev Drug Discov 6:273–86.

148. Folkman J, Shing Y (1992) Angiogenesis, J. Biol. Chem. 267:10931–10934.

149. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanakan D (1989) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia, Nature. 339:58–61.

150. Folkman J (2001) Angiogenesis-dependent diseases, Semin. Oncol. 28:536–542.

151. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G (1999) SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types, Cancer Res. 59:99–106.

152. Fontanella C, Ongaro E, Bolzonello S, Guardascione M, Fasola G, Aprile G (2014) Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors, Ann Transl Med. 2(12):123. 1–10.

153. Fortini P, Raspaglio G, Falchi M, Dogliotti E (1996) Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay, Mutagenesis 11(2):169–175.

154. Freedman JE, Parker C 3rd, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD, Folts JD (2001) Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release, Circulation. 103:2792–8.

155. Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, Eck MJ (2002) Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha, Proc Natl Acad Sci USA. 99(8):5367–72.

156. Friesel R, Komoriya A, Maciag T (1987) Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon, J Cell Biol 104:689–96.

157. Fritz G, Kaina B (2006) Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs, Curr. Cancer Drug Targets 6:1–14.

158. Fučić A, Mijić A (1999) In vitro and in vivo micronucleus tests in genotoxicological research, Arh hig rada toksikol. 50(3):299–306.

159. Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases, Antioxid Redox Signal. 15(6):1583–1606.

160. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, Hammond E, Seaman J, Holden J, Lee RJ, Zempolich K, Dodson M (2003) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 56(4):922–8.

161. Gali HU, Perchellet EM, Jea Perchellet JP (1991) Inhibition of Tumor Promoter-induced Ornithine Decarboxylase Activity by Tannic Acid and Other Polyphenols in Mouse Epidermis in Vivo, Cancer Res. 51:2820–2825.

162. Gali HU, Perchellet EM, Klish DS, Johnson JM, Perchellet JP (1992) Hydrolysable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, Int. J. Cancer. 51:425–432.

163. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, Ziche M (1998) Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer, J Natl Cancer Inst 90:587–96.

164. García-Rivera D, Delgado R, Bougarne N, Haegeman G, Berghe WV (2011) Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of Mangifera indica L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells, Cancer Lett. 305(1):21–31.

165. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione, J. Biol. Chem. 272:11369–11377.

166. Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T (1997) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma, J Natl Cancer Inst. 89(2):139–47.

167. Gately S, Twardowski P, Stack MS, Patrick M, Boggio L, Cundiff DL, Schnaper HW, Madison L, Volpert O, Bouck N, Enghild J, Kwaan HC, Soff GA (1996) Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. Cancer Res. 56:4887–90.

168. Gaudry M, Brégerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocidalo MA, Hakim J (1997) Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils, Blood. 90(10):4153-61.

169. Genaro-Mattos TC, Maurício ÂQ, Rettori D, Alonso A, Hermes-Lima M (2015) Antioxidant activity of caffeic acid against iron-induced free radical generation-A chemical approach, PLoS One 10 e0129963.

170. Gerald D, Berra E, Frapart Y M, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouysségur J, Yaniv M, Mechta Grigoriou F (2004) JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress, Cell. 118(17):781–794.

171. Giaccia AJ (1996) Hypoxic stress proteins: survival of the Fit test, Semin Radiat Oncol. 6:46–58.

172. Giavazzi R, Garofalo A, Ferri C, Lucchini V, Bone EA, Chiari S, Brown PD, Nicoletti MI, Taraboletti G (1998) Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarian carcinoma xenografts, Clin Cancer Res. 4(4):985–92.

173. Giraudo E, Inoue M, Hanahan D (2004) An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis, J Clin Invest. 114(5):623–33.

174. Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A, Fanti P, Rossi R (2013) Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide, Nat Protoc. 8(9):1660–9.

175. GLOBOCAN (2008) online http://globocan.iarc.fr pristupljeno 23. 12. 2010.
176. Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Patterson C (1996) Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblastlike cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I, Endocrinology. 137:2262–2268.
177. Gomis-Rüth FX (2009) Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases, J. Biol. Chem, 284(23):15353–7.
178. Gordaliza M (2007) Natural products as leads to anticancer drugs, Clin Transl Oncol. 9(12):767–76.
179. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages, Nat. Rev. Immunol. 3:23–35.
180. Griess P (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen, Chem. Ber. 12:426–428.
181. Griffioen AW, Molema G (2000) Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation, Pharmacol Rev 52:237–268.
182. Grisolia CK, Starling FL (2001) Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges, Mutat. Res. 491(1-2):39–44.
183. Grothey A, Galanis E (2009) Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules, Nat. Rev. Clin. Oncol. 6:507–518.
184. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3alpha. Gene Expr. 7:205–213.
185. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K (2010) Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products, Free Radic Res. 44(10):1098–1124.
186. Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY (2010) Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid, Arab. J. Chem. 3:43–53.
187. Guo D, Dou D, Ge L, Huang Z, Wang L, Gu N (2015) A caffeic acid mediated facile synthesis of silver nanoparticles with powerful anti-cancer activity, Colloids Surf. B Biointerfaces 134:229–234.

188. Gupta M, Mazumder UK, Kumar RS, Kumar TS (2004) Antitumor activity and antioxidant role of Bauhinia racemosa against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice, Acta Pharmacol. Sin. 25:1070–1076.

189. Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A (2000) Putative mechanism for anticancer and apoptosis inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds, IUBMB Life. 50:1–5.

190. Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, Plüddemann A, Charles K, Gordon S, Balkwill FR (2006) Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype, J Immunol. 176(8):5023–32.

191. Han YH, Park WH (2009) Propyl gallate inhibits the growth of HeLa cells via regulating intracellular GSH level, Food and Chemical Toxicology 47:2531–2538.

192. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N, Nomura Y (2000) Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer, Int J Urol. 7(7):263–9.

193. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM (2012) Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors, Clin Dev Immunol. 2012:948098.

194. Harmey (2004) VEGF and cancer, Georgetown, Tex: Landes Bioscience/Eurekah.com New York, N.Y. Kluwer Academic/Plenum Publishers. ISBN 0-306-47988-5.

195. Harris AL (2002) Hypoxia? a key regulatory factor in tumour growth, Nat Rev Cancer. 2:38–47.

196. Harrison L, Blackwell K (2004) Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy?, Oncologist 9:31–40.

197. He Z, Chen AY, Rojanasakul Y, Rankin GO, Chen YC (2016) Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1α/VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells, Oncol Rep. 35(1):291–7.

198. He Z, Li B, Rankin GO, Rojanasakul Y, Chen YC (2015) Selecting bioactive phenolic compounds as potential agents to inhibit proliferation and VEGF expression in human ovarian cancer cells, Oncol Lett. 9(3):1444–1450.

199. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery, Nat. Rev. Drug Discov. 4:988–1004.

200. Hirose M, Ozaki K, Takaba K, Fukushima S, Shirai T, Ito N (1991) Modifying effects of the naturally occurring antioxidants gamma-oryzanol, phytic acid, tannic acid and n-tritriacontane-16, 18-dione in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model, Carcinogenesis 12 :1917–1921.

201. Hirose M, Takesada Y, Tanaka H, Tamano S, Kato T, Shirai T (1997) Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model, Carcinogenesis 19(1):207-212.

202. Ho CC, Lin SY, Yang JS, Liu KC, Tang YJ, Yang MD, Chiang JH, Lu CC, Wu CL, Chiu TH, Chung JG (2009) Gallic acid inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes macrophage phagocytosis, In Vivo. 23(3):409–13.

203. Ho HH, Chang CS, Ho WC, Liao SY, Lin WL, Wang CJ (2013) Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-κB activity, Toxicol Appl Pharmacol. 266(1):76–85.

204. Ho HH, Chang CS, Ho WC, Liao SY, Wu CH, Wang CJ (2010) Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-kappaB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals, Food Chem Toxicol. 48(8-9):2508–16.

205. Högger P, Dreier J, Droste A, Buck F, Sorg C (1998) Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163), J Immunol.161(4):1883–90.

206. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995) Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression, Nature Med 1:149–53.

207. Horikawa K, Mohri T, Tanaka Y, Tokiwa H (1994) Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene, 1,6-dinitropyrene and 3,9-dinitrofluoranthene by Chinese medicinal herbs, Mutagenesis. 9(6):523–6.

208. Hseu YC, Chang WH, Chen CS, Liao JW, Huang CJ, Lu FJ, Chia YC, Hsu HK, Wu JJ, Yang HL (2008) Antioxidant activities of Toona Sinensis leaves extracts using different antioxidant models, Food Chem. Toxicol. 46:105–114.

209. Hsiang CY, Hseu YC, Chang YC, Kumar KJ, Ho TY, Yang HL (2013) Toona sinensis and its major bioactive compound gallic acid inhibit LPS-induced inflammation in nuclear factor-κB transgenic mice as evaluated by in vivo bioluminescence imaging, Food Chem. 136(2):426–34.

210. Hsu CL, Lo WH, Yen GC (2007) Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes via a Fas- and mitochondrial-mediated pathway, J.Agric. Food Chem. 55:7359–7365.

211. Hsu CL, Yen GC (2007) Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats, Br J Nutr. 3:1–9.

212. Hu WP, Yu HS, Sung PJ, Tsai FY, Shen YK, Chang LS, Wang JJ (2007) DC-81-Indole conjugate agent induces mitochondria mediated apoptosis in human melanoma A375 cells, Chem Res Toxicol. 20(6):905–12.

213. Huang S, Van Arsdall M, Tedjarati S, McCarty M, Wu W, Langley R, Fidler IJ (2002) Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice, J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 94:1134–1142.

214. Hudson EA, Dinh PA, Kokubun T, Simmonds MS, Gescher A (2000) Characterization of potentially chemopreventive phenols in Extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells, Cancer Epidemiol Biomark Prev. 9:1163–70.

215. Inoue M, Sakaguchi N, Isuzugawa K, Tani H, Ogihara Y (2000) Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis, Biol Pharm Bull. 23(10):1153–7.

216. Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y, Yabu Y (1994) Antioxidant, gallic acid induces apoptosis in HL 60 R cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:898–904.

217. Inoue M, Suzuki R, Sakaguchi N, Li Z, Takeda T, Ogihara Y, Jiang BY, Chen YJ (1995) Selective induction of cell-death in cancer-cells by gallic acid, Biol. Pharm. Bull. 18:1526–1530.

218. Irwin JC, Kirk D, Gwatkin RBL, Navre M, Cannon P, Giudice LC (1996) Mouse endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase: hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle, J. Clin. Invest. 97:438–447.

219. Isenburg JC, Karamchandani NV, Simionescu DT, Vyavahare NR (2006) Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins, Biomaterials. 27(19):3645–51.

220. Isenburg JC, Simionescu DT, Starcher BC, Vyavahare NR (2007) Elastin stabilization for treatment of abdominal aortic aneurysms, Circulation. 115(13):1729–37.

221. Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR (2005) Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall, Biomaterials. 26(11):1237–45.

222. Isuzugawa K, Inoue M, Ogihara Y (2001) Ca^{2+}-dependent caspase activation by gallic acid derivatives, Biol. Pharm. Bull. 24:844–847.

223. Jacobi H, Hinrichsen ML, Wess D, Witte I (1999) Induction of lipid peroxidation in human fibroblasts by the antioxidant propyl gallate in combination with copper(II), Toxicol. Lett. 110:183–190.

224. Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. Nat. Med. 9:685–693.

225. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N (1992) Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues, J Clin Invest. 89(1):244–53.

226. Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P (2007) Protective effect of an extract of the oyster mushroom, Pleurotus ostreatus. On antioxidants of major organs of aged rats, Exp. Gerontol. 42:183–191.

227. Jayanthi R, Subash P (2010) Antioxidant effect of caffeic acid on oxytetracycline induced lipid peroxidation in albino rats, Indian J. Clin. Biochem. 25:371–375.

228. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH,Gassmann M (2001) Induction of HIF-1α in response to hypoxia is instantaneous, *FASEB J* 15:1312–4.

229. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, Thompson SK, Zollo M, Spano D, Dhawan P, Sliva D, Subbarayan PR, Sarkar M, Honoki K, Fujii H, Georgakilas AG, Amedei A, Niccolai E, Amin A, Ashraf SS, Ye L, Helferich WG, Yang X, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Azmi AS, Keith WN, Bilsland A, Bhakta D, Halicka D, Nowsheen S, Pantano F, Santini D (2015) Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives, Semin Cancer Biol. 35 Suppl:S244–S275.

230. Jimenez F, Mitts TF, Liu K, Wang Y, Hinek A (2006) Ellagic and tannic acids protect newly synthesized elastic fibers from premature enzymatic degradation in dermal fibroblast cultures, J Invest Dermatol. 126(6):1272–80.

231. Jingjing L, Xue Y, Agarwal N, Roque RS (1999) Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40:752–759.

232. Johnson AA, Marchand C, Pommery Y (2010) HIV-1 integrase inhibitors a decade of research and two drugs in clinical trial, Curr Top Med Chem. 4:1059–77.

233. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G (2005) Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds, Am J Clin Nutr 81:313S–6S.

234. Jukić S, Jukić D, Nola M, (2002) Neoplazme (novotvorine). U: Jukić S, Damjanov I, ur. Opća patologija, Zagreb: Medicinska naklada, 129–161.

235. Jung JE, Kim HS, Lee CS, Park DH, Kim YN, Lee MJ, Lee JW, Park JW, Kim MS, Ye SK, Chung MH (2007) Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells, Carcinogenesis. 28(8):1780–7.

236. Juretić A (2000) Metastaziranje i angiogeneza. U: Šamija M i suradnici, ur. Onkologija. Zagreb: Medicinska naklada, 41–45.

237. Kagawa TF, Geierstanger BH, Wang AHJ, Ho PS (1991) Covalent modification of guanine bases in double stranded DNA: the 1:2-AZ-DNA structure of dc(cacacg) in the presence of CuCl2, J. Biol. Chem. 266:20175–20184.

238. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway, J Biol Chem. 274(10):6519–25.

239. Kang MS, Oh JS, Kang IC, Hong SJ, Choi CH (2008) Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria, J Microbiol. 46:744–750.

240. Kang NJ, Lee KW, Shin BJ, Jung SK, Hwang MK, Bode AM, Heo YS, Lee HJ, Dong Z (2009) Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression, Carcinogenesis 30:321–330.

241. Kanimozhi G, Prasad NR (2015) Anticancer Effect of Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells, Coffee in Health and Disease Prevention. Academic Press. 73: 655–661.

242. Kashiwada Y, Nishizawa M, Yamagishi T, Tanaka T, Nonaka G, Cosentino LM, Snider JV, Lee K (1995) Anti-HIV agents, 18. Sodium and potassium salts of caffeic acid tetramers from Arnebia euchroma as anti-HIV agents, J. Nat. Prod. 58:392–400.

243. Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I, Lee KJ, Bori I, Fukushima Y, Bastow KF, Lee KH (1993) Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II in vitro, J Pharm Sci. 82(5):487–92.

244. Katiyar SK (2006) Matrix metalloproteinases in cancer metastasis: molecular targets for prostate cancer prevention by green tea polyphenols and grape seed proanthocyanidins, Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 6:17–24.

245. Kaur M, Velmurugan B, Rajamanickam S, Agarwal R, Agarwal C (2009) Gallic Acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice, Pharm Res. 26(9):2133–2140.

246. Kawada M, Ohno Y, Ri Y, Ikoma T, Yuugetu H, Asai T, Watanabe M, Yasuda N, Akao S, Takemura G, Minatoguchi S, Gotoh K, Fujiwara H, Fukuda K (2001) Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice, Anticancer Drugs 12:847–852.

247. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS (1998) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis, Cancer Res 58:409–412.

248. Kerbel R, Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors, Nat Rev Cancer 2:727–39.

249. Khan NS, Ahmad A, Hadi SM (2000) Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA, Chem Biol Interact. 125(3):177–89.

250. Khan NS, Hadi SM (1998) Structural features of tannic acid important for DNA degradation in the presence of Cu(II), Mutagenesis 13:271–274.

251. Khan WA, Wang ZY, Athar M, Bickers DR, Mukhtar H (1988) Inhibition of the skin tumorigenicity of (+/_)-7-beta, 8-alpha-dihydroxy-3-alpha, 10-alpha-epoxy-

7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene by tannic acid, green tea polyphenols and quercetin in Sencar mice, Cancer Lett. 42:7–12.

252. Kheradmand F, Werb Z (2002) Shedding light on sheddases: role in growth and development, BioEssays 24:8–12.
253. Kim BC, Kim HG, Lee SA, Lim S, Park EH, Kim SJ, Lim CJ (2005) Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway, Biochem. Pharmacol. 70:1398–1407.
254. Kim KJ, Li B, Winer J (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo, Nature. 362:841–844.
255. Kim SH, Jun CD, Suk K, Choi BJ, Lim H, Park S, Lee SH, Shin HY, Kim DK, Shin TY (2006) Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine productionin mast cells, Toxicol Sci. 91:123–131.
256. Kim YJ (2007) Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid, Biol Pharm Bull. 30:1052–1055.
257. King A, Young G (1999) Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, J Am Diet Assoc 99:213–8.
258. Kiselev SM, Lutsenko SV, Severin SE, Severin ES (2003) Tumor angiogenesis inhibitors, Biochem. (Mos) 68:497–513.
259. Klein E, Weber NJ (2001) In vitro test for the effectiveness of antioxidants as inhibitors of thiyl radical-induced reactions with unsaturated fatty acids, J. Agric. Food Chem. 49:1224–1227.
260. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis, Cancer Chemother. Pharmacol. 43:S42–S51.
261. Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N (1994) Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis, J Immunol. 152(8):4149–56.
262. Koide N, Nishio A, Sato T, Sugiyama A, Miyagawa S (2004) Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus, Am J Gastroenterol. 99(9):1667–74.

263. Kong X, Hu Y, Rui R, Wang D, Li X (2004) Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken, Int. Immunopharmacol. 4:975–982.

264. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papatsoris AG, Papavassiliou AG (2008) Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents, Int J Biochem Cell Biol. 40(6-7):1156–68.

265. Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I (2002) Assesment of chemotherapyinduced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer pateints using the alkaline comet assay, Teratog Carcinog Mutagen. 22(1):13–30.

266. Kracht M, Saklatvala J (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation, Cytokine 20(3): 91–106.

267. Kratz JM, Andrighetti-Frohner CR, Leal PC, Nunes RJ, Yunes RA, Trybala E, Bergstorm T, Barardi CR, Simoes CM (2008) Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate, Biol Pharm Bull. 31:903–907.

268. Krecicki T, Zalesska-Krecicka M, Jelen M, Szkudlarek T, Horobiowska M (2001) Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer, Clin Otolaryngol Allied Sci. 26(6):469–72.

269. Krishna G, Hayashi M (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, Mutat. Res. 455:155–166.

270. Kuo PL, Chen CY, Hsu YL (2007) Isoobtusilactone A induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling pathway in human breast cancer cells, Cancer Res. 67:7406–7420.

271. Kurte M, López M, Aguirre A, Escobar A, Aguillón JC, Charo J, Larsen CG, Kiessling R, Salazar-Onfray F (2004) A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells, J Immunol. 173(3):1731–7.

272. Kzhyshkowska J, Mamidi S, Gratchev A, Kremmer E, Schmuttermaier C, Krusell L, Haus G, Utikal J, Schledzewski K, Scholtze J, Goerdt S (2006) Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway, Blood.107(8):3221–8.

273. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA (2006) Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis, J Leukoc Biol. 80(4):705–13.

274. Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS (2005) Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations, Am J Clin Nutr 81: 284S–91S.

275. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, and Charles ST (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro, Microvasc Res 55:29–42.

276. Lamszus K, Brockmann MA, Eckerich C, Bohlen P, May C, Mangold U, Fillbrandt R, Westphal M (2005) Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin, Clin Cancer Res. 11(13):4934–40.

277. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch, Science 295:858–61.

278. Lang R, Dieminger N, Beusch A, Lee YM, Dunkel A, Suess B, Skurk T, Wahl A, Hauner H, Hofmann T (2013) Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption, Anal Bioanal Chem. 405(26):8487–503.

279. Lee RF, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, Mutat Res. 544(1):43–64.

280. Lee SH, Kim JK, Kim DW, Hwang HS, Eum WS, Park J, Han KH, Oh JS, Choi SY (2013) Antitumor activity of methyl gallate by inhibition of focal adhesion formation and Akt phosphorylation in glioma cells, Biochim. Biophys. Acta. 1830(8):4017–29.

281. Lepique AP, Daghastanli KR, Cuccovia IM, Villa LL (2009) HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses, Clin Cancer Res. 15(13):4391–400.

282. Lešin J, Zlopaša G, Plavec A, Aleksandrova Stanojević A, Vujić G (2008) Angiogeneza u malignih tumora, Medicus. 17 (1):143–148.

283. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP (1998) Hypoxic stabilizationof vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR, J Biol Chem. 273:6417–23.

284. Lewis CE, Pollard JW (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments, Cancer Res. 66(2):605–12.

285. Li GX, Hu H, Jiang C, Schuster T, Lu J (2007) Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells, Int. J. Cancer 120:2034–2043.

286. Li T, Zhang X, Zhao X (2010) Powerful protective effects of gallic acid and tea polyphenols on human hepatocytes injury induced by hydrogen peroxide or carbon tetrachloride in vitro, J. Med. Plant Res. 4:247–254;

287. Liang CZ, Zhang X, Li H, Tao YQ, Tao LJ, Yang ZR, Zhou XP, Shi ZL, Tao HM (2012) Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways, Cancer Biother Radiopharm. 27(10):701–10.

288. Liao CL, Lai KC, Huang AC, Yang JS, Lin JJ, Wu SH, Gibson Wood W, Lin JG, Chung JG (2012) Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways, Food Chem Toxicol. 50:1734–1740.

289. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis, Nature. 420:868–74.

290. Lim KH, Baines AT, Fiordalisi JJ, Shipitsin M, Feig LA, Cox AD, Der CJ, Counter CM (2005) Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells, Cancer Cell. 7:533–545.

291. Lin BF, Chiang BL, Lin JY (2005) Amaranthus spinosuswater extract directly stimulates proliferation of B lymphocytes in vitro, Int. Immunopharmacol. 5:711–722.

292. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy, J Exp Med. 193(6):727–40.

293. Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L, Bergh A (2000) Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival, Int J Oncol. 17(3):445–51.

294. Liu C, Kong X, Li X, Guo W, Zhang C, Sun Y, Su X, Liu X, Lu A, Lin N (2013) Wen Luo Yin inhibits angiogenesis in collagen-induced arthritis rat model and in vitro, J Ethnopharmacol. 149(2):478–89.

295. Liu G, Ma H, Qiu L, Li L, Cao Y, Ma J, Zhao Y (2011) Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4+CD25+ T cells in mice, Immunol. Cell Biol. 89:130–142.

296. Liu Y, Yang G, Zhang J, Xing K, Dai L, Cheng L, Liu J, Deng J, Shi G, Li C, Su X, Zhang S, Yang Y, Li J, Yu D, Xiang R, Wei Y, Deng H (2015) Anti-TNF-α monoclonal antibody reverses psoriasis through dual inhibition of inflammation and angiogenesis, Int Immunopharmacol. 28(1):731–43.

297. Liu Z, Li D, Yu L, Niu F (2012) Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells, Chemotherapy. 58(3):185–94.

298. Liu Z, Schwimer J, Liu D, Lewis J, Greenway FL, York DA, Woltering EA (2006) Gallic acid is partially responsible for the antiangiogenic activities of Rubus leaf extract, Phytother. Res. 20:806–813.

299. Lo C, Lai TY, Yang JS, Yang JH, Ma YS, Weng SW, Lin HY, Chen HY, Lin JG, Chung JG (2011) Gallic acid inhibits the migration and invasion of A375.S2 human melanoma cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and Ras, Melanoma Res. 21:267–273.

300. Locatelli C, Carvalho DR, Mascarello A, de Cordova CA, Yunes RA, Nunes RJ, Pilati C, Creczynski-Pasa TB (2011) Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model, Invest. New Drugs 30:870–879.

301. Locatelli C, Filippin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB (2013) Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review, Eur. J. Med. Chem. 60:233–239.

302. Locatelli C, Leal PC, Yunes RA, Nunes RJ, Creczynski-Pasa TB (2009) Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death, Chem Biol Interact. 181(2):175–84.

303. Locatelli C, Rosso R, Santos-Silva MC, de Souza CA, Licínio MA, Leal P, Bazzo ML, Yunes RA, Creczynski-Pasa (2008) Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells, Bioorg. Med. Chem. 16:3791–3799.

304. Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions, Biochim. Biophys. Acta 1472:142–52.

305. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurment with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193:265–275.

306. Lu X, Lu D, Scully M, Kakkar V (2008) ADAM proteins-therapeutic potential in cancer, Curr. Cancer Drug Targets 8:720–732.

307. Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, Katakowski M, Chopp M, To SS (2010) Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells, Eur J Pharmacol. 641(2-3):102–7.

308. Lu Z, Nie G, Belton PS, Tang H, Zhao B (2006) Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives, Neurochem. Int. 48:263–274.

309. Luo JC, Yamaguchi S, Shinkai A, Shitara K, Shibuya M (1998) Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors, Cancer Res. 58:2652–2660.

310. MacDougall JR, Matrisian LM (1995) Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis, Cancer Metastasis Rev. 14:351–362.

311. Madlener S, Illmer C, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Elford HL, Krupitza G, Bernhaus A, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T (2007) Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells, Cancer Lett. 245:156–162.

312. Maeda H, Shiraishi A (1996) TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice, J Immunol, 156(1):73–8.

313. Maeno T, Tanaka T, Sando Y, Suga T, Maeno Y, Nakagawa J, Hosono T, Sato M, Akiyama H, Kishi S, Nagai R, Kurabayashi M (2002) Stimulation of vascular endothelial growth factor gene transcription by all trans retinoic acid through Sp1 and Sp3 sites in human branchioalveolar carcinoma cells, Am J Respir Cell Mol Biol. 26(2):246–53.

314. Mahadevan A, Reddy MK (1968) Effect of phenolic compounds on growth, polygalacturonase production, and activity of Fusarium oxysporum, J. Plant Pathol. 74:87–90.

315. Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL, Bauer SI, Carson HF, Sharpe RJ (1990) Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides, Science. 247:77–9.

316. Makena PS, Chung KT (2007) Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzidine-induced mutagenicity, Food Chem Toxicol. 45:1899–1909.

317. Malik A, Azam S, Hadi N, Hadi SM (2003) DNA degradation by water extract of green tea in the presence of copper ions: implications for anticancer properties, Phytother. Res. 17:358–363.

318. Manach C, Schalbert A, Morand C, Rėmėsy C, Jimėnez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavilability, Am. J. Clin. Nutr. 79(5):727–747.

319. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, Am. J. Clin. Nutr. 81:230S–242S.

320. Manenti L, Paganoni P, Floriani I, Torri W, Buda A, Taraboletti G, Landoni F, Labianca R, Belotti D, Giavazzi R (2003) Expression level of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2 & 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 & 2 in plasma of patients with ovarian carcinoma, Eur. J. Cancer, 39:1948–1956.

321. Mantovan A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L (1992) The origin and function of tumor associated macrophages, Immunol Today 13:265–70.

322. Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M (2009) Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation, Hum Immunol. 70(5):325–30.

323. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, Trends Immunol. 25(12):677–86.

324. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, Trends Immunol. 23(11):549–55.

325. Marie P, Clunet J (1910) Frequence des metastases viscerales chez les souris cancereuses apres ablation chirurgicale de leur tumeur, Bull Assoc Franc l'Etude Cancer 3:19–23.

326. Martin AR, Villegas I, Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA (2006) The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model, Br J Pharmacol. 147:873–885.

327. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization, Front. Biosci. 13:453–461.

328. Masoud GN, Li W (2015) HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy, Acta Pharm Sin B. 5(5):378–89.

329. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human disease, Clin. Biochem. 32:595–603.

330. Maulik N, Das DK (2002) Redox signaling in vascular angiogenesis, Free Radic Biol Med. 33(8):1047–1060.

331. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, Nature. 399(6733):271–5.

332. Mbonye UR, Yuan C, Harris CE, Sidhu RS, Song I, Arakawa T, Smith WL (2008) Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation, J Biol Chem. 283(13):8611–23.

333. McCawley LJ, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression, Mol Med Today 6:149–156.

334. McCollum AK, Teneyck CJ, Sauer BM, Toft DO, Erlichman C (2006) Upregulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylaminodemethoxygeldanamycin through a glutathionemediated mechanism, Cancer Res. 66:10967–10975.

335. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Müller KH, Sharkey AM, Smith SK (1996) Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids, J Clin Invest. 98(2):482–9.

336. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM (2002) Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates

CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo, Blood 100:1160–1167.

337. Metzen E1, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J (2003) Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing, J Cell Sci. 116(Pt 7):1319–26.

338. Meyskens FL, Buckmeier JA, McNulty SE, Tohidian NB (1999) Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanoma cells and the effect of oxidative stress, Clin. Cancer Res. 5:1197–1202.

339. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T, Dannenberg AJ (1999) Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation, Cancer Res. 59(10):2347–52.

340. Migliori M, Cantaluppi V, Mannari C, Bertelli AA, Medica D, Quercia AD, Navarro V, Scatena A, Giovannini L, Biancone L, Panichi V (2015) Caffeic acid, a phenol found in white wine, modulates endothelial nitric oxide production and protects from oxidative stress-associated endothelial cell injury, PLoS One. 10(4):e0117530.

341. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant negative FLK-1 mutant, Nature. (Lon) 367:576–579.

342. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K (1995) Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines, Eur J Immunol. 25(4):1101–4.

343. Mondal TK, Bhatta D, Biswas S, Pal P (2002) Superantigen-induced apoptotic death of tumor cells is mediated by cytotoxic lymphocytes, cytokines, and nitric oxide, Biochem. Biophys. Res. Commun. 290:1336–1342.

344. Murdock C, Giannoudis A, Lewis CE (2004) Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues, Blood 104:2224–34.

345. Murphy G, Crabbe T (1995) Gelatinases A and B, Methods Enzymol. 248:470–84.

346. Murphy G, Nagase H (2008) Progress in matrix metalloproteinase research, Mol. Asp. Med. 29:290–308.

347. Mutoh A, Ueda S (2013) Peroxidized unsaturated fatty acids stimulate Toll-like receptor 4 signaling in endothelial cells, Life Sci. 92(20-21):984–992.

348. Naczk M, Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food, J Chromatogr A. 1054:95–111.

349. Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF Jr. (1992) Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases, Matrix Suppl. 1:421–424.

350. Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Enghild JJ, Salvesen G (1991) Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases, Biochem Soc Trans. 19(3):715–8.

351. Nagase H, Woessner JF Jr. (1999) Matrix Metalloproteinases, J Biol Chem 274:21491–21494.

352. Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT, Meyers MS, Yeo KT, Yeo TK, Sioussat TM, Dvorak HF (1995) Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hypcrpermeabilily. and ascites fluid accumulation, Cancer Res. 55:360–368.

353. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM (1995) Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells, J Biol Chem. 270(52):31189–31195.

354. Nardini M, Leonardi F, Scaccini C, Virgili F (2001) Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants, Free Radic. Biol. Med. 30:722–733.

355. Nath CJ, Ong T (1990) Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes, Teratog. Carcinog. Mutagen J. 10(3): 273–9.

356. Nathan CF, Hibbs Jr JB (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity, Curr Opin Immunol 3:65–75.

357. Nauck M , Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Wieland H, Stulz P, Perruchoud AP (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is down-regulated by corticosteroids, Am J Respir Cell Mol Biol 16:398–406.

358. Negre-Salvayre A1, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RC, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N (2010) Pathological aspects of lipid peroxidation, Free Radic Res. 44(10):1125–1171.

359. Nehlig A, Debry G (1994) Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee: a review, Mutat. Res. 317:145–162.

360. Nepka C, Sivridis E, Antonoglou O, Kortsaris A, Georgellis A, Taitzoglou I, Hytiroglou P, Papadimitriou C, Zintzaras I, Kouretas D (1999) Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice, Cancer Lett. 141(1-2):57–62.

361. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, FASEB J. 13(1):9–22.

362. Niiro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Niho Y (1997) Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils, Blood 89:1621–1628.

363. Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A (2008) Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions, Cancer Metastasis Rev. 27(1):31–40.

364. Nusse M, Miller BM, Viaggi S, Grawe J (1996) Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and fluorescent in situ hybridization with a centromeric DNA probe, Mutagenesis 11(4):405–413.

365. Nyberg P, Xie L, Kalluri R (2005) Endogenous inhibitors of angiogenesis. Cancer Res. 65:3967–79.

366. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC (2007) Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma, Clin. Cancer Res. 13(2 Pt 2):721s–726s.

367. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS (1998) Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is

necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells, Proc Natl Acad Sci USA. 95(7):3609–14.

368. Okada Y, Tsuboi S, Tsuda Y, Nagamatsu Y, Yamamoto J (1990) Synthesis of a trihexacontapeptide corresponding to the sequence 8-70 of eglin c and studies on the relationship between the structure and the inhibitory activity against human leukocyte elastase, cathepsin G and alpha-chymotrypsin, FEBS Lett. 272(1-2):113–6.
369. O'Leary KA, de Pascual-Teresa S, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription, Mutat Res. 551 (1-2):245–54.
370. Olive P, Banáth JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet assay", Radiat Res 122:86–94.
371. Ono M (2008) Molecular links between tumour angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy, Cancer Sci. 99:1501–1506.
372. Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, Seo H, Ohta H, Nozawa S, Kudo I, Suda T (1996) IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts, J Immunol 156:758–764.
373. Onodera H, Kitaura K, Mitsumori K, Yoshida J, Yasuhara K, Shimo T, Takahashi M, Hayashi Y (1994) Study on the carcinogenicity of tannic acid in F344 rats, Food Chem. Toxicol. 32 (12):1101–1106.
374. Orban Z, Mitsiades N, Burke TR, Tsokos M, Chrousos GP (2000) Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation, Neuroimmunomod. 7:99–105.
375. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, Cell 79:315–28.
376. O’Reilly M, Rosenthal R, Sage EH, Smith S, Holmgren L, Moses M, Shing Y, Folkman J (1993) The suppression of tumor metastases by a primary tumor, Surg Forum 44:474–6.

377. Orimo A,Weinberg RA (2006) Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type, Cell Cycle 5:1597–601.

378. Oršolić N (2010) A review of propolis antitumor action *in vivo* and *in vitro*, J. ApiProduct. ApiMedical Sci. 2(1):1–20.

379. Oršolić N, Bašić I (2005) Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages, J. Ethnopharm. 102: 37–45.

380. Oršolić N, Bašić I (2007) Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. Phytochemistry and Pharmacology III U: Singh VK, Govil JN, Arunahalam C, ur. Recent Progress in Medicinal Plants. Studium Press. Houston. 17:55–113.

381. Oršolić N, Benković V, Horvat-Knežević A, Kopjar N, Kosalec I, Bakmaz M, Mihaljević Ž, Bendelja K, Bašić I (2007) Assessment by survival analysis of the radioprotective properties of propolis and its polyphenolic compounds, Biol. Pharm. Bull. 30:946–951.

382. Oršolić N, Bevanda M, Bendelja K, Horvat-Knežević A, Benković V, Bašić I (2008) Propolis and related polyphenolic compounds; their relevance on host resistance and interaction with chemotherapy. Scientific evidence of the use of propolis in ehtnomedicine. U: Oršolić N, Bašić I, ur. Ethnopharmacology- Review Book, Transworld Research Network, India, 223–250.

383. Oršolić N, Horvat Knežević A, Bašić I (2002) Propolis as a new potential immunomodulator in mice: antimetastatic activity of a water-soluble derivate of propolis (WSDP), Mellifera 2:39–46.

384. Oršolić N, Horvat Knežević A, Šver L, Terzić S, Bašić I (2004) Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds, J. Ethnopharmacol. 94:307–315.

385. Oršolić N, Kosalec I, Bašić I (2005) Synergystic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour, Biol. Pharm. Bull. 28:694–700.

386. Oršolić N, Kunštić M, Kukolj M, Gračan R, Nemrava J (2016) Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid, Chem Biol Interact, 256:111–24.

387. Oršolić N, Šver L, Terzić S, Tadić Z, Bašić I (2003) Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasing ability: a possible mode of antitumor action, Nutr. Cancer 47:156–163.

388. O'Shea JJ, Paul WE (2010) Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4 + T Cells, Science. 327(5969):1098–102.

389. Overall CM (2002) Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity:matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites, Mol. Biotechnol. 22:51–86.

390. Overall CM, López-Otín C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era, Nat Rev Cancer 2:657–672.

391. Ow YY, Stupans I (2003) Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes, Curr. Drug Metab. 4:241–248.

392. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, Nat Rev Mol Cell Biol. 8(3):221–33.

393. Pal C, Bindu S, Dey S, Alam A, Goyal M, Shameel Iqbal M, Maity P, Adhikari SS, Bandyopadhyay U (2010) Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis, Free Radic. Biol. Med. 49:258–267.

394. Palermo-Neto J, de Oliveira Massoco C, Robespierre de Souza W (2003) Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth, Brain Behav. Immun. 17:43–54.

395. Palmer BF, Clegg DJ (2014) Oxygen sensing and metabolic homeostasis, Mol. Cell. Endocrinol. 397:51–57.

396. Papademetrio DL, Lompardía SL, Simunovich T, Costantino S, Mihalez CY, Cavaliere V, Âlvarez É (2016) Inhibition of survival pathways MAPK and NF-kB triggers apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells via suppression of autophagy, Target Oncol. 2:183–195.

397. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC (1997) Nitric oxide contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells, J Clin Invest 100:3131–9.

398. Park EH, Kahng JH (1995) Suppressive effects propolis in rate adjuvant arthritis, Arch Pharmacol Res. 22:554–8.

399. Park HJ, Kim HJ, Kwon HJ, Lee JY, Cho BK, Lee WJ, Yang Y, Cho DH (2006) UVB-induced interleukin-18 production is downregulated by tannic acids in human HaCaT keratinocytes, Exp Dermatol. 15(8):589–95.

400. Park JM, Kim A, Oh JH, Chung AS (2007) Methylseleninic acid inhibits PMAstimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappa B activation, Carcinogenesis 28:837–847.

401. Pasinetti GM (2001) Cyclooxygenase and Alzheimer's disease: implications for preventive initiatives to slow the progression of clinical dementia, Arch Gerontol Geriatr 33:13–28.

402. Pelicano H, Carney D, Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications, Drug Resist. Updat 7:97–110.

403. Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J (1998) Involvement of platelets in tumour angiogenesis?, Lancet. 352(9142):1775–7.

404. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M (2016) Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis, Int J Mol Sci.;17(6). pii: E868.

405. Podar K, Anderson KC (2005) The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: the therapeutic implications, Blood. 105:1383–1395.

406. Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, Lin BK, Gupta D, Shima Y, Chauhan D, Mitsiades C, Raje N, Richardson P, Anderson KC (2001) Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration, Blood. 98(2):428–35.

407. Podolsky S, Tauber AI (1996) Darwinism and antibody diversity: a historical perspective, Res Immunol 147:199–202.

408. Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis, Nat Rev Cancer 4:71–8.

409. Polverini PJ, Leibovich SJ (1987) Effect of macrophage depletion on growth and neovascularization of hamster buccal pouch carcinomas, J Oral Pathol. 16(9):436–41.

410. Poon E, Harris AL, Ashcroft M (2009) Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer, Expert Rev Mol Med. 11:e26.

411. Porta, M, Vioque J, Ayude D, Alguacil J, Jariod M, Ruiz L (2003) Coffee drinking: the rationale for treating it as a potential effect modifier of carcinogenetic exposures, Eur. J. Epidemiol. 18:289–298.

412. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HA (2000) Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization, Proc Natl Acad Sci USA. 97(5):2202–7.

413. Prabhakar NR (2001) Oxygen sensing during intermittent hypoxia: Cellular and molecular mechanisms, J Appl Physiol 90:1986–94.

414. Prada CE, Jousma E, Rizvi TA, Wu J, Dunn RS, Mayes DA, Cancelas JA, Dombi E, Kim MO, West BL, Bollag G, Ratner N (2013) Neurofibroma-associated macrophages play roles in tumor growth and response to pharmacological inhibition, Acta Neuropathol. 125:159–168.

415. Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Danø K, Tryggvason K (1992) Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization, Cancer Res. 52(5):1336–41.

416. Radenković S, Brajović M, Konjević G, Gopcević K (2010) Gelatinases A and B activities in the serum of patients with various coronary artery disease stages, Vojnosanit Pregl. 67(10):825–30.

417. Raes G, De Baetselier P, Noël W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G (2002) Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages, J Leukoc Biol. 71(4):597–602.

418. Raina K, Rajamanickam S, Deep G, Singh M, Agarwal R, Agarwal C (2008) Chemopreventive effects of oral gallic acid feeding on tumor growth and progression in TRAMP mice, Mol Cancer Ther. 7(5):1258–67.

419. Rak J, Filmus J, Kerbel RS (1996) Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells: the »angiogenesis progression« hypothesis, Eur J Cancer 32A:2438–50.

420. Rak JW, St Croix BD, Kerbel RS (1995) Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy, Anticancer Drugs 6(1):3–18.

421. Ramanathan R, Tan CH, Das NP (1992) Cytotoxic effect of plant polyphenols and fat soluble vitamins on malignant human cultured cells, Cancer Lett. 62:217–224.

422. Ramos S (2008) Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways, Mol Nutr Food Res 52:507–526.

423. Rasmussen HS, McCann PP (1997) Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat, Pharmacol. Ther. 75:69–75.

424. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP (1989) Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene, Cell 56:345–55.

425. Reddy TC, Reddy DB, Aparna A, Arunasree KM, Gupta G, Achari C, Reddy GV, Lakshmipathi V, Subramanyam A, Reddanna P (2012) Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-kappa B inactivation, Toxicol. In Vitro 26:396–405.

426. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL (1997) Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis, Cancer Res. 57(5):963–9.

427. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?, Free Radic Biol Med. 49(11):1603–1616.

428. Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Henry R, Noyszewski EA, Wagner PD (1997c) Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise, Am J Physiol. 277:H2247–H2252.

429. Rizzo MT (2011) Cyclooxygenase-2 in oncogenesis, Clin. Chim. Acta 412:671–687.

430. Robinson CJ, Stringer SE (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors, J Cell Sci. 114:853–865

431. Rodríguez PC, Ochoa AC (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives, Immunol Rev. 222:180–91.

432. Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells, Oncogene. 15(18):2169–77.

433. Roy G, Lombardia M, Palacios C, Serrano A, Cespon C, Ortega E, Eiras P, Lujan S, Revilla Y, Gonzalez-Porque P (2000) Mechanistic aspects of the induction of apoptosis by lauryl gallate in the murine B-cell lymphoma line Wehi 231, Arch. Biochem. Biophys. 383:206–214.

434. Royds JA, Dower SK, Qwarnstrom EE, Lewis CE (1998) Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFκB, Mol Pathol. 51:55–61.

435. Saeki K, Yuo A, Isemura M, Abe I, Seki T, Noguchi H (2000) Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid, Biol. Pharm. Bull. 23:1391–1394.

436. Saharinen P, Alitalo K (2011) The yin, the yang, and the angiopoietin-1, J Clin Invest. 121(6):2157–9.

437. Sakagami H, Satoh K (1997) Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid, Anticancer Res. 17:221–224.

438. Saklatvala J, Dean J, Clark A (2003) Control of the expression of inflammatory response genes, Biochem Soc Symp (70):95–106.

439. Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin–proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redoxinduced changes, J Biol Chem 272:22642–7.

440. Saleh M, Vasilopoulos K, Stylli SS, Kaye AH, Wilks AF (1996) The expression of antisense vascular endothelial growth factor (VEGF) sequences inhibits intracranial C6 glioma growth in vivo by suppressing tumour angiogenesis, J Clin Neurosci. 3(4):366–72.

441. Salgado R, Vermeulen PB, Benoy I, Weytjens R, Huget P, Van Marck E, Dirix LY (1999) Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients, Br J Cancer. 80(5-6):892–7.

442. Sameermahmood Z, Raji L, Saravanan T, Vaidya A, Mohan V, Balasubramanyam M (2010) Gallic acid protects RINm5F b-cells from glucolipotoxicity by its antiapoptotic and insulin-secretagogue actions, Phytother. Res. 24:S83–S94.

443. Saraswati S, Agrawal SS, Alhaider AA (2013) Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor, Chem Biol Interact. 206(2):153–65.

444. Savi LA, Leal PC, Vieira TO, Rosso R, Nunes RJ, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simoes CMO (2005) Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid, Arzneimittelforschung. 55:66–75.

445. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols, J Nutr 130:2073–2085.

446. Schoppmann SF (2005) Lymphangiogenesis, inflammation and metastasis, Anticancer Res. 25(6)4503–4511.

447. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P (2010) Oxygen in acute and chronic wound healing, Br J Dermatol. 163(2):257–268.

448. Scott D, Barber JBP, Levine EL, Burril W, Roberts SA (1998) Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases amongst breast cancer patients: a test for predisposition, Br J Cancer 77:614–20.

449. Segura JA, Barbero LG, Márquez J (2000) Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation, Immunol. Lett. 74:111–115.

450. Serrano A, Palacios C, Roy G, Cespon C, Villar ML, Nocito M, Gonzalez-Porque P (1998) Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation, Arch. Biochem. Biophys. 350:49–54.

451. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G (1996) Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10, Blood. 87(9):3877–82.

452. Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I (2001) Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans, J. Nutr. 131:1207–1210.

453. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM,Toomey D (2003) Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. Cancer Treat Rev. 29:297–307.

454. Sharma RA, Harris AL, Dalgleish AG, Steward WP, O'Byrne K (2001) Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention, Lancet Oncol. 2:726–32.

455. Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP (2006) Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by Glycyrrhiza glabra, Int Immunopharmacol. 6(3):494–8.

456. Shi ZH, Li NG, Shi QP, Tang H, Tang YP, Li W, Yin L, Yang JP, Duan JA (2012) Design, Synthesis and Biological Evaluation of Caffeic Acid Amides as Selective MMP-2 and MMP-9 Inhibitors, Drug Dev Res. 73:343–351.

457. Shibuya M (2011) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis, Genes Cancer. 2(12):1097–1105.

458. Shibuya M (2014) VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease, Biomol Ther (Seoul). 22(1):1–9.

459. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L (1999) Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2, Curr Top Microbiol Immunol. 237:59–83.

460. Shirzad H, Kiani M, Shirzad M (2013a) Impacts of tomato extract on the mice fibrosarcoma cells, J HerbMed Pharmacol. 2(1):13–6.

461. Shirzad M, Kordyazdi R, Shahinfard N, Nikokar M (2013b) Does Royal jelly affect tumor cells?, J HerbMed Pharmacol. 2(2):45–48

462. Shishodia S, Aggarwal BB (2004) Nuclear factor-kappa B: a friend or a foe in cancer?, Biochem. Pharmacol. 68(6):1071–1080.

463. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis, Nature. 359:843–5.

464. Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J, Mantovani A (2000) Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages, J Immunol. 164(2):762–7.

465. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy, Eur J Cancer. 42(6):717–27.

466. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, Apoptosis 5:415–418.

467. Sinclair AJ, Barnett AH, Lunie J (1990) Free radical and auto-oxidant systems in health and disease, Br. J. Hosp. Med. 43:334–344.

468. Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells, Exp. Cell Res. 175:184–191.

469. Siveen KS, Kuttan G (2009) Role of macrophages in tumour progression, Immunol. Lett. 123:97–102.

470. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, Biotechniques. 38(1):73-83.

471. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P (2009) Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation, J Leukoc Biol. 86(5):1065–73.

472. Somerville RPT, Oblander SA, Apte SS (2003) Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks, Genome Biol 4 (6):216.

473. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mäntylä P (2006) Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation, Ann Med. 38(5):306–21.

474. Souza SM, Aquino LC, Milach AC Jr, Bandeira MA, Nobre ME, Viana GS (2007) Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from Myracrodruon urundeuva Allemao (Anacardiaceae) in rodents, Phytother Res. 21:220–225.

475. Spirig R, Djafarzadeh S, Regueira T, Shaw SG, von Garnier C, Takala J, Jakob SM, Rieben R, Lepper PM (2010) Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1alpha and dendritic cell maturation under normoxic conditions, PLoS ONE. 5(6):e0010983.

476. Stack MS, Ellerbroek SM, Fishman DA (1998) The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma, Int J Oncol. 12(3):569–76.

477. Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention, J Clin Invest. 103:1237–1241.

478. Strlic M, Radovic T, Kolar J, Pihlar B (2002) Anti- and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems, J. Agric. Food Chem. 50:6313–6317.

479. Su P, Shi Y, Wang J, Shen X, Zhang J (2015) Anticancer agents derived from natural cinnamic acids, Anticancer Agents Med. Chem. 15:980–987.

480. Subramanian V, Venkatesan B1, Tumala A1, Vellaichamy E2 (2014) Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice, Food Chem Toxicol. 66:44–55.

481. Sugishita Y1, Shimizu T, Yao A, Kinugawa Ki, Nojiri T, Harada K, Matsui H, Nagai R, Takahashi T (2000) Lipopolysaccharide augments expression and secretion of vascular endothelial growth factor in rat ventricular myocytes, Biochem Biophys Res Commun. 268:657–62.

482. Sun SW, Yu HQ, Zhang H, Zheng YL, Wang JJ, Luo L (2007) Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in d-galactose–treated mice by increasing brain antioxidant capacity, Nutr Res 27:169–175.

483. Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, Siwik DA,Colucci WS, Sutherland P, Wilson PWF, Vasan RS (2004) Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study, Circulation 109:2850–2856.

484. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R (2013) Vascular endothelial growth factor in heart failure, Nat. Rev. Cardiol. 10:519–530.

485. Takac I, Schröder K, Brandes RP (2012) The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system?, Curr Hypertens Rep. 14(1):70–78.

486. Tammela P, Laitinen L, Galkin A, Wennberg T, Heczko R, Vuorela H, Slotte JP, Vuorela P (2004) Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in CaCo-2 cells and in phospholipid vesicles, Arch. Biochem. Biophys. 425:193–199.

487. Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Suzuki M, Terao T (2002) Thymidine phosphorylase expression in tumor-infiltrating macrophages may be correlated with poor prognosis in uterine endometrial cancer, Hum Pathol 33:1105–13.

488. Tang XM, Sun YJ, Half E, Kuo MT, Sinicrope F (2002) Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells, Cancer Res. 62:4903–4908.

489. Taradi M (2010) Imunoreakcija na tumor. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada, 362–387.

490. Taradi M (2010) Nespecifična imunost. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada, 156–171.

491. Thippeswamy G, Salimath BP (2006) Curcuma aromatica extract induces apoptosis and inhibits angiogenesis in Ehrlich Ascites Tumor cells in vivo, mySCIENCE 1(1): 79–92.

492. Thomas L (1959) Discussion of medawar: reactions to homologous tissue antigens in relation to hypersensitivity, U: Lawrence HS, Hoeber P, ur. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitivity States. New York, NY, USA, 529–532.

493. Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ (2007) Dietary polyphenolic phytochemicals: promising cancer chemopreventive agents in humans?, A review of their clinical properties, Int J Cancer 120:451–458.

494. Thurston G (2002) Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage, J Anat. 200:575–580.

495. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure duringembryonic development, Genes Dev. 12:3320–4.

496. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen. 35(3):206–21.

497. Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, Anal. Biochem. 27:502–520.

498. Tikoo K, Bhatt DK, Gaikwad AB, Sharma V, Kabra DG (2007) Differential effects of tannic acid on cisplatin induced nephrotoxicity in rats, FEBS Lett. 581(10):2027–35.

499. Tikoo K, Tamta A, Ali IY, Gupta J, Gaikwad AB (2008) Tannic acid prevents azidothymidine (AZT) induced hepatotoxicity and genotoxicity along with change in expression of PARG and histone H3 acetylation, Toxicol Lett. 177:90–96.

500. Tomek R (2000) Sistemsko liječenje tumora. U: Šamija M i suradnici. ur. Onkologija. Zagreb: Medicinska naklada, 144–212.

501. Touyz RM, Briones AM (2011) Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension, Hypertens Res. 34(1):5–14.

502. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, Huang P (2006) Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate, Cancer Cell. 10:241–252.

503. Trandafir I, Nour V, Ionica ME (2013) Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the romanian market, Arch Latinoam Nutr. 63(1):87–94.

504. Través PG, Luque A, Hortelano S (2012) Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game, Mediat Inflamm. 2012:568783.

505. Triratanachat S, Niruthisard S, Trivijitsilp P, Tresukosol D, Jarurak N (2006) Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and early-staged uterine cervical squamous cell carcinoma: clinical significance, Int J Gynecol Cancer. 16(2):575-80.

506. Tsujii M, Kwano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells, Cell 93:705–716.

507. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S (2005) Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density, Oncol Rep. 14(2):425–31.

508. Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species, J Physiol. 552(Pt 2):335–344.

509. Ushio-Fukai M, Alexander RW (2004) Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase, Mol Cell Biochem. 264(1-2):85–97.

510. Utsunomiya H, Ichinose M, Ikeda K, Uozaki M, Morishita J, Kuwahara T, Koyama AH, Yamasaki H (2014) Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication in vitro, Int. J. Mol. Med. 34:1020–1024.

511. Vainio H, Bianchini F (2001) IARC Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Strategies IARC Handbooks of Cancer Prevention: Fruit and Vegetables, IARC Press, Lyon.

512. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induce cancer, Chem. Biol. Interact. 160:1–40.

513. van Ampting MT, Schonewille AJ, Vink C, Brummer RJ, van der Meer R, Bovee-Oudenhoven IM (2010) Damage to the intestinal epithelial barrier by antibiotic pretreatment of salmonella-infected rats is lessened by dietary calcium or tannic acid, J Nutr. 140:2167–2172.

514. Van Molle W, Vanden Berghe J, Brouckaert P, Libert C (2000) Tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis: pharmacological intervention with verapamil, tannic acid, picotamide and K76COOH, FEBS Lett. 467:201–205.

515. Vance RE, Teel RW (1989) Effect of tannic acid on rat liver S9 mediated mutagenesis, metabolism and DNA binding of benzo[a]-pyrene, Cancer Lett. 47:37–44.

516. Vaupel P (2004) The role of hypoxia-induced factors in tumorprogression. Oncologist 9:10–7.

517. Vita JA (2005) Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function, Am J Clin Nutr 81:292S–7S.

518. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J (1995) Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin 12, J Natl Cancer Inst. 87:581–6.

519. Wada S, Kurahayashi H, Kobayashi Y, Funayama T, Yamamoto K, Natsuhori M, Ito N (2003) The relationship between cellular radiosensitivity and radiation-induced DNA damage measured by the comet assay, J. Vet. Med. Sci. 65(4):471–7.

520. Wang B, Li Q, Qin L, Zhao S, Wang J, Chen X (2011) Transition of tumor-associated macrophages from MHC class II(hi) to MHC class II(low) mediates tumor progression in mice, BMC Immunol. 12:43.

521. Wang M, Kirk J, Venkataraman S, Domann FE, Zhang HJ, Schafer FQ, Flanagan SW, Weydert CJ, Spitz DR, Buettner GR, Oberley LW (2005) Manganese superoxide

dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor, Oncogene. 24:8154–8166.

522. Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, HO CK (1997) The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes, Int J Cancer. 70:699–705.

523. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulan G, Shaul PW, Melito L, Frantz DE, Kilgore JA, Williams NS, Terada LS, Nwariaku FE (2011) Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species, Am J Physiol Cell Physiol. 301(3):C695–C704.

524. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T (2004) Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NfkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells, J Biol Chem. 279(7):6017–26.

525. Weidner N (1995) Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer, Am J Pathol 147:9–19.

526. Weis SM, Cheresh DA (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability, Nature. 437:497–504.

527. Weitz JI (2008) Antiplatelet, Anticoagulant, and Fibrinolytic Drugs, U: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine (17th ed.). New York: McGraw-Hill Medical.

528. West XZ1, Malinin NL, Merkulova AA, Tischenko M, Kerr BA, Borden EC, Podrez EA, Salomon RG, Byzova TV (2010) Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands, Nature. 467(7318):972–976.

529. White ES, Strom SRB, Wys NL, Arenberg DA (2001) Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity, J Immunol 166:7549–55.

530. Wildeboer D, Naus S, Sang QXA, Bartsch JW, Pagenstecher A (2006) Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 65:516–527.

531. Wolfe K, Wu X, Liu RH (2003) Antioxidant activity of apple peels, J Agric Food Chem. 51:609–614.

532. Wouters BG, Weppler SA, Koritzinsky M, Landuyt W, Nuyts S, Theys J, Chiu RK, Lambin P (2002) Hypoxia as a target for combined modality treatments, Eur J Cancer 38:240–57.

533. Wu LT, Chu CC, Chung JG, Chen CH, Hsu LS, Liu JK, Chen SC (2004) Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes, Mutat Res 556 (1-2):75–82.

534. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J (2004) A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors, Cancer Res. 64(19):7022–9.

535. Xu L, Yoneda J, Herrera C, Wood J, Killion JJ, Fidler IJ (2000) Inhibition of malignant ascites and growth of human ovarian carcinoma by oral administration of a potent inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, Int J Oncol. 16(3):445–54.

536. Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG (2002) The role of nitric oxide in cancer, Cell Res. 12(5-6):311–320.

537. Yagi K (1991) Lipid peroxides and human diseases, Chem. Physiol. Lip. 45:337–351.

538. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Tokutake S (2002) Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in here ditary cataractous (ICR/f) rats, J Agric Food Chem 50:4983–4988.

539. Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, Shibuya M (1994) A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1), Oncogene. 9(9):2683–90.

540. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand S, Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, Nature. 407:242–248.

541. Yang FJ, HS Oz, Barve S, De Villiers WJS, McClain CJ, Varilek GW (2001) The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6, Mol. Pharmacol. 60:528–533.

542. Yang JM, Xu Z, Wu H, Zhu H, Wu X, Hait WN (2003) Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells, Mol Cancer Res 1:420–427.

543. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H (1996) Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance, J Cardiovasc Pharmacol. 27(6):838–44.

544. Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Naito S, Ohtsuru A, Yamamoto T, Kuroiwa Y (1999) Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells, Life Sci. 64(4):249–258.

545. Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A, Martyn JA (2003) Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis, J Histochem Cytochem. 51(7):873–85.

546. Yeh RD, Chen JC, Lai TY, Yang JS, Yu CS, Chiang JH, Lu CC, Yang ST, Yu CC, Chang SJ, Lin HY, Chung JG (2011) Gallic acid induces G(0)/G(1) phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway, Anticancer Res. 31:2821–2832.

547. Yoon SO, Shin S, Lee HJ, Chun HK, Chung AS (2006) Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression, Mol. Cancer Ther. 5:2666–2675.

548. You BR, Moon HJ, Han YH, Park WH (2010) Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis, Food Chem Toxicol. 48(5):1334–40.

549. You BR, Park WH (2010) Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase, Toxicol In Vitro. 24(5):1356–62.

550. Yu Q, Stamenkovic I (2000), Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, Genes Dev. 14:163–176.

551. Yun J, Rocic P, Pung YF, Belmadani S, Carrao AC, Ohanyan V, Chilian WM (2009) Redox-dependent mechanisms in coronary collateral growth: the “redox window” hypothesis, Antioxid Redox Signal. 11(8):1961–1974.

552. Zessner H, Pan L, Will F, Klimo K, Knauft J, Niewöhner R, Hümmer W, Owen R, Richling E, Frank N, Schreier P, Becker H, Gerhauser C (2008) Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential, Mol Nutr Food Res 52:28–44.

553. Zhai Z, Liu Y, Wu L, Senchina DS, Wurtele ES, Murphy PA, Kohut ML, Cunnick JE (2007) Enhancement of innate and adaptive immune functions by multiple Echinacea species, J. Med. Food. 10:423–434.

554. Zhang H, Zhu Sj, Wang D, Wei Yj, Hu SS (2009) Intramyocardial injection of tannic acid attenuates postinfarction remodeling: A novel approach to stabilize the breaking extracellular matrix, J Thorac Cardiovasc Surg 137:216–22.

555. Zhang J, Song Q, Han X, Zhang Y, Zhang Y, Zhang X, Chu X, Zhang F, Chu L (2017) Multi-targeted protection of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by tannic acid, Int Immunopharmacol. 47:95–105.

556. Zhang Y, Choksi S, Chen K, Pobezinskaya Y, Linnoila I, Liu ZG (2013) ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages, Cell Res. 23:898–914.

557. Zhang Y, Wang L, Zhang Y, Wang M, Sun Q, Xia F, Wang R, Liu L (2017) Nogo-B Promotes Angiogenesis in Proliferative Diabetic Retinopathy via VEGF/PI3K/Akt Pathway in an Autocrine Manner, Cell Physiol Biochem. 43(5):1742–1754.

558. Zhao B, Hu M (2013) Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells, Oncol Lett. 6(6):1749–1755.

559. Zhao R, Xiang N, Domann FE, Zhong W (2006) Expression of p53 enhances selenite-induced superoxide production and apoptosis in human prostate cancer cells, Cancer Res. 66:2296–2304.

560. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R (1997) Nitric oxide syntase lies downstream from vascular endothelia growth factor-induced angiogenesis, J Clin Invest 99:2625–34.

561. Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ, Cao J (1998) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP), J Biol Chem. 273(2):1216–22.

562. http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_06/S1462399405009117sup010.gif
563. http://slideplayer.com/slide/9011892/
564. http://www.biolegend.com/NewsLegend/022311/index.htm
565. https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-hallmarks-of-cancer-5-sustained-angiogenesis/
566. https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid
567. https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid
568. https://en.wikipedia.org/wiki/Sheddase
569. https://en.wikipedia.org/wiki/Vascular_endothelial_growth_factor#cite_note-15
570. https://news.uns.purdue.edu/images/2016/han-cancernanotech.jpg
571. http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/no/synthesis.htm
572. https://worldwide.promega.com/
573. https://www.slideshare.net/dduberkar/matrixmetalloproteinase
574. https://www.tocris.com/cell-biology/angiogenesi

§ 8. ŽIVOTOPIS

Martina Kunštić rođena je 20. travnja 1985. u Zagreb. Osnovnu školu završila je u Zagrebu, nakon čega je upisala Klasičnu gimnaziju u Zagrebu gdje je 2004. godine i maturirala. Iste godine upisala je studij biologije i kemije (smjer profesor biologije i kemije) na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2008. upisuje razliku kolegija za inženjerski smjer kemije na Kemijskom odsjeku PMF-a u Zagrebu. Diplomu za profesora biologije i kemije kao i za dipl. ing. kemije stječe 2010. godine obranom diplomskog rada pod nazivom „Genotoksični učinci hipertermije, citostatika cisplatine i kvercetina na zdrave i tumorske stanice miša“ na Biološkom odsjeku PMF-a te diplomskog rada pod nazivom „Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti jabučnog soka“ na Kemijskom odsjeku PMF-a u Zagrebu. Za oba završena diplomska studija nalazi se među 10 najuspješnijih diplomiranih studenata i to na 1. mjestu za smjer dipl. ing. kemije te na 4. mjestu za smjer prof. biologije i kemije prema izrađenoj tablici za 2010. godinu. Dobitnica je Stipendije Grada Zagreba za 2007. i 2008. godinu. Na Biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu izabrana je za naslovno suradničko zvanje asistent iz područja prirodnih znanosti, polje biologija, grana zoologija gdje je od akademske godine 2010./2011. do 2015./2016. vodila praktikume iz kolegija „Osnove biologije“ za studente preddiplomskog studija Znanosti o okolišu i Geologije. Godine 2012. položila je stručni ispit za zvanje prof. biologije. Od 2011. do 2016. godine radila je na nekoliko osnovnih i srednjih škola u Zagrebu i Velikoj Gorici kao prof. biologije i kemije (Gornjogradska gimnazija, OŠ Ivana Meštrovića, OŠ dr. Vinka Žganca, OŠ Ivana Gundulića, OŠ Antuna Branka Šimića, OŠ Izidora Kršnjavog, Ekonomska škola Velika Gorica), zatim kao stručni suradnik na Kemijskom odsjeku PMF-a u Zagrebu u Zavodu za opću i anorgansku kemiju 2013. godine te kao stručni suradnik na Institutu Ruđer Bošković u Zavodu za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biomimetičku kemiju 2016./2017. godine. Trenutno je zaposlena u Euroinspektu Croatiakontrola d.o.o. kao analitičar. Koautor je 4 znanstvena rada u časopisima koje citira Current Contents.

Sudjelovanje u radu na znanstvenim projektima

1. 2009-2010. projekt „**Kemoprevencija rasta tumora polifenolnim sastavnicama**“, voditelj projekta: prof. dr. sc. N. Oršolić, PMF-Biološki odsjek Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za animalnu fiziologiju.
2. 2014-2015. projekt „**Učinkovitost fenolnih kiselina na polarizaciju makrofaga, angiogenezu i rast Ehrlichovog ascitesnog tumora**“, voditelj projekta: prof. dr. sc. N. Oršolić, PMF-Biološki odsjek Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za animalnu fiziologiju.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

1. I. Juranović Cindrić, **M. Kunštić**, M. Zeiner, G. Stingeder i G. Rusak, “Sample preparation methods for the determination of the antioxidative capacity of apple juices”, *Croatica Chemica Acta* **84** (2011), 3; 435–438.

2. I. Juranović Cindrić, M. Zeiner, G. Mendaš, G. Rusak, **M. Kunštić**, A. Adamović i G. Stingeder, “Antioxidative characteristics of organically grown apples, antioxidative characteristics of organically grown Idared apples and derived products”, *Bothalia Journal* **44** (2014), 9; 105-117.

3. N. Oršolić, I. Karač, D. Sirovina, M. Kukolj, **M. Kunštić**, G. Gajski, V. Garaj-Vrhovac, D. Štajcar, “Chemotherapeutic potential of quercetin on human bladder cancer cells”, *Journal of environmental science and health*, part a. **51** (2016), 9; 776-781.

4. N. Oršolić, **M. Kunštić**, M. Kukolj, R. Gračan, J. Nemrava, “Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: efficacy of caffeic acid“, *Chemico-biological interactions* **256** (2016), 111-124.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. M. Paradžik, **M. Kunštić**, M. Konjević, B. Jelić Puškarić, I. Kardum-Skelin, S. Ezine, M. Antica, “Mechanisms of hematopoietic differentiation and leukaemia development”, *PERIODICUM BIOLOGORUM*. **114 (**2012); 67-67.

2. **M. Kunštić**, M. Kukolj, V. Balta, D. Đikić, N. Oršolić, "Gallic, caffeic and tannic acids inhibit growth and angiogenesis in Ehrlich ascites tumor", *PERIODICUM BIOLOGORUM*. **116** (2014); 50-50.

3. N. Oršolić, N. Car, D. Lisičić, V. Benković, A. Horvat Knežević, D. Dikić, **M. Kunštić**, P. József, " Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on Ehrlich ascites tumor in mice" *PERIODICUM BIOLOGORUM*. **116** (2014); 54-54.

Sažeci u zbornicima skupova

1. **M. Kunštić**, I. Juranović Cindrić, G. Rusak, M. Zeiner i G. Stingeder, „Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti jabučnog soka", *VIII Susret mladih kemijskih inženjera*, 18. – 19. 2. 2010., p. 159, Zagreb, Hrvatska.

2. **M. Kunštić**, I. Juranović Cindrić, M. Zeiner, G. Stingeder i G. Rusak, „Determination of the antioxidative capacity of apple juices", *10th Symposium and summer school on bioanalysis,* 7. – 14. 7. 2010., p. 81, Zagreb, Hrvatska.

3. M. Paradžik , **M. Kunštić**, M. Konjević, B. Jelić-Puškarić, I. Kardum-Skelin, S. Ezine i M. Antica, "Mechanisms of hematopoietic differentiation and leukemia development", *2. kongres Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR 2)*, 8. – 9. 11. 2012., p. 67, Zagreb, Hrvatska.

4. M. Antica, M. Paradžik, **M. Kunštić**, M. Konjević i M. Matulić, "Notch signalling controls leukemic cells", *15th international congress of Immunology*, Milano.

5. **M. Kunštić**, M. Kukolj, V. Balta, D. Đikić, N. Oršolić, "Gallic, caffeic and tannic acids inhibit growth and angiogenesis in Ehrlich ascites tumor", *3. kongres Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR 3)*, 6. – 7. 11. 2014., p. 50, Zagreb, Hrvatska.

6. N. Oršolić, N. Car, D. Lisičić, V. Benković, A. Horvat Knežević, D. Dikić, **M. Kunštić**, P. József, " Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with

cisplatin on Ehrlich ascites tumor in mice“ *3. kongres Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR 3)*, 6. – 7. 11. 2014., p. 54, Zagreb, Hrvatska.

7. M. Kukolj, **M. Kunštić**, R. Gračan, E. Rođak, N. Oršolić, “The efficiency of caffeic acid on oxidative stress and angiogenesis i Ehrlich ascites tumor *“12. Hrvatski biološki kongres,18.-23.09. 2015.,* p. 262–263, Sveti Martin na Muri, Hrvatska.

8. **M. Kunštić**, M. Kukolj, N. Oršolić, “Gallic acid reduces tumor growth and angiogenesis in mice with Ehrlich ascites tumor“ *12. Hrvatski biološki kongres*,18.-23. 09. 2015., p. 263–264**,** Sveti Martin na Muri, Hrvatska.

9. N. Oršolić, **M. Kunštić**, M. Kukolj, I. Čolić “Inhibition of macrophage polarization by caffeic acid: interplay between ROS, antioxidans, and inflammatory cytokines“ *12. Hrvatski biološki kongres*,18.-23. 09. 2015., p. 266–267, Sveti Martin na Muri, Hrvatska.

10. N. Oršolić, D. Đikić, J. Nemrava, P. Majcen, **M. Kunštić**, M. Kukolj, E. Goluža “The effectiveness of quercetin on biomarkers for osteoporosis“ *12. Hrvatski biološki kongres*,18.-23. 09. 2015., p. 265–266, Sveti Martin na Muri, Hrvatska.

11. N. Oršolić, D. Odeh, M. Mataković, V. Balta, **M. Kunštić**, M. Kukolj, K. Sašilo, D. Đikić “Quercetin attenuates n-hexyl salicylate or di-n-propyl disulfide-induced skin irritation: oxidative stress and inflammation“ *12. Hrvatski biološki kongres*,18.-23. 09. 2015., p. 269–270, Sveti Martin na Muri, Hrvatska.

12. N. Oršolić, **M. Kunštić**, M. Kukolj, D. Sirovina“Effect of flavonoids and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) on tumour growth and micronucleus induction in mouse tumour model“ *12. Hrvatski biološki kongres*,18.-23. 09. 2015., p. 267–268**,** Sveti Martin na Muri, Hrvatska.

13. V. Balta, D. Odeh, M. Mataković, **M. Kunštić**, M. Kukolj, N. Oršolić “Animal models of psoriasis: antiinflammatory and antioxidant epigallocatehin gallate efficiency“ *12. Hrvatski biološki kongres*,18.-23. 09. 2015., p. 258–259, Sveti Martin na Muri, Hrvatska.

14. N. Oršolić, **M. Kunštić**, M. Kukolj, D. Sirovina, I. Šopf "Protective and reparative effect of pentadecapeptide BPC 157 on mice blood, liver and kidney cells" *12. Hrvatski biološki kongres*,18.-23. 09. 2015., p. 268–269**,** Sveti Martin na Muri, Hrvatska.

15. **M. Kunštić**, N. Oršolić, M. Kukolj, R. Gračan, "Molekularni mehanizmi djelovanja kafeinske kiseline na angiogenezu i supresiju rasta Ehrlichovog ascitesnog tumora u mišu" *1. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a*, 26. 02. 2016., p. 54-54, Zagreb, Hrvatska.

16. J. Nemrava, N. Oršolić, P. Majcen, **M. Kunštić**, M. Kukolj, Ž. Jeleč, "Antioksidativno i antiupalno djelovanje krizina na osteoporozu izazvanu retinoičnom kiselinom u štakora", *1. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a* , 26. 02. 2016., p. 55-55, Zagreb, Hrvatska.

17. **M. Kunštić**, N. Oršolić, M. Kukolj, D. Odeh, R. Gračan, "Anticancer and antiangiogenic effects of phenolic acids on Ehrlich ascites tumor", *2017 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society with EFIS on Tour*, 20.-21. 10. 2017., p. 55, Zagreb, Hrvatska.

18. N. Oršolić, J. Nemrava, M. Kukolj, D. Odeh, N. Lesar, **M. Kunštić**, E. Goluža, Ž. Jeleč, M.Vihnanek Lazarus, T. Orct, " Effect of grape seed proanthocyanidins on retinoic acid-induced bone loss in rats", *2017 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society with EFIS on Tour*, 20.-21. 10. 2017., p. 56, Zagreb, Hrvatska.