

# Učinkovitost kafeinske kiseline na oksidacijski stres i angiogenezu u Ehrlichovom ascitesnom tumoru

---

**Kukolj, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:122070>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Marina Kukolj**

**Učinkovitost kafeinske kiseline na oksidacijski stres i  
angiogenezu u Ehrlichovom ascitesnom tumoru**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2015**

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Nade Oršolić, red. prof. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

*Želim izraziti najveću zahvalnost svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na predloženoj temi, podršci i razumijevanju tijekom planiranja, izrade i pisanja diplomskoga rada.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela vezanog uz oksidativni stres.*

*Posebno zahvaljujem kolegama koji su nesebično pomogli i odradili sa mnom eksperimentalni dio Ivanu Čoliću, Martini Kunštić, Kristini Dominko, Ediju Rođaku i Matiji Strujiću.*

*Također zahvaljujem dr. sc. Romani Gračan i teh. Zrinki Benčina na pomoći oko izrade histoloških preparata i mikroskopskih snimki.*

*Zahvaljujem i svim profesorima i djelatnicima Zavodu za animalnu fiziologiju na pomoći i konstruktivnim savjetima, posebno tehničarima Mariji Potočić, Hrvoju Jedvaj i Gordani Žakman koji su uvijek bili tu kada je trebalo i uvelike mi olakšali rad u laboratoriju.*

*Posebno želim zahvaliti svojim kolegicama ORL Klinike KBC Zagreb bez čije podrške, prijateljstva i pomoći ovo školovanje bi bilo neizvedivo.*

*Ovaj rad posvećujem mojoj majci i zahvaljujem joj na molitvama, nesebičnoj podršci i žrtvi tijekom svih godina studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### UČINKOVITOST KAFEINSKE KISELINE NA OKSIDACIJSKI STRES I ANGIOGENEZU U EHRlichOVOM ASCITESNOM TUMORU

Marina Kukolj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Napredovanje razvoja tumorskih stanica uključuje preživljavanje, širenje, invaziju, angiogenezu i metastaziranje. Reaktivne vrste kisika (ROS) su povezane s brojnim staničnim funkcijama, kao što su stanična proliferacija, diferencijacija, apoptoza i angiogeneza. Prema tome, inhibicija ROS, početnog koraka rasta tumora i angiogeneze, je obećavajući pristup za kemoprevenciju raka i terapiju. Kafeinska kiselina (CA) je biološki aktivna sastavnica propolisa koja pokazuje antioksidativna, protuupalna, antiproliferativna, citostatska, antiangiogena i antineoplastična svojstva. U ovom radu istraživali smo učinak kafeinske kiseline na rast tumora, tumorsku angiogenezu, funkcionalnu sposobnost makrofaga i makrofagnu polarizaciju kao oksidacijski stres u miševa. EAT stanice ( $2,5 \times 10^6$ ) su injicirane intraperitonealno (*ip*) u Swiss albino miševe. Nakon inokulacije tumora, miševi su injicirani *ip* CA u dozi od 40 i 80 mg/kg tjelesne težine kroz 10 dana ili u fazi eksponencijalnog rasta od 5 dana nakon injekcije stanica tumora (na dan 5, 7, 9). Na dan 11, analizirali smo ukupni broj stanica ascitesa u peritonealnoj šupljini, volumen ascitesa, diferencijalnu analizu stanica prisutnih u peritonealnoj šupljini, funkcionalna aktivnost makrofaga, antiangiogenične i antioksidativne parametre. CA je inhibirala rast stanica EAT i nastanak ascitesa u peritonealnoj šupljini miševa nositelja EAT. Nadalje, rezultati smanjenja peritonealne angiogeneze i mikrožilne gustoće pokazuju antiangiogeni potencijal CA *in vivo*. CA smanjuje razinu NO stanicama EAT, dok razina NO je povećana u peritonealnim makrofagima. Sve u svemu, možemo zaključiti da CA može aktivirati makrofage i povećati njihov citotoksični učinak kroz povećanu proizvodnju NO te spriječiti rast tumora i angiogenezu. Nadalje, CA selektivno povećava nastanak ROS-a u stanicama tumora tijekom 10 dana obrade i mi pretpostavljamo da unutarstanična proizvodnja ROS-a može biti kritičan čimbenik u indukciji apoptoze i CA-selektivnog ubijanja stanica tumora, a čini se da inhibicija angiogeneze i rasta stanica EAT tumora u uznapređovalom stadiju, kada stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta temelji se na antioksidativnom kapacitetu CA.

(81 stranicu, 42 slike, 13 tablica, 86 literarnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: VEGF, NO, makrofagi: M1, M2 i TAMs, MDA, CAT, SOD, GSH

Voditelj: dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

dr. sc. Jasna Lajtner, doc.

dr. sc. Sandra Radić Brkanac, doc.

Rad prihvaćen: 18.02.2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### THE EFFICIENCY OF CAFFEIC ACID ON OXIDATIVE STRESS AND ANGIOGENESIS I EHRlich ASCITES TUMOR

Marina Kukolj

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Progression of tumor cell development involves survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis. Reactive oxygen species (ROS) are associated with multiple cellular functions such as cell proliferation, differentiation, apoptosis and angiogenesis. Therefore, inhibition of the ROS, the initial step of tumor growth and angiogenesis, is a promising strategy for cancer chemoprevention and therapy. Caffeic acid (CA), an active component of propolis extract which exhibits antioxidant, antiinflammatory, antiproliferative, cytostatic, anti-angiogenic and most importantly, antineoplastic properties. In the present study we investigated the effect of of caffeic acid on tumor growth, tumor angiogenesis, functional ability of macrophages and macrophage polarization as well as oxidative stress in mice. EAT cells ( $2.5 \times 10^6$ ) were implanted intraperitoneally (*ip*) in Swiss albino mice. After tumor inoculation, mice were injected *ip* with CA at dose of 40 and 80 mg/kg bw during 10 days or in exponential growth phase from the 5 days after tumor cell injection (on day 5, 7, 9). On day 11, ascites volume, the total number of cells, differential count of the cells present in the peritoneal cavity, functional activity of macrophages, anti-angiogenic and antioxidant parameters were determined. The growth of EAT cells and formation of ascites in the peritoneum of EAT-bearing mice was inhibited by CA. Further, results on decrease in the peritoneal angiogenesis and microvessel density show the anti-angiogenic potential of CA *in vivo*. CA decreased NO level in tumor cells whereas NO level was increased in peritoneal macrophages. Taken together, we conclude that CA may increase the cytotoxic actions of macrophages by increasing NO and inhibit tumor growth and angiogenesis. Moreover, CA selectively caused escalation in the ROS formation in EAT cells during 10 days treated and we speculated that intracellular generation of ROS could be a critical factor in the induction of apoptosis and CA-selective killing of tumor cells while it appears that inhibition of angiogenesis and tumor growth EAT cells in advanced stages when the cells entered into exponential growth period based on the antioxidant capacity CA.

(81 pages, 42 figures, 13 tables, 86 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: VEGF, NO, macrophages: M1, M2 i TAMs, MDA, CAT, SOD, GSH

Supervisor: dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

dr. sc. Jasna Lajtner, Asst. Prof.

dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Asst. Prof.

Thesis accepted: 18. 02. 2015.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Angiogeneza</b> .....	1
1.1.2. Angiogeneza tumora .....	1
1.1.3. Uloga dušikovog oksida (NO) .....	1
<b>1.2. Imunosni nadzor nad tumorskim stanicama</b> .....	11
1.2.1. Uloga makrofaga .....	11
1.2.2. Makrofagi pridruženi tumor .....	14
<b>1.3. Slobodni radikali i oksidativni stres</b> .....	15
1.3.1. Slobodni radikali i reaktivni spojevi .....	15
1.3.2. Lipidna peroksidacija .....	19
1.3.3. Oksidativni stres i antioksidativni status obrane .....	20
<b>1.4. Polifenoli</b> .....	22
1.4.1. Kafeinska kiselina .....	24
<b>1.5. Cilj istraživanja</b> .....	25
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	26
<b>2.1. Materijali</b> .....	26
2.1.1. Tumorske stanice .....	26
2.1.2. Pokusne životinje .....	26
2.1.3. Polifenol: kafeinska kiselina (CA) .....	27
2.1.4. Otapalo .....	27
2.1.5. Kemikalije .....	27
2.1.6. Instrumenti .....	27
<b>2.2. Metode</b> .....	28
2.2.1. Praćenje promjena tjelesne težine .....	28
2.2.2. Obrada životinja .....	28
2.2.3. Protutumorska učinkovitost kafeinske kiseline .....	30
2.2.3.1. Praćenje preživljenja životinja .....	30
2.2.3.2. Određivanje ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini ...	30
2.2.3.3. Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine .....	30

2.2.4. Učinak kafeinske kiseline na angiogenezu .....	30
2.2.4.1. Priprema histoloških preparata peritonejske ovojnice .....	30
2.2.4.2. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti .....	31
2.2.5. Polarizacija makrofaga slezene i makrofaga nazočnih u ascitesu .....	31
2.2.5.1. Priprema radnih otopina za analizu NO .....	31
2.2.5.1.1. Izolacija i stimulacija makrofaga slezene s LPS-om .....	31
2.2.5.1.2. Izolacija i stimulacija makrofaga ascitesa s LPS-om .....	32
2.2.5.1.3. Izolacija makrofaga ascites bez stimulacije s LPS-om .....	32
2.2.5.2. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u .....	33
2.2.6. Određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga iz peritonealne tekućine .....	34
2.2.7. Određivanje koncentracije parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite .....	34
2.2.7.1. Izolacija i priprema tkiva .....	34
2.2.7.2. Određivanje proteina metodom po Lowery-u .....	35
2.2.7.3. Mjerenje količine lipidne peroksidacije .....	36
2.2.7.4. Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze .....	36
2.2.7.5. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH) .....	37
2.2.7.6. Mjerenje enzimatske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	39
2.3. Statistička obrada podataka .....	40
<b>3. REZULTATI .....</b>	<b>41</b>
3.1. Promjene tjelesne težine .....	41
3.2. Preživljenje životinja .....	42
3.3. Ukupni broja stanica u peritonealnoj tekućini .....	43
3.4. Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine .....	44
3.5. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti .....	45
3.6. Rezultati mjerenja dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u .....	46
3.6.1. Razina dušik oksida iz stimuliranih makrofaga slezene .....	46
3.6.2. Razina dušik oksida iz ukupnih stanica ascitesa .....	47
3.6.3. Razina dušik oksida iz nestimuliranih makrofaga ascitesa .....	48
3.6.4. Razina dušik oksida iz stimuliranih makrofaga ascitesa .....	49
3.7. Funkcionalna aktivnost makrofaga iz peritonealne tekućine .....	50



3.8. Ukupni proteini u uzorcima .....	51
3.9. Koncentracija MDA u uzorcima .....	54
3.10. Aktivnost CAT u uzorcima .....	56
3.11. Koncentracija GSH u uzorcima .....	59
3.12. Aktivnost SOD u uzorcima .....	62
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>65</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>71</b>
<b>6. LITRATURA .....</b>	<b>72</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>80</b>
<b>8. PRILOG .....</b>	<b>I</b>

# 1. UVOD

## 1.1. ANGIOGENEZA

Formiranje novih krvnih žila tijekom embrionalnog razvoja zove se vaskulogeneza. Iz matičnih stanica mezoderma diferencira se hemangioblast iz kojeg nastaju krvotvorne matične stanice i angioblast, koji je prekursor endotelnih stanica (Adair i Montani 2010). Angioblasti proliferiraju, migriraju u periferna tkiva i diferenciraju se u endotelne stanice koje formiraju arterije, vene i limfne žile (Lešin i sur. 2008).

Angiogeneza ili neovaskularizacija je proces formiranja novih krvnih žila iz već postojećih žila ili s pomoću endotelnih prekursorskih stanica (engl. *endothelial progenitor cells*, EPCs) iz koštane srži (Lešin i sur. 2008; Adair i Montani 2010). Pravilan tijek ovoga procesa važan je u mnogim fiziološkim stanjima poput embrionalnog razvoja, održavanja reproduktivne funkcije žene (obnova endometrija nakon menstruacije, stvaranje žutog tijela, placentacija tijekom trudnoće) te procesa cijeljenja (Dedić Plavetić i sur. 2003). Regulacija intenziteta angiogeneze ovisi o ravnoteži angiogenih i angiostatskih čimbenika (Tablica 1). Ako se izgubi ravnoteža između angiogenih i angiostatskih čimbenika, angiogeneza postaje patološka te kao takva može doprinosti patogenezi mnogih bolesti kao što je karcinom, dijabetička retinopatija, endometrioze, kronične upale bolesti i dr. (Dedić Plavetić i sur. 2003; Lingaraju i sur. 2008; Saraswati i sur. 2013).

Prva istraživanja angiogeneze započela su 1962. godine u Bethesdi kada su F. Becker i J. Folkman proučavali hemoglobinske otopine kao moguću zamjenu za transfuziju. Kasnije su Folkman i suradnici spoznali da endotelne stanice bubre, ali ne mogu proliferirati u hemoglobinskim otopinama koje ne sadržavaju trombocite (Lešin i sur. 2008). To je bio jedan od najranijih eksperimentalnih modela koji je pokazao da tumorski rast može biti zakočen ako se tumor drži u "prevaskularnom stanju" iz čega autori zaključuju da su tumorski rast i metastaziranje ovisni o angiogenezi (Folkman 1971; Lešin i sur. 2008). Naime, u nastalom tumoru svakom povećanju broja tumorskih stanica prethodi povećanje broja novih krvnih kapilara (Folkman 2002).

**Tablica 1. Endogeni angiogeni i angiostatski čimbenici**

Angiogeni čimbenici Stimulators of angiogenesis		Angiostatski čimbenici Inhibitors of angiogenesis	
Čimbenik (engl. kratica) Factor	Molekularna težina (kDa) Molecular weight	Čimbenik (engl. kratica) Factor	Molekularna težina (kDa) Molecular weight
Čimbenik rasta krvnožilnog endotela (VEGF) Vascular endothelial growth factor	40–45	Angiostatin	38
Bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF) Basic fibroblast growth factor	18	Endostatin	20
Kiseli čimbenik rasta fibroblasta (aFGF) Acid fibroblast growth factor	16,4	Trombospondin Thrombospondin	140
Transformirajući čimbenik rasta $\alpha$ (TGF $\alpha$ ) Transforming growth factor $\alpha$	5,5	Trombocitni čimbenik 4 (PF4) Platelet factor 4	27–29
Transformirajući čimbenik rasta $\beta$ (TGF $\beta$ ) Transforming growth factor $\beta$	25	Interferon $\alpha$	19–26
Angiogenin Angiogenin	14,1	Antitrombin III Antithrombin	53
Čimbenik rasta endotelnih stanica izoliran iz trombocita (PD-ECGF) Platelet derived endothelial cell growth factor	45	Troponin I	22
Čimbenik rasta kolonija granulocita (G-CSF) Granulocyte colony stimulating factor	17	Interleukin 12	70–75
Angipoietin 1	70	Vazostatin Vasostatin	21
Interleukin 8	40	Fragment prolaktina Prolactin fragment	18
Čimbenik rasta hepatocita Hepatocyte growth factor	92	Kanstatin	24
Čimbenik rasta posteljice Placental growth factor	25	Restin	22

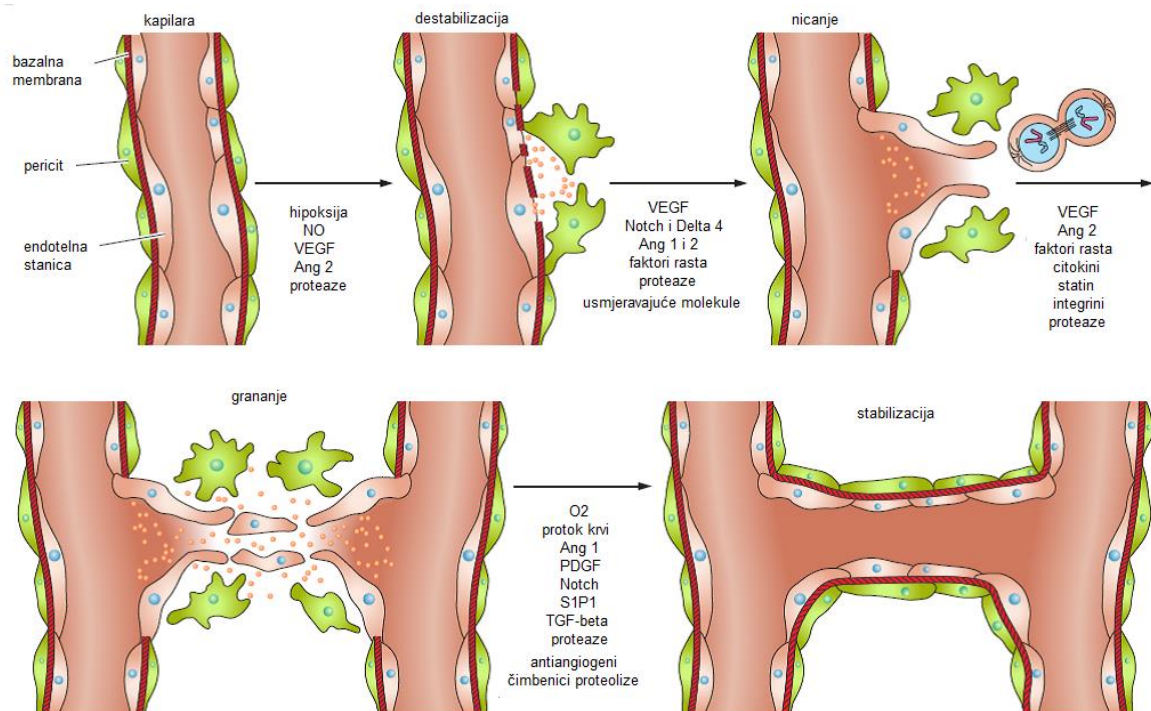
(Preuzeto od: Dedić Plavetić i sur. 2003)

### 1.1.2. Angiogeneza tumora

Stanice ljudskog organizma ovisne su o dopremi kisika i hranjivih tvari te je za njihovo preživljenje ključno da se nalaze dovoljno blizu krvne žile. Procjenjuje se da stanica ne bi smjela biti udaljena više od 100 do 200  $\mu\text{m}$  od najbliže krvne žile, što otprilike odgovara difuzijskom kapacitetu za kisik (Andreis i sur. 2010). Tumori veličine 2-3 mm mogu samom difuzijom zadovoljiti potrebe za hranjivim tvarima, dok daljnji rast ovisi o stvaranju primjerene krvne opskrbe novostvorenim žilama (Cooper i Hausman 2010; Nagaraj i sur. 2012). Angiogeni čimbenici potrebni za neovaskularizaciju tumora stvaraju se iz najmanje tri izvora: sintezom u tumorskim stanicama, sekrecijom iz makrofaga koji infiltriraju tumor, te enzimatskom razgradnjom međustaničnog matriksa od strane makrofaga i/ili tumorskih stanica (Dedić Plavetić i sur. 2003).

Sam proces tumorske angiogeneze (Slika 1) počinje hipoksijom ili ishemijom tumora pri čemu je izražen transkripcijski faktor hipoksijom inducirani čimbenik-1 $\alpha$  (engl. *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* , HIF-1 $\alpha$ ), koji potiče transkripciju brojnih angiogenih čimbenika, npr. čimbenika rasta krvožilnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), (Dedić Plavetić i sur. 2003; Gerald i sur. 2004). Tumorske stanice i makrofagi sintetiziraju VEGF-A (postoji više grupa VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D) koji inducira sintezu proteaza i receptora važnih za širenje tumora u lokalna tkiva. U nazočnosti angiogenog poticaja započinje razgradnja bazalne membrane i endotelne stanice venula (Slika 2) šire se kroz njihovu stijenku tvoreći novu mrežu kapilara u tumoru (Lešin i sur. 2008). Dijelovi ovog procesa su:

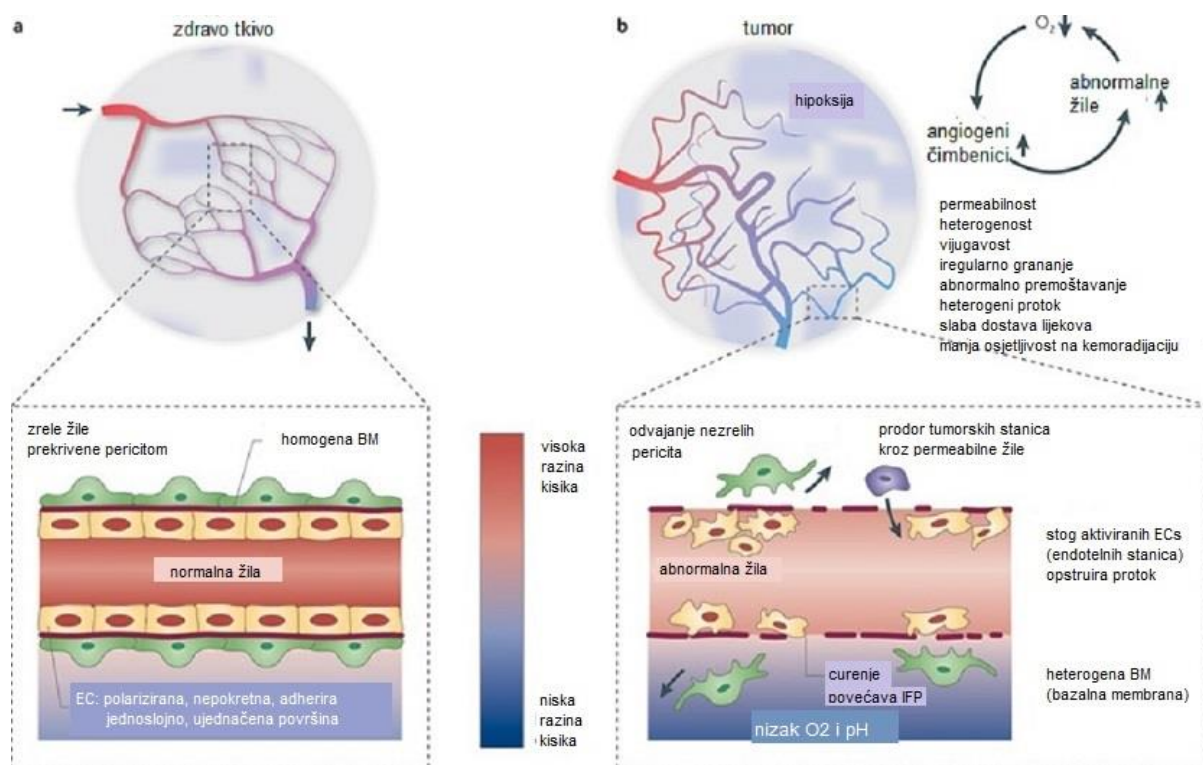
- vazodilatacija kao odgovor na dušikov oksid (NO) i izazvanu pojačanu propustljivost već postojećih krvnih žila zbog djelovanja VEGF-a
- proteolitička razgradnja bazalne membrane roditeljskih krvnih žila metaloproteinazama (MMPs) i prekid međustaničnog kontakta između endotelnih stanica krvnih žila uzrokovan aktivirajućim čimbenikom plazminogena
- migracija endotelnih stanica prema angiogenom stimulatoru
- proliferacija i sazrijevanje endotelnih stanica što uključuje inhibiciju rasta i remodeliranje u kapilaru
- mobiliziranje periendotelnih stanica (uključujući pericite za male kapilare i glatke mišićne stanice za velike krvne žile) da bi podržavale endotelne strukture i formirale pravu krvnu žilu (Lešin i sur. 2008).



### Slika 1. Koraci u angiogenezi

Hipoksija inducira proizvodnju dušikovog oksida (NO) i ekspresiju VEGF-a i angiopietina-1 i -2 (Ang 1 i Ang 2), koji stupaju u međureakciju s proteazama izvanstaničnog matriksa (MMPs) kako bi povećali permeabilnost kapilarnih stijenki. Destabilizacija zatim omogućí endotelnim stanicama migraciju i proliferaciju u tubule potpomognutu s VEGF-om, angiopietinima, usmjeravajućim molekulama, čimbenicima rasta, citokinima i razgradnjom izvanstaničnog matriksa (ECM). Sazrijevanje novostvorenih žila praćeno je povećanom ekspresijom antiangiogenih čimbenika, otpuštenih tijekom proteolize (PDGF, engl. *platelet derived growth factor*; TGF- $\beta$ , engl. *transforming growth factor beta.*; S<sub>1</sub>P<sub>1</sub>, engl. *sphingosine-1-phosphate-1*, endotelni diferencijacijski sfingolipid - receptor povezan s G-proteinima).

(Preuzeto od: Clapp i sur. 2009)



Nature Reviews | Drug Discovery

**Slika 2. Vaskulogeneza normalnog tkiva i angiogeneza tumora** (Preuzeto od: Carmeliet i Rakesh 2011)

Novostvorene krvne žile pospješuju tumorski rast putem perfuzijskog i parakrinog učinka. 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 (Dedić Plavetić i sur. 2003). Endotelne stanice proizvode niz čimbenika koji moduliraju rast i ponašanje tumorskih stanica poput inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 i 2 (engl. *insulin like growth factor*, IGF-1 i -2), čimbenika rasta izoliranog iz trombocita (engl. *platelet derived growth factr*, PDGF), kemotaktičkog peptida za makrofage (engl. *macrophage chemotactic peptide*, MCP) i drugih (Dedić Plavetić i sur. 2003). 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).

### 1.1.3. Uloga dušikovog oksida (NO)

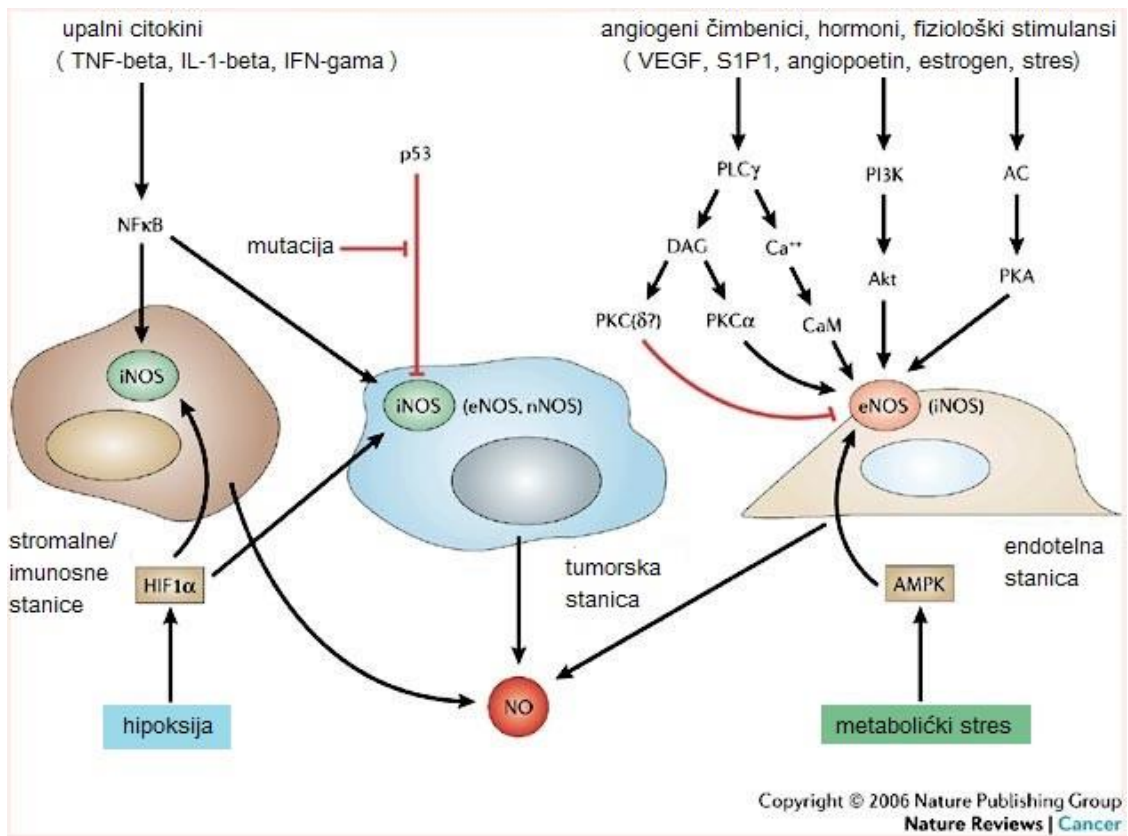
Dušikov oksid (NO) je slobodni radikal, koji kao signalna molekula ima ključnu ulogu u mnogim fiziološkim i patološkim stanjima (Sharma i sur. 2007; Rodrigo 2009). U biološkom tkivu njegovo poluvrijeme života iznosi oko 5 sekunda, a koncentracija u krvi posljedica je ravnoteže između stvaranja NO-a s pomoću NO sintaza i vezanja NO-a na hemoglobin i tiolo u procesu nitrozacije te pretvorbe u nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) i nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), (Hudiček-Martinčić i sur. 2004). Djelovanje NO očituje se u stanici u kojoj nastaje, kao i u susjednim stanicama jer je izrazito lipofilan te brzo difundira kroz staničnu membranu (Cannon 1998). Brojne stanice sisavaca sintetiziraju NO oksidacijom L-arginina ( $\text{L-arginin} + 3/2 \text{NADPH} + \text{H}^+ + 2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{citrulin} + \text{NO} + 3/2 \text{NADP}^+$ ) pomoću enzima dušik oksid sintaze, NOS (Ambriović Ristov i sur. 2007). U organizmu postoje tri izoforme ovog enzima: neuronska NOS (nNOS ili NOS1), inducibilna NOS (iNOS ili NOS2) i endotelna NOS (eNOS ili NOS3), i svaka od njih može biti izražena u različitim tkivima i tipovima stanica (Kanwar i sur. 2009). Dvije izoforme su tzv. konstitutivne NOS ili cNOS: a) eNOS, primarno je smještena na membrani endotelnih stanica krvnih žila te u trombocitima i nekim živčanim stanicama mozga i b) nNOS, primarno je smještena u citosolu živčanih stanica središnjeg i perifernoga živčanog sustava, te u citosolu epitelnih stanica bronha i traheje, kao i u skeletnom mišiću (Hudiček-Martinčić i sur. 2004). Navedene sintaze normalno su prisutne u stanicama i proizvode NO kontinuirano u malim količinama (nmol), njihova aktivnost ovisi samo o promjeni koncentracije  $\text{Ca}^{++}$  (Hudiček-Martinčić i sur. 2004). Tako stvoreni NO je važan medijator homeostatskih procesa. Aktivnost iNOS je neovisna o promjenama unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{++}$ , sintetiziraju je makrofagi i leukociti aktivirani vanjskim čimbenicima, kao što su endotoksini bakterija, medijatori upale i različiti citokini (Hudiček-Martinčić i sur. 2004). Tako induciran enzim u citosolu stanica proizvodi velike količine NO ( $\mu\text{mol}$ ) koje mogu djelovati citotoksično, npr. na bakterije, viruse i stanice tumora.

Mehanizmi kojima NO pospješuje angiogenezu nisu u potpunosti poznati. Tumorske stanice često izražavaju iNOS (Slika 3), a u nekim slučajevima i eNOS i nNOS posredstvom različitih mitogena u tumoru. NO može izazvati napredovanje tumora i metastaza, te regresiju tumora i inhibiciju metastaza, ovisno o dozi i trajanju izloženosti, te o staničnoj osjetljivosti na NO. Potiče tumorski rast i metastaziranje tumora izravnom indukcijom proliferacije tumorskih stanica (povećana ekspresija VEGF i čimbenika rasta fibroblasta, FGF), migracije i invazije, a indirektno preko ekspresije angiogenih i limfoangiogenih čimbenika u tumorskim stanicama

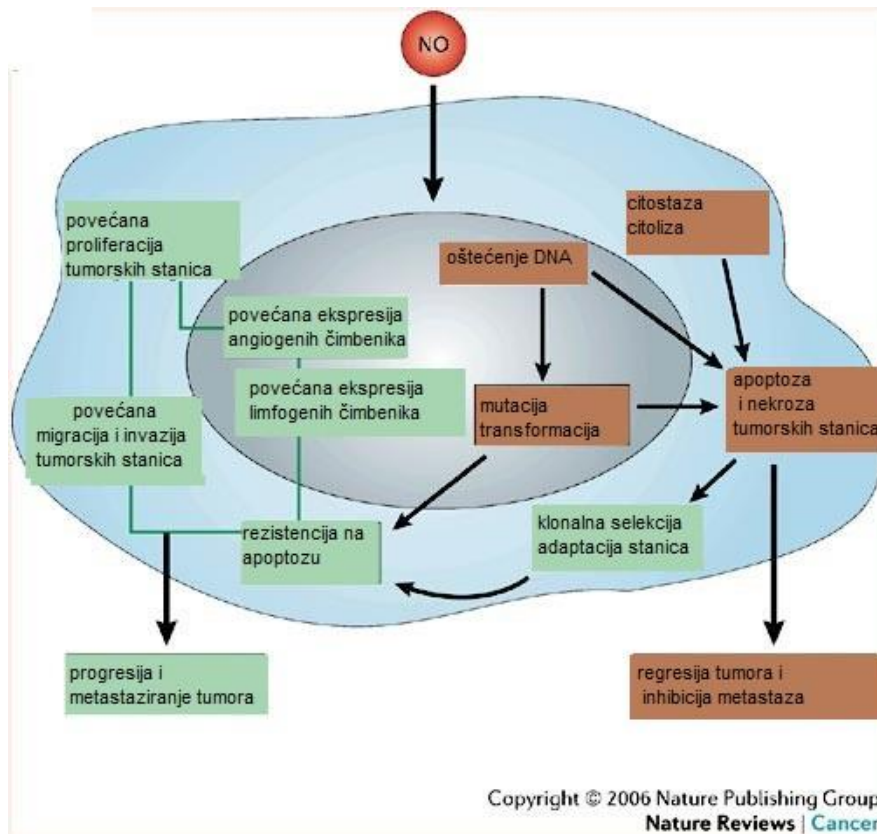
(Cooke i sur. 2002; Fukumura i sur. 2006). S druge strane, citotoksični učinak NO izazvan visokim dozama potiče oštećenje DNA, mutacije gena i smrt tumorskih stanica, što rezultira regresijom tumora i inhibicijom metastaza (Fukumura i sur. 2006). Međutim, mutacija gena i/ili transformacija stanica, zajedno sa smrću stanica divljeg tipa tumora može doprinijeti klonalnoj selekciji prilagođenih stanica i stjecanju otpornosti na apoptozu, te stoga progresiji tumora (Fukumura i sur. 2006; Cooper i sur. 2010). Dušikov oksid potiče progresiju tumora i metastaza i održavanjem protoka krvi kroz tumor (angiogeneza, sazrijevanje i dilatacija žila), međutim, ta uloga može varirati ovisno o prirodi angiogenog stimulansa i uključenih tkiva (Fukumura i sur. 2001; Fukumura i sur. 2006). Prema Matsunagi i sur. (2002) NO može potisnuti proizvodnju angiostatina, endogenog antagoniste angiogeneze.

NO nastao posredstvom eNOS posreduje mitogeni učinak VEGF-a na endotelne stanice (Dedić Plavinić i sur. 2003); dodatak VEGF-a endotelnim stanicama *in vitro* potiče pojačanu sintezu NO, a inhibicija enzima NOS s pomoću L-NAME (N-nitro-L-arginin metilni ester) dokida mitogeni učinak VEGF-a (Ziche i sur. 1997; Papapetropoulos i sur. 1998). Sličan učinak je opažen kod iNOS i drugih angiogenih stimulansa, kao što je bazični čimbenik rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF) i transformirajući čimbenik rasta (Cooke i Losordo 2002). Kao odgovor na ishemiju ili hipoksiju nastaje NO posredstvom iNOS (dimerizacija) i inaktivacijom L-NIL ((1-iminoetil)-lizin), selektivnog inhibitora iNOS, prilikom čega je izražen mitogeni učinak VEGF-a na endotelne stanice (Xie i sur. 1996; Bryk i sur. 1998; Kroll 1998; Hansel i sur. 2003; Nematollahia i sur. 2009).

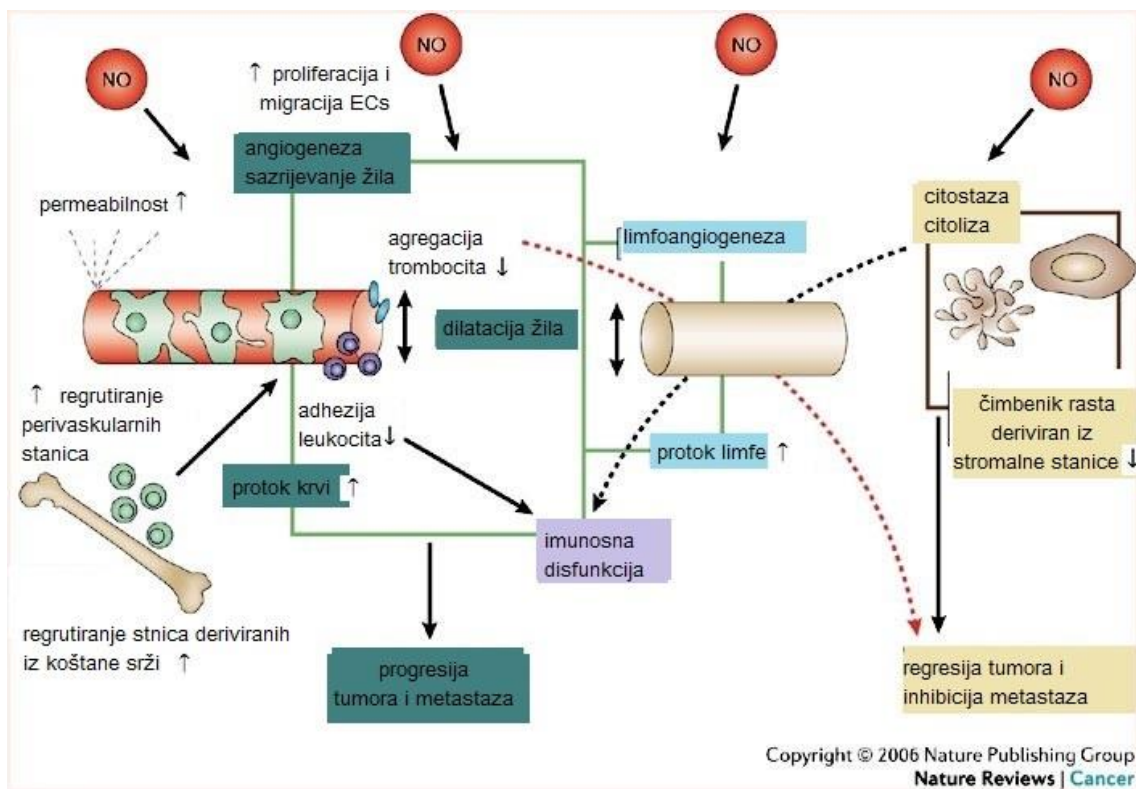




Slika 3. Aktivacija iNOS (Preuzeto od: Fukumura i sur. 2006)



Slika 4. Utjecaj NO na progresiju tumora (Preuzeto od: Fukumura i sur. 2006)



Slika 5. Utjecaj NO na progresiju i regresiju tumora i metastaza putem angiogeneze i limfoangiogeneze (Preuzeto od: Fukumura i sur. 2006)

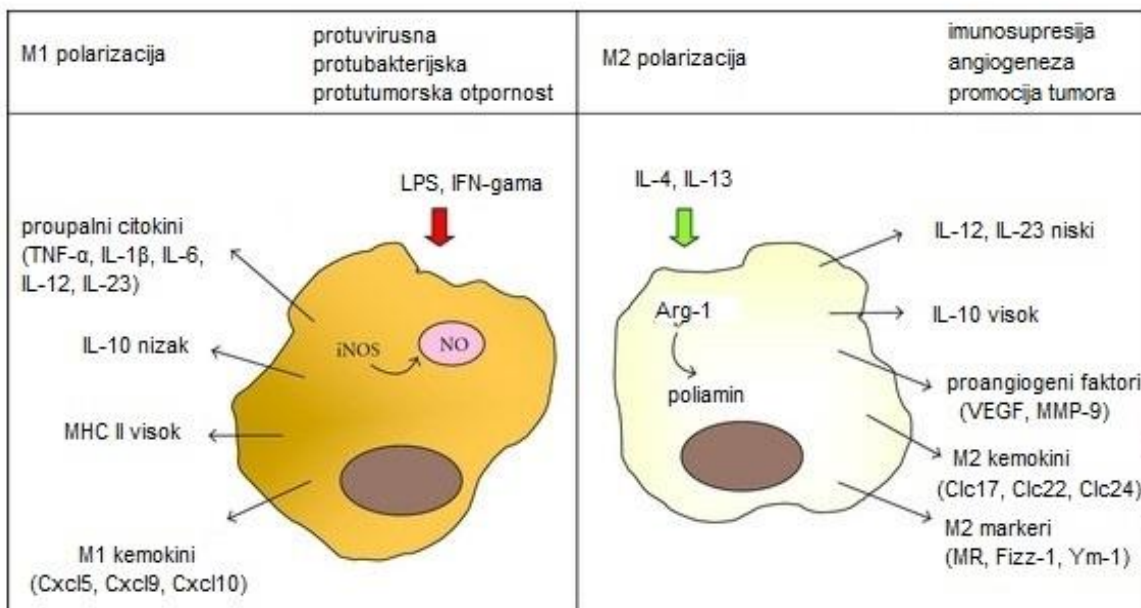
## 1.2. IMUNOSNI NADZOR NAD TUMORSKIM STANICAMA

Tumorske su stanice genski vrlo nestabilne, a jedan njihov manji dio neprestano podliježe apoptozi. Mrtve stanice otpuštaju apoptotička tjelešca koja sadržavaju tumorske antigene. Njih uzimaju predočne stanice koje u odgovarajućem citokinskom mikrookolišu sazrijevaju i predaju kostimulacijski signal limfocitima T, koji se zatim aktiviraju i oslobađanjem svojih citokina potiču aktivnost ostalih makrofaga, prirodnoubilačkih stanica (engl. *natural killer*, NK), limfocita B i T. Imunoreakcije (stanične i humoralne) na tumore su različite i vrlo složene, od imunosne otpornosti na tumor do imunološkog pospješnja rasta (Andreis i sur. 2010). 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 (Cooper i Hausman 2010). Osim fenotipskih promjena, makrofagi mijenjaju svoju funkciju; dolazi do polarizacije makrofaga od klasičnih M1 u alternativne M2 makrofage. M1 makrofagi uključeni su u upalni odgovor, uništavanje patogena, i antitumorsku imunost. Nasuprot tome, M2 makrofagi utječu na protuupalni odgovor, zacjeljivanje rana i imaju prokarcinogene značajke.

### 1.2.1. Uloga makrofaga

Makrofagi su glavni čistači tkivnih prostora (Andreis i sur. 2010) i antigen predočne stanice (engl. *antigen presenting cells*, APC), koje kao nosioci urođene i adaptivne imunosti (Murray i Wynn 2011) imaju neophodnu ulogu u obrani organizma i održavanju homeostaze (Martinez i sur. 2008; Través i sur. 2012). Pod utjecajem mikrookoliša mogu polarizirati u različite fenotipove (Slika 6) kao što su M1-makrofagi (engl. *classically activated macrophages*, CAM) i M2-makrofagi (engl. *alternatively activated macrophage*, AAM) koji se dalje dijele u M2a, M2b i M2c (Martinez i sur. 2008). M1-makrofagi su inducirani samim interferonom gama (IFN- $\gamma$ ) ili u suradnji s mikrobnim stimulansom kao što je lipopolisaharid (LPS) te citokinima kao što su čimbenik nekroze tumora- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor*, TNF- $\alpha$ ) i čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (Través i sur. 2012). Ove stanice izlučuju klasične proupalne citokine kao što su interleukini (IL)-1, IL-6, IL-12 ili IL-23 i TNF- $\alpha$  (Través i sur. 2012), te

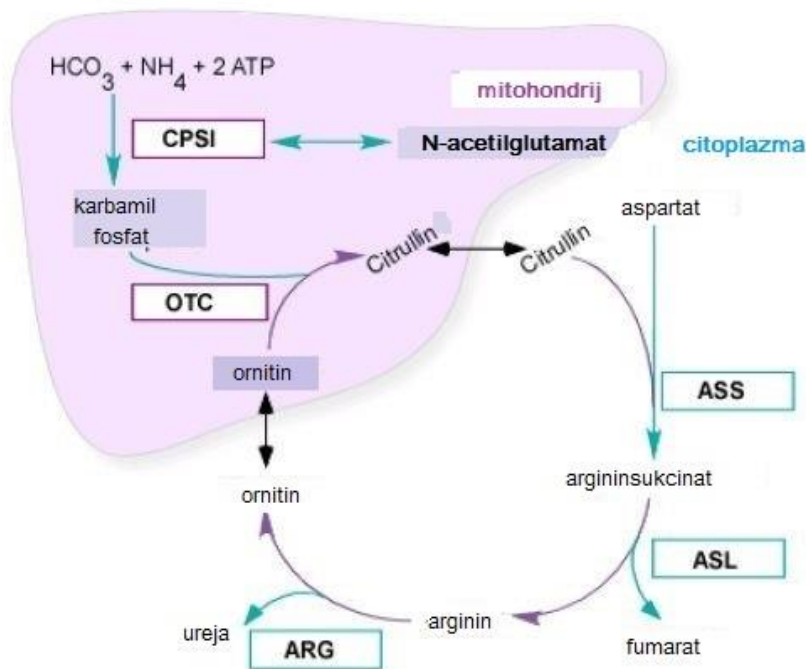
povećavaju koncentraciju slobodnih radikala kisika ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$ ) i dušika ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ); aktivacijom inducibilne dušik oksid sintaze, iNOS (Andreis 2010; Liu i sur. 2011). Nadalje, M1-makrofagi mogu izražavati visoku razinu glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) klase I i klase II antigena te lučiti proteinske čimbenike koji olakšavaju kompleksom posredovanu fagocitozu (Mantovani 2004). Nasuprot tome, M2-makrofagi inducirani su izlaganjem IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$  i glukokortikoidima te luče protuupalne citokine kao što su IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1 i enzim arginazu (Liu i sur. 2011).



**Slika 6. Shema aktivacije M1 i M2 makrofaga** (Preuzeto od: Través i sur. 2012)

Arginaza (engl. *L-arginine amidinohydrolase*, L-arginin amidinohidrolaza) je enzim koji sudjeluje u posljednoj reakciji metaboličkog ciklusa ureje (Slika 7), gdje katalizira pretvorbu aminokiseline L-arginina u L-ornitin i ureju ( $\text{L-arginin} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{L-ornitin} + \text{ureja}$ ). Postoje dvije izoforme ovog enzima, jetrena arginaza-1 i arginaza-2 prisutna u bubrezima, mozgu, prostati, tankom crijevu i mliječnim žlijezdama (Iyer i sur. 2002). Zanimljivo je da se inducibilna dušik oksid sintaza (iNOS) i arginaza natječu za zajednički supstrat, aminokiselinu L-arginin (Campbell i sur. 2013). M1-makrofagi potiču iNOS da katabolizira L-arginin u NO (citostatični i citolitički učinak) i citrulin, dok su M2 makrofagi karakteristični po visokoj ekspresiji arginaze-1 (Arg-1), citosolnog enzima koji katalizira alternativni metabolički put L-arginina u ornitin i poliamine, koji su prekursori u sintezi kolagena i stanične proliferacije (Corraliza i sur. 1994; Rodríguez i Ochoa 2008). Prema tome, povećana regulacija Arg uglavnom

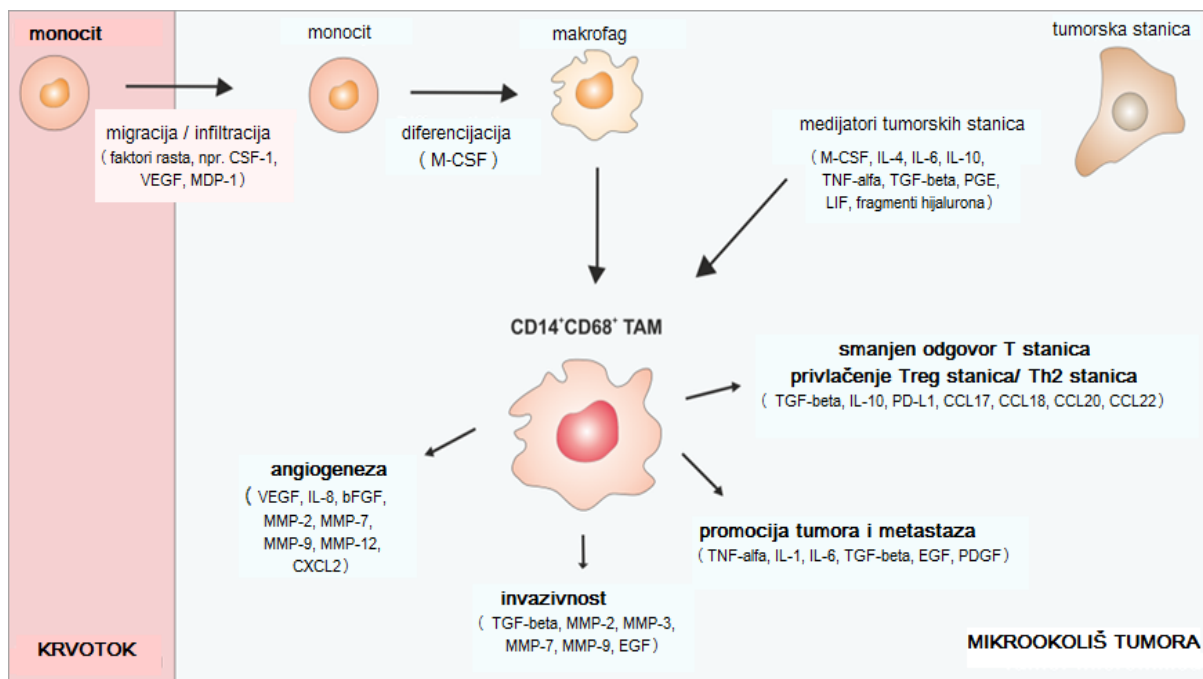
je prisutna u M2 makrofagima koji luče proangiogene čimbenike poput VEGF-a, MMPs-2 i MMPs-9 te posjeduju protuupalno svojstvo popravka oštećenog tkiva, dok je iNOS više prisutna u M1 makrofagima koji luče proupalne citokine i imaju pojačano antimikrobno djelovanje. Matriks metaloproteinaze (MMPs), osobito MMP-2 i MMP-9 su glavni enzimi koji sudjeluju u degradaciji izvanstaničnog matriksa, koji predstavlja prirodnu barijeru invaziji tumora i metastaza te je njihova pretjerana ekspresija uočena kod različitih malignih oboljenja (McCawley i Matrisian 2000; Yang i sur. 2003). U tom smislu, svi čimbenici koji kontroliraju brzinu toka L-arginina između arginaze i iNOS mogu biti važni u regulaciji staničnog rasta kako ne bi došlo do pojave kroničnog oboljenja.



**Slika 7. Ciklus ureje:** CPS1, karbamil fosfat sintaza; OTC, ornitin transkarbamilaza; ASS, arginin sukcinat sintaza; ASL, arginin sukcinat liaza; ARG, Arginaza. (Preuzeto od: Ah Mew i sur. 2013)

### 1.2.2. Makrofagi pridruženi tumoru (engl. *tumour-associated macrophages*, TAMs)

Makrofagi pridruženi tumoru smatraju se ključnom sastavnicom tumorskog mikrookoliša koja može imati različit utjecaj na rast i metastaziranje tumora (podsjećaju na M2-polarizirane makrofage). TAMs potječu od prekursora cirkulacijskih monocita (Slika 8), prethodno regrutiranih u tumorsku regiju kao odgovor na kemokine i citokine koje luče tumorske stanice (Través i sur. 2012). U tumorskoj masi TAMs imaju imunosupresivnu ulogu zbog otpuštanja protuupalnih citokina (TGF- $\beta$ , IL-10 i Arg-1), moduliranja mikrookoliša tumora proizvodnom čimbenika preživljavanja/rasta (npr. VEGF), olakšavanja progresije tumora kroz otpuštanje proangiogenetskih čimbenika (MMP-2 i MMP-9, IL-8, PDGF i TGF- $\beta$ ), te povećanja aktivnosti arginaze i smanjenja aktivnosti inducibilne dušik oksid sintaze (Mantovani i sur. 2009; Través i sur. 2012). Protumorska funkcija TAMs čini ove stanice ciljnim metama za biološko istraživanje protutumorske terapije; povećanje M1 tumoricidne djelotvornosti TAMs i blokiranje M2 tumorske aktivnosti TAMs moglo bi biti ključno u inhibiciji angiogeneze te inhibiciji rasta tumora (Allavena i Mantovani 2012).



**Slika 8. Uloga makrofaga pridruženih tumoru**

(Preuzeto od: <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/Images/MacrophagesInCancerFig1.png>)

## 1.3. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

### 1.3.1. Slobodni radikali i reaktivni spojevi

U fiziološkim uvjetima, stanice sisavaca metaboliziraju oko 95 % kisika ( $O_2$ ) u vodu ( $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2 H_2O$ ), bez stvaranja toksičnih međuprodukata. U normalnim uvjetima, minimalno 5 %  $O_2$  se metabolizira putem jednovalentnih redukcija, nakon četiri različite reakcije ili faze:



Kroz ove četiri reakcije nastaju tri vrlo toksične vrste, dvije od njih su slobodni radikali kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS), superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet -}$ ) i hidroksi radikal ( $\bullet OH$ ). Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) je još uvijek vrlo reaktivni spoj, ali ne i radikalni u strogom smislu (Rodrigo 2009).

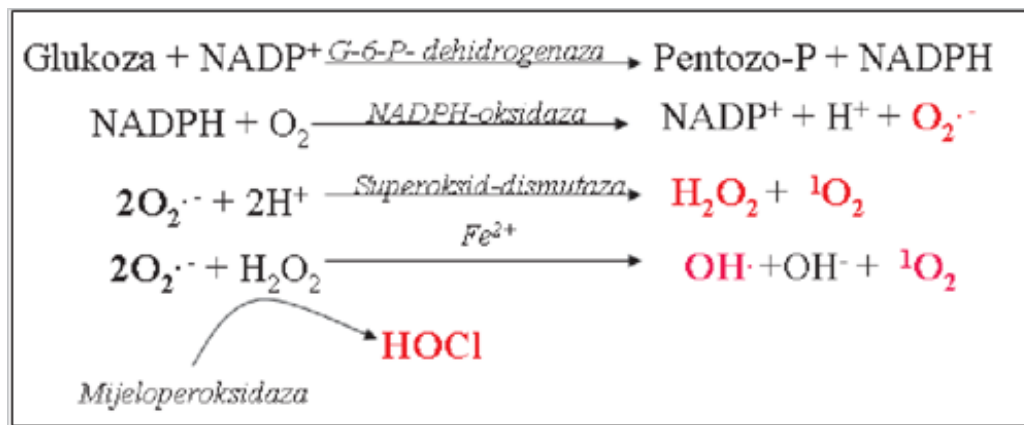
**Tablica 2. Reaktivni spojevi kisika**

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
superoksidni, $O_2^{\bullet -}$	vodikov peroksid, $H_2O_2$
hidroksilni, $OH^{\bullet}$	hipokloritna kiselina, $HOCl$
peroksilni, $ROO^{\bullet}$	ozon, $O_3$
alkoksilni, $RO^{\bullet}$	singletni kisik, $^1O_2$
hidroperoksilni, $HO_2^{\bullet}$	

(Preuzeto od: Štefan i sur. 2007)

Stvaranje ROS-a je fiziološka i normalno osobina bilo kojeg aerobnog organizma prilikom nepotpune redukcije kisika u respiratornom lancu mitohondrija. Međuprodukti (ROS) ne napuštaju kompleks prije završetka procesa, međutim, u nekim patofiziološkim stanjima dolazi do oksidativnog praska (Slika 9) posredovanog NADPH oksidazom pri čemu nastaju superoksidni radikali ( $O_2^{\bullet -}$ ) i mijeloperoksidaze, što dovodi do stvaranja hipokloritne kiseline (Lovrić i sur. 2008; Rodrigo 2009).





**Slika 9. Nastajanje ROS-a u neutrofilnim granulocitima tokom oksidativnog praska**

(Preuzeto od: Stevanović i sur. 2011)

Slobodni radikali su molekule ili atomi koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona (Stevanović i sur. 2011). Iako su sposobni za samostalno postojanje (Aruoma 1994; Close i sur. 2005), slobodni radikali su nestabilni, tj. kemijski visoko reaktivni, zato što nespareni elektron koji se nalaze u njihovoj vanjskoj orbitali teži da se stabilizira sparivanjem s drugim elektronom. Tako, kada radikali reagiraju s neradiklima nastaju novi, tzv. sekundarni slobodni radikali, odnosno dolazi do propagacije i stvaranja čitavog niza radikala (lančana reakcija) koji su također vrlo toksični (Cheeseman i Slater 1993; Close i sur. 2005). Slobodni radikali (Tablica 4 i 5) nastaju uslijed apsorpcije energije zračenja, u redukcijско-oksidijskim reakcijama tijekom patoloških i normalnih fizioloških procesa poput oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, prijenosu elektrona u sustavu citokroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu, oksidacije masnih kiselina u peroksisomima, metabolizmu arahidonske kiseline u staničnim membranama, fagocitozi (Halliwell i Gutteridge 1999; Rodrigo 2009). Slobodni radikali mogu nastati i tijekom enzimske oksidacije i autooksidacije različitih kemijskih spojeva poput tiola, oksihemoglobina, hidrokinona, kateholamina, pri čemu dolazi do redukcije molekularnog kisika i nastajanja superoksida, najčešće uz prisutnost prijelaznih metala (Halliwell 1995). Reakcije oksidacije i redukcije u biološkim sustavima predstavljaju bazu za brojne biokemijske mehanizme metaboličkih promjena, gdje slobodni radikali imaju dvojaku ulogu u organizmu tj. mogu doprinijeti održavanju homeostaze, a mogu i naštetiti te poremetiti normalno funkcioniranje stanice.

ROS ima fiziološke funkcije koje su bitne u stanicama, kao što je mitohondrijsko disanje, putevi proizvodnje prostaglandina i obrana domaćina. Uz reaktivne spojeve kisika, veliku važnost imaju i reaktivni spojevi dušika (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) od kojih su najvažniji

dušikov-(II)-oksid (NO•) i dušikov-(IV)-oksid (NO<sub>2</sub>•). NO• jest relaksacijski čimbenik krvožilnoga sustava, koji kao radikal može reagirati s endogenim radikalima, primjerice sa superoksidnim radikalom, stvarajući peroksinitrite (ONOO<sup>-</sup>) koji su izrazito jaki oksidansi (direktno oštećuju DNA), a pri kiselome pH razgrađuju se do hidroksilnih radikala neovisno o prisutnosti prijelaznih metala (Štefan i sur. 2007). Zbog kratkog poluvremena života njegova biološka aktivnost u velike ovisi o reakciji s superoksidima (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) i njihovoj koncentraciji.

**Tablica 3. Reaktivni spojevi dušika**

Slobodni radikali	Čestice koje nisu radikali
dušikov (II) oksid, NO •	nitrozil, NO nitritna kiselina, HNO <sub>2</sub>
dušikov (IV) oksid, NO <sub>2</sub> •	dušikov (III) oksid, N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> peroksinitrit, ONOO <sup>-</sup> alkilperoksinitrit, ROONO

(Preuzeto od: Štefan i sur. 2007)

Slobodni radikali uzrokuju oštećenja stanice, bilo izravno ili kao intermedijari u različitim signalnim putevima. Slobodni radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu (McCord 2000). Također, prisutnost slobodnih radikala može polučiti i citotoksično djelovanje, što posljedi staničnom smrti, induciranjem mutacija i kromosomskih aberacija, te karcinogenezom (Štefan i sur. 2007). Oksidativne promjene DNA su česte u sisavaca i predložene su kao važan čimbenik koji doprinosi mehanizmima u karcinogenezi, dijabetesu i prirodnom starenju. Oštećenja DNA se smatraju najozbiljnijim ROS/RNS induciranim promjenama; DNA se ne sintetizira *de novo* nego kopira, dolazi do stalnog ponavljanja i nastanka mutacija i genske nestabilnosti. Glavni ROS odgovoran za oštećenje DNA je hidroksi radikal (•OH), koji reagira sa svim komponentama DNA molekule, oštećuje obje purinske i pirimidinske baze i okosnicu deoksiriboze. Između ostalog, oksidativno oštećenje membrane mitohondrija može dovesti do oslobađanja citokroma C, aktiviranja kaspaza i apoptoze.

**Tablica 4. Nastanak ROS-a neenzimskim putem**

<b>Fenton-ova reakcija</b>	$\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \bullet\text{OH} + \text{}^-\text{OH}$
<b>Haber – Weiss-ova reakcija</b>	$\text{O}_2\bullet^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ $\text{Fe(III)} + \text{O}_2\bullet^- \rightarrow \text{Fe(II)} + \text{O}_2$

(Preuzeto od: Rodrigo 2009)

**Tablica 5. Nastanak ROS/RNS enzimskim putem**

<b>Ksantin oksidaza (XO)</b>	$\text{ksantin} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{mokraćna kiselina} + \text{O}_2\bullet^-$
<b>NADPH oksidaza (Nox)</b>	$\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2\bullet^- + \text{H}^+$ $2\text{O}_2\bullet^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
<b>Mijeloperoksidaze (MPO)</b>	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \xrightarrow{\text{MPO}} \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$
<b>Citokrom P450</b>	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 + \text{RH} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{R-OH}$
<b>Dušik oksid sintaza</b>	$\text{L-arginin} + 3/2 \text{NADPH} + \text{H}^+ + 2\text{O}_2 \rightleftharpoons$ $\text{citrulin} + \text{NO} + 3/2 \text{NADP}^+$

(Preuzeto od: Rodrigo 2009)

### 1.3.2. Lipidna peroksidacija

Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*) u staničnim membranama podložne su oštećenjima koja uzrokuju reaktivni kisikovi spojevi (Ambriović Ristov 2007). Kao posljedica ovih oštećenja dolazi do pojave lančane reakcije lipidne peroksidacije čiji su krajnji produkti reaktivni aldehidi (heksanal, malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)) i izomeri prostaglandina (izoprostani). Iako se zovu „završni produkti lipidne peroksidacije“, oni mogu u određenim uvjetima nastaviti lančanu reakciju oksidacijskog oštećenja. Njihova je reaktivnost niža od reaktivnosti slobodnih radikala, ali dovoljno velika da mogu reagirati s molekulama u okolini te tako oštetiti stanice pa i uzrokovati staničnu smrt. Budući da su dugoživi, mogu se kretati od mjesta nastanka i napadati „ciljeve“ koji su daleko od mjesta početnog nastanka slobodnih radikala, bilo unutarstanično ili izvanstanično (Esterbauer i sur. 1991). Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u jesu  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ , te  $\text{RO}_2\cdot$  (Štefan i sur. 2007). U procesu lipidne peroksidacije sudjeluju i ioni bakra i željeza. Pod djelovanjem iona željeza ili bakra, lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte – od aldehida, ketona, ugljikovodika (etana, etena, pentana), epoksida, do aktivnih radikala (Štefan i sur. 2007). Lipidni hidroperoksidi lako reagiraju s  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  pri čemu nastaju alkoksi radikali i lipidni peroksilni radikali, na taj način dolazi do grananja lančane reakcije procesa lipidne peroksidacije (Aikens i Dix 1991; Armstrong 1994). Intenzivna lipidna peroksidacija u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema  $\text{H}^+$  i drugim ionima, te do moguće rupture stanice i otpuštanja njena sadržaja (Štefan i sur. 2007). Pokazano je da lipidna peroksidacija ima ulogu u procesu starenja, te mnogim patološkim stanjima kod čovjeka uključujući neurodegenerativne bolesti, dijabetes, bolesti jetre, kardiovaskularne bolesti i tumore (Halliwell 2000; Catala 2009; Hulbert 2010; Reed 2011).

### 1.3.3 Oksidativni stres i antioksidativni status obrane

Prvi radikal kisika otkrio je Linus Pauling 1930. i opisao ga kao superoksid. Od tih godina do danas, bile su potrebne stotine daljnjih istraživanja kako bi se postigla sadašnja saznanja o povezanosti oksidativnog stresa s različitim i na izgled ne povezanim bolestima. Reaktivne vrsta, uglavnom slobodnih radikala, dio su normalne fiziologije i mogu biti korisne ukoliko se proizvode u niskim koncentracijama. Međutim, u visokim koncentracijama dovode do narušavanja endogenog sustava antioksidativne obrane što vodi k narušavanju homeostaze i nastanku bolesti (dijabetes, hipertenzija, preeklampsije, ateroskleroza, akutno zatajenje bubrega, Alzheimer i Parkinsonove bolesti i između ostalog malignih oboljenja). U normalnim uvjetima stopa formiranja oksidansa je uravnotežena sa stopom uklanjanja oksidansa, dok, neravnoteža između prooksidanata i antioksidanata rezultira nastankom oksidativnog stresa, koji svojim produljenim djelovanjem neminovno dovodi do smrti stanice. Organizam se nalazi pod stalnim djelovanjem slobodnih radikala koji nastaju tijekom normalnih metaboličkih procesa i imunološke obrane. Razvoj specifičnog antioksidativnog sustava obrane od štetnog djelovanja slobodnih radikala omogućio je organizmima da opstanu u sredini bogatoj kisikom. Taj složeni sustav čine antioksidativni enzimi (glutation peroksidaza, superoksid dismutaza i katalaza) i molekule (glutation, albumini, mokraćna kiselina, vitamini A, E, C i karotenoidi). Navedeni antioksidansi (Tablica 6) sprečavaju stvaranje i/ili odstranjuju već stvorene slobodne radikale te ograničavaju stvaranje i širenje lančanih reakcija. Povećana razina ROS-a i/ili RNS-a u stanici ima značajan utjecaj, bilo da dovodi do neispravne stanične funkcije, starenja ili bolesti. Stoga, bolje razumijevanje uloge reaktivnih radikala u normalnom staničnom signaliziranju i bolesti, kao i povezanost patologije s oksidativnim stresom potrebno je za razvoj terapijskih alata.

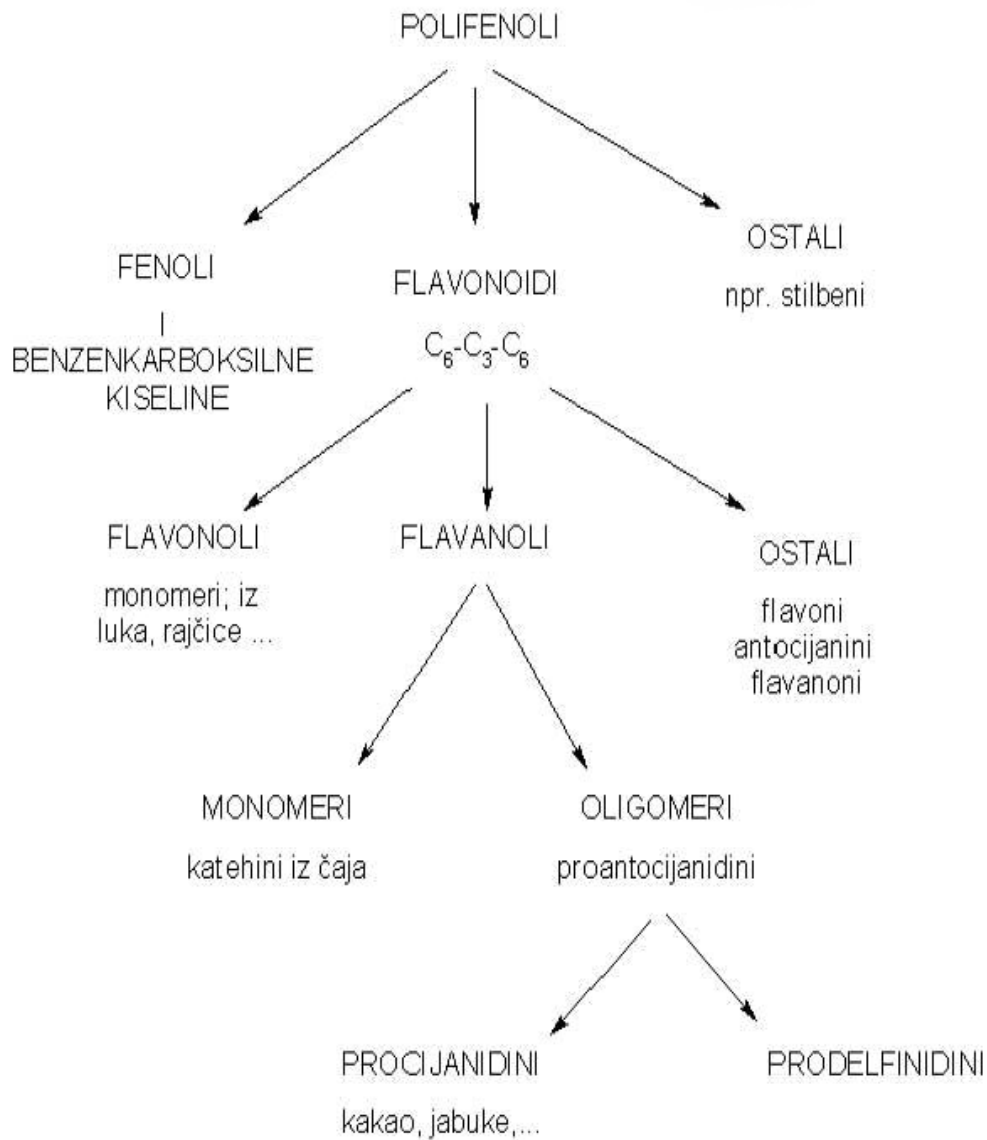
**Tablica 6. Antioksidativni sustav**

<b>Unutarstanični antioksidansi</b>	
superoksid dismutaze	katalički uklanjaju $O_2\bullet^-$
katalaza	uklanja $H_2O_2$ kada je prisutan u velikim koncentracijama
glutation peroksidaze	uklanjaju $H_2O_2$ kada je prisutan u malim koncentracijama; također uklanjaju organske hidroperokside
<b>Membranski antioksidansi</b>	
vitamin E	antioksidacijsko djelovanje ostvaruje kidanjem lanaca
$\beta$ -karoten	ima sposobnost uklanjanja singletnog kisika i slobodnih radikala
koenzim Q	ima antioksidacijsko djelovanje u respiratornome lancu
<b>Izvanstanični antioksidansi</b>	
transferin	veže ione željeza
laktoferin	veže željezo pri nižim vrijednostima pH-a
haptoglobin	veže hemoglobin
hemopleksin	veže hem
albumin	veže bakar, hem i uklanj $HOCl$
ceruloplazmin	veže ione bakra, koristi vodikov peroksid za reoksidaciju bakra
EC – SOD	katalički uklanja superoksidni anion
EC – GSHPx	katalički uklanja hidroperokside

(Preuteto od: Štefan i sur. 2007)

#### 1.4. POLIFENOLI

Polifenoli su velika skupina fitokemikalija koje nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka i imaju bitan učinak na normalne fiziološke procese u biljci, poput rasta, pigmentacije, rezistencije na patogene, zaštite od UV zračenja i drugo. Danas je poznato da te tvari imaju i važnu ulogu u fiziološkim procesima ljudskog organizma. Štiteći membrane ljudskih stanica od oštećenja slobodnim radikalima, doprinose prevenciji brojnih bolesti vezanih uz oksidativni stres. Radi se o vrlo heterogenoj skupini spojeva, a osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Escarpa i Gonzalez 2001). Do danas je poznato približno 8000 polifenolnih molekula, a najznačajnije skupine su: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Bravo 1998; Escarpa i Gonzalez 2001; Manach i sur. 2004; Biesalski 2007). Znanstveno su dokazana mnogobrojna biološka djelovanja polifenola, kao što su antioksidativno, antiradikalno, protuupalno, protumikrobno, imunomodulatorno, protualergijsko, protukancerogeno, hipoglikemijsko i druga (Yoon i Baek 2005; Biesalski 2007). Stoga literaturni podatci sve snažnije podupiru hipotezu da bi polifenoli, uz vitamine i minerale, mogli biti korisni u spriječavanju i liječenju različitih bolesti vezanih uz oksidativni stres, kao što su primjerice maligna oboljenja, kronične upalne, alergijske, bolesti srca i krvožilnog sustava, neurodegenerativne i druge bolesti (Bohm i sur. 1998; Middleton i sur. 2000).

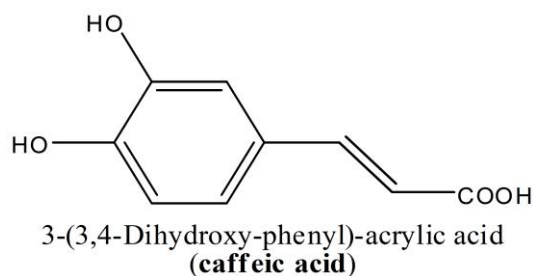


**Slika 9. Osnovna podjela polifenola** (Preuzeto od: Berend i Grabarić 2008)



### 1.4.1. Kafeinska kiselina

Kafeinska kiselina (3, 4-dihidrocinamična kiselina;  $C_{15}H_{10}O_4$ ) je prirodna organska molekula koja sadrži fenolne i akrilne funkcionalne skupine (Slika 10). Kafeinska kiselina kao i njezin derivat CAPE (engl. *caffeic acid phenethyl ester*) široko su rasprostranjeni spojevi u biljnim tkivima jer su glavni intermedijeri u sintezi lignina, a njihova količina ovisi o vrsti i podneblju. Jedna je od najzastupljenijih sastavnica propolisa (Velikova i sur. 2000). Nalazimo je u obliku monomera kao slobodnu kiselinu, u obliku oligomera ili konjugiranu s organskim molekulama s kojima tvori glukozide i estere. Dokazano je da smanjuje proizvodnju aflatoksina vrste *Aspergillus flavus* za više od 95 % (Kim i sur. 2008). Potkožna i oralna primjena kafeinske kiseline i fenetil ester kafeinske kiseline (CAPE) smanjuje metastaze tumora u plućima i rast tumora (Oršolić i sur. 2003). Takvi protutumorski učinci mogli bi biti posredovani selektivnom supresijom aktivnosti metaloproteinaza 9 (MMP-9) i regulacijom transkripcije nuklearnog čimbenika kapa B (NF-kB). Rezultati istraživanja također pokazuju da kafeinska kiselina i njen derivat suprimiraju akutnu upalnu reakciju (Orban i sur. 2000). Ova protuoksidativna, protuupalna i protutumorska svojstva izražena su i kod zaštite stanica kože izloženih UV zračenju (Oršolić i sur. 2003). Pored blagotvornih učinaka, pokazalo se da oralna primjena visokih koncentracija kafeinske kiseline u štakora uzrokuje intestinalne papilome, što upućuje na kancerogena svojstva kafeinske kiseline (Hirose i sur. 1997).



Slika 10. Kafeinska kiselina (Preuzeto od: <http://www.agrool.gr/files/caffeic%20acid.jpg>)

## 1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je proučiti učinke kafeinske kiseline (CA) na rast tumora, angiogenezu, funkcionalnu sposobnost makrofaga, polarizaciju makrofaga i oksidacijski stres na modelu Swiss albino miša, nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora.

Želim naći funkcionalnu poveznicu između:

1. Oksidacijskog stresa, peritonealne angiogeneze i rasta tumora
2. Funkcionalne sposobnosti makrofaga i njihovu učinkovitosti na tumor i angiogenezu
3. Polarizacije makrofaga i aktivnosti M1 i M2 makrofaga nazočnih u slezeni i acitesu tumora kroz anлізу dušik oksida

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. MATERIJALI**

#### **2.1.1. Tumorske stanice**

Erlichov 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 Erlichovog ascitesnog tumora, dolazi do znatnog povećanja lipidne peroksidacije te do smanjenja količine antioksidativnih enzima. Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) održavali smo serijskim presađivanjem stanica svakih 7 ili 9 dana u obliku ascitesa injiciranog intraperitonejski (*ip*) u Swiss albino miševe. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 5 mL fiziološke otopine i lagane masaže trbušne stijenke, napravili smo podužni rez i otvorili peritonejsku šupljinu miša. Pasteurovom pipetom uzeli smo peritonejsku tekućinu s tumorskim stanicama i razrijedili s fiziološkom otopinom (0, 9 % otopina natrij klorida, Braun) do ciljane koncentracije  $2,5 \times 10^6$  EAT stanica/0, 5 mL. Broj živih stanica odredili smo brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker-Türkovoju komorici. Unos EAT stanica u peritonejsku šupljinu miša predstavlja 0. dan pokusa.

#### **2.1.2. Pokusne životinje**

U istraživanju smo koristili Swiss albino miševe uzgojene u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Istraživanje smo proveli na ukupno 60 Swiss albino miševa, podjeljenih na 10 skupina sa po 5 i 7 životinja s obzirom na obradu (Tablica 7).

Istraživanje smo proveli prema etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19, 1999. ) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

### **2.1.3. Polifenol: kafeinska kiselina (CA)**

Kao antioksidans smo koristili kafeinsku kiselinu (Caffeic acid,  $C_9H_8O_4$ ,  $M_r = 180,16$  g/mol, točka tališta = 223 do 225 °C) proizvođača Sigma-Aldrich Corporation, SAD.

### **2.1.4. Otapalo**

Kao otapalo koristili smo fiziološku otopinu; 0,9 % NaCl (Natrijev klorid 0,9 % otopina za infuziju, proizvođača B. Braun Adria d. o. o., Zagreb, HR).

### **2.1.5. Kemikalije**

Glutation reduktaza (enzim, iz pekarskog kvasca), 100-300 U/mg proteina (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); Folin i Ciocalteu's fenol reagens (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); citokrom C iz goveđeg srca 100 mg (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); ksantin oksidaza, Buttermilk 50 U, 1,05 U/mg proteina (Calbiochem, SAD); NADPH tetranatrijeva sol,  $M_r = 833,35$  mg/mol (Applichem GmbH, Njemačka); DTNB (5, 5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina),  $M_r = 396,36$  g/mol (Fluka, Švicarska); Albumin iz goveđeg seruma, BSA (Sigma-Aldrich, SAD); SDS, natrij dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, SAD); TBA, tiobarbituratna kiselina,  $M_r = 144,15$  g/mol (Applichem GmbH, Njemačka); L-glutation reduktaza,  $M_r = 307,33$  g/mol (Applichem GmbH, Njemačka); Griess reagent system (Promega, SAD).

### **2.1.6. Instrumenti**

Centrifuga: Centrifuge 5702 (Eppendorf); Mikro 200R (Hettich)

Spektrofotometar: UV-160 (Shimadzu); Libra S22 (Biochrom)

Mikrotitarski čitač: Microplate reader Model 550 (Bio-Rad); iEMS reader MF (Labsystems)

Svjetlosni mikroskop: Nikon Eclipse E600; Olympus Cx21

Kamera za mikroskop: AxioCam ERc 5s (Zeiss)

Program za obradu slike: ZEN 2 (blue edition)

## **2.2.2. METODE**

### **2.2.1. Praćenje promjena tjelesne težine**

Prije početka izvođenja pokusa kao i tijekom izvođenja pokusa životinje smo pojedinačno označili i izvagali na temelju čega smo ih svrstali u skupine sa sličnom tjelesnom težinom ( $\pm 2$  g). Na temelju težine životinja za pojedinu skupinu smo odredili količinu pojedinačnih pripravka koje smo davali tijekom pokusa, te je praćena promjena težine tijekom pokusa. Mjerenje tjelesne težine (TT) vršeno je digitalnom vagom.

### **2.2.2. Obrada životinja**

Tumor je izazvan injiciranjem  $2, 5 \times 10^6$  stanica EAT-a (0. dan pokusa), a obradu životinja s EAT tumorom (Tablica 7) započeli smo 2. dan (1. dan pokusa) *ip* injiciranjem kafeinske kiseline (CA) tijekom 10 dana u nizu i/ili od 5. dana (EAT stanice u progresiji rasta) te injiciranjem CA svaki drugi dan (3x). Nakon 24 sata od završetka obrade životinje smo anestezirali mješavinom ksKsilopana (0, 5 mL), Narketana (1 mL) i vode (8, 5 mL) *ip* 0, 1 mL/10 g, te žrtvovali kako bi se izolirali tkivo (jetra, slezena, bubreg i peritonealna ovojnica) i ascites za daljnju analizu.

**Tablica 7. Pokusne skupine i način obrade kafeinskom kiselinom**

Oznaka skupine (5 x 7 miševa)	Sastav pokusne otopine	Doziranje	Početak obrade	Period obrade (dani)
0. Kontrola	0, 9 % NaCl	0, 5 mL svaki dan	2. dan od injiciranja EAT	10
1. CA 40 mg/kg	Otopina 36 mg kafeinske kiseline na 14 mL 0, 9 % NaCl	40 mg/kg svaki dan	2. dan od injiciranja EAT	10
2. CA 80 mg/kg	Otopina 36 mg kafeinske kiseline na 7 mL 0, 9 % NaCl	80 mg/kg svaki dan	2. dan od injiciranja EAT	10
3. CA 40 mg/kg	Otopina 36 mg kafeinske kiseline na 14 mL 0, 9 % NaCl	40 mg/kg svaki drugi dan	5. dan od injiciranja EAT	3
4. CA 80 mg/kg	Otopina 36 mg kafeinske kiseline na 7 mL 0, 9 % NaCl	80 mg/kg svaki drugi dan	5. dan od injiciranja EAT	3
<b>PREŽIVLJAVANJE</b>				
Oznaka skupine (5 x 5 miševa)	Sastav pokusne otopine	Doziranje	Početak obrade	Period obrade (dani)
5. Kontrola	0, 9 % NaCl	0, 5 mL svaki dan	2. dan od injiciranja EAT	10
6. CA 40 mg/kg	Otopina 36 mg kafeinske kiseline na 14 mL 0, 9 % NaCl	40 mg/kg svaki dan	2. dan od injiciranja EAT	10
7. CA 80 mg/kg	Otopina 36 mg kafeinske kiseline na 7 mL 0, 9 % NaCl	80 mg/kg svaki dan	2. dan od injiciranja EAT	10
8. CA 40 mg/kg	Otopina 36 mg kafeinske kiseline na 14 mL 0, 9 % NaCl	40 mg/kg svaki drugi dan	5. dan od injiciranja EAT	3
9. CA 80 mg/kg	Otopina 36 mg kafeinske kiseline na 7 mL 0, 9 % NaCl	80 mg/kg svaki drugi dan	5. dan od injiciranja EAT	3

### **2.2.3. Protutumorska učinkovitost kafeinske kiseline**

#### *2.2.3.1. Praćenje preživljenja životinja*

Pratili smo preživljenje i spontano uginuće životinja nositelja tumora EAT (0-36 dana), ip obrađenih kafeinskom kiselinom (Tablica 7).

#### *2.2.3.2. Određivanje ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini*

Injicirali smo 3 mL fiziološke otopine u trbušnu šupljinu miševa, a zatim smo izvadili peritonealnu tekućinu za analizu i razrijedili je s fiziološkom otopinom do volumena od 10 mL. Nakon toga smo pomoću Bürker-Türkove komorice izbrojili ukupan broj stanica u peritonealnoj tekućini.

#### *2.2.3.3. Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine*

Eksperimentalnim životinjama smo 24 sata nakon obrade svih pokusnih skupina uzeli peritonealnu tekućinu i napravili razmaze na predmetnim stakalcima. Zatim smo ih ostavili da se osuše na sobnoj temperaturi. Preparate smo prvo obojili bojom May Grünwald 7 minuta, a zatim Giemsa 15 minuta (1 dio Giemse : 2 dijela vode). Diferencijalnu analizu preparata vršili smo brojenjem limfocita, makrofaga, neutrofila, eozinofila i bazofila na 100 stanica, pod svjetlosnim mikroskopom, na povećanju 400x. Napravili smo po četiri preparata za svaku skupinu.

### **2.2.4. Učinak kafeinske kiseline na angiogenezu**

#### *2.2.4.1. Priprema histoloških preparata peritonejske ovojnice*

Nakon izolacije stanica iz peritonealne šupljine, izrezali smo dio peritonejske ovojnice, isprali fiziološkom otopinom i fiksirali u 4 % - tnom formaldehidu (10 mL 36 % formaldehida i 90 mL PBS-a). Nakon fiksacije tkivo smo pripremili parafinskom tehnikom i preprati debljine 8

um obojali korištenjem Merck-ovg Mayer's hemalauna i 0, 5 % otopine eozina. Preparate smo histološki pregledali na svjetlosnom mikroskopu CX21 proizvođača Olympus.

#### *2.2.4.2. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti*

Kvantitativno mjerenje prožiljenosti peritonealne ovojnice proveli smo određivanjem prosječne gustoće prožiljenosti peritonealne ovojnice (MVD) u područjima najintenzivnije prokrvljenosti (VS). Mjerenje smo inapravili 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 do 1 mm<sup>2</sup>
- 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

#### **2.2.5. Polarizacija makrofaga slezene i makrofaga nazočnih u ascitesu**

##### **2.2.5.1. Priprema radnih otopina za analizu NO**

###### *2.2.5.1.1. Izolacija i stimulacija makrofaga slezene s LPS-om*

Slezena smo izvicali i propasirali kroz mrežicu sa špatulom, te s mrežice isprali stanice s fiziološkom otopinom (do 5 mL). Nakon toga, kako bi razbili stanice, staničnu suspenziju smo par puta provukli kroz iglu i špricu. Propasirane stanice smo prebacili u epruvete i sve epruvete izjednačili do 6 mL s fiziološkom otopinom. U laminaru (sterilno) smo sterilne epruvete sa čepom napunili sa 3 mL limfoprepa. Potom smo pod kutem od 180° na limfoprep nasložili 6 mL stanične suspenzije i centrifugirali na 2200 rpm/20 min/+4°C. Nakon centrifugiranja je nastao bijeli prsten, iz kojeg smo pipetom pokupili sloj stanica leukocita i prebacili u novu



epruvetu, te izjednačili volumen u svim epruvetama. Nakon centrifugiranja na 10000 rpm/15 min/+4 °C uklonili smo nadtalog. Preostali talog smo resuspendirali u 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a po jažici (pločice s 24 jažice). Sve smo inkubirali 1 sat na 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Medij smo ukloili, jažice isprali s fiziološkom otopinom i potom ujažice je dodali 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a i 0, 1 µg/mL LPS-a. Inkubirali smo 24 sata na 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Nakon inkubacije sav nadtalog smo prebacili u eppendorf epice i pohranili na -20 °C, za NO analizu.

#### 2.2.5.1.2. *Izolacija i stimulacija makrofaga ascitesa s LPS-om*

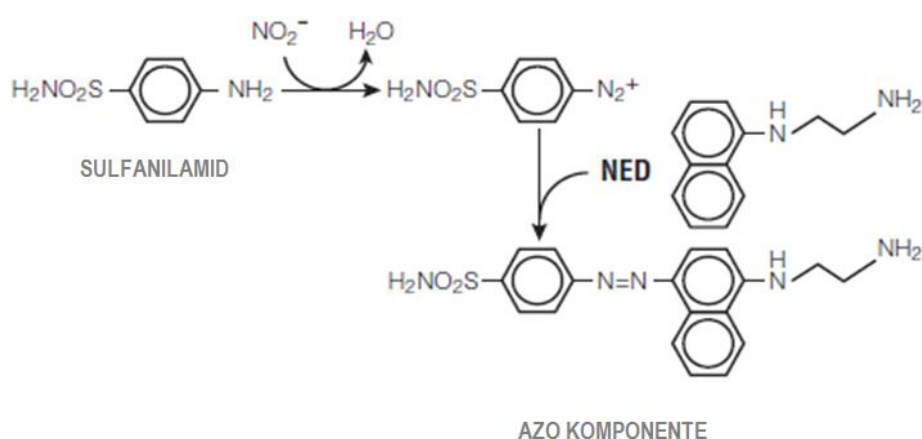
Iz obrađenih životinja i kontrole uzeli smo 1 mL ascitesa i inkubirali 3 sata na 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>, u pločicama s 24 jažice. Potom smo uklonili nadtalog s tumorskih stanica (na dnu su ostali adherirani makrofagi) i jažice smo isprali s fiziološkom otopinom. Dodali smo 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a i 0, 1 µg/mL LPS-a, te inkubirali 24 sata na 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Nakon 24 sata pokupili smo nadtalog i pohranili na -20 °C za NO analizu. Po jažici je dodano 500 µL 0, 025 % Tripsina (podizanje adheriranih makrofaga) i inkubirano 3 minute. Pod svjetlosnim mikroskopom je provjereno da li su se stanice odvojile od podloge. Tripsin je neutraliziran dodavanjem 1 mL DMED medija s 10 % FBS-om, i stanice su dodatno odvojene od podloge pomoću strugača, te pohranjene na -20 °C za NO analizu.

#### 2.2.5.1.3. *Izolacija makrofaga ascites bez stimulacije s LPS-om*

Preostali ascites obrađenih životinja i kontrole izjednačen s fiziološkom otopinom po volumenu inkubirli smo 3 sata na 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> u poličicama sa 6 jažica. Nakon inkubacije nadtalog smo centrifugirali na 2200 rpm/10 min/+4 °C. Dobiveni nadtalog je pohranjen na -20 °C za analizu NO. Po jažici smo dodali 500 µL 0, 025 % Tripsina (podizanje adheriranih makrofaga) i inkubirali 3 minute. Pod svjetlosnim mikroskopom provjerili smo da li su se stanice odvojile od podloge te neutralizirali Tripsin dodavanjem 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-om, i stanice su dodatno odvojene od podloge pomoću strugača, te pohranjene na -20 °C za analizu NO.

### 2.2.5.2. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

Ova analiza se temelji na reakciji diazotacije koju je prvi opisao Griess 1879. Brojne stanice sisavaca sintetiziraju dušikov oksid oksidacijom L-arginina pomoću enzima dušik oksid sintetaze. U uvjetima *in vitro* dušikov oksid se brzo metabolizira u stabilne produkte, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ili nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), ovisno oksidira li se molekularnim kisikom ili superoksidnim anionom, i kao takav se izlučuje izvan stanice u hranjivu podlogu (Ambriović Ristov i sur. 2007). Sinteza dušikovog oksida može se indirektno odrediti spektrofotometrijski Griessovom metodom, mjereći nitrite i nitrate akumulirane u tekućoj hranjivoj podlozi u kojoj rastu stanice. Mi smo koristili kit *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD), koji za analizu  $\text{NO}_2^-$  koristi 1% sulfanilamid pripremljen u 5 % fosfatnoj kiselini i 0,1 % N-1- naftiletilediamin dihidroklorid (NED). U mikrotitarsku ploču smo stavili 50  $\mu\text{L}$  uzorka u triplikatu, potom smo dodali 50  $\mu\text{L}$  sulfanilamid otopine i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon prve inkubacije smo dodali 50  $\mu\text{L}$  NED otopine i opet inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon druge inkubacije (ružičasto obojenje uzorka) smo očitali apsorbanciju na 540 nm na uređaju Labsystems iEMS Reader MF. Kao standard upotrijebili smo 0,1 M natrijev nitrit u koncentracijama od 0 do 100  $\mu\text{M}$ . Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nitrita određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunali smo koncentraciju  $\text{NO}_2^-$  u uzorcima. Koncentracija  $\text{NO}_2^-$  izražena je kao  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ .



Slika 12. Kemijska reakcija nastala mjerenjem  $\text{NO}_2^-$  koristeći Griess reagens sustav

(Preuzeto od:

<http://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol/>)

## **2.2.6. Određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga iz peritonealne tekućine**

Funkcionalnu aktivnost makrofaga odredili smo 24 sata nakon deset dana obrade pokusnih životinja i kontrole. Iz svih skupina smo uzeli peritonealnu tekućinu za određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga i napravili razmaze na predmetnim stakalcima (po 4 stakalca za svaku skupinu) te osušili na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Zatim smo fosfatnim puferom (PBS) isprali neadherirane stanice, a adherirane stanice koje su ostale na stakalcima smo inkubirali 1 sat u hranjivom mediju 199 koji sadrži 10 nM HEPES-a na temperaturi 37 °C. Poslije inkubacije uklonili smo hranjivi medij, a preparate fiksirali 2, 5 % -tnim glutaraldehidom. Zatim smo preparate obojili 5 % -tnom otopinom Giemse. Svjetlosnim mikroskopom, na povećanju 400x, vršili smo analizu preparata. Brojali smo 200 makrofaga po svakom preparatu i određivali udio aktiviranih stanica u odnosu na udio neaktivnih stanica.

## **2.2.7. Određivanje koncentracije parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite**

### *2.2.7.1. Izolacija i priprema tkiva*

Izolirana tkiva (bubrezi, jetra i slezena) smo 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. Dobivene homogenate smo centrifugirali na 15000 okretaja kroz 15 min na 4 °C, nakon centrifugiranja odvojili nadtalog, razrijedili ga 10 puta (100 µL nadtaloga i 900 µL fosfatnog pufera) i sve uzorke pohranili na -20 °C do analize.

### 2.2.7.2. Određivanje proteina metodom po Lowry-u

Količinu proteina u tkivima odredili smo metodom po Lowry-u (1951). Ova metoda temelji se na činjenici da u lužnatim uvjetima divalentni ion bakra tvori kompleks s peptidnim vezama. Pritom se reducira u monovalentni ion bakra.  $\text{Cu}^+$  i ostaci tirozina, triptofana i cisteina iz proteina reagiraju s Folinovim reagensom, pri čemu nastaje nestabilni produkt, a on se zatim reducira do molibden/volfram plavog ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ).

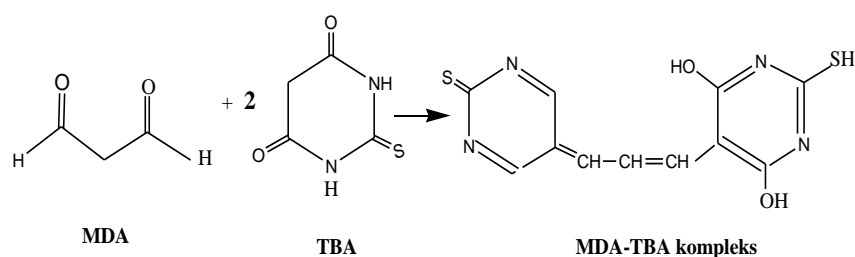
Metodom po Lowry-u odredili smo proteine u ascitesu, bubrezima, jetri i slezeni miša. Sve je rađeno u duplikatima. Uzorci su razrijeđeni u PBS-u: ascites, bubreg i slezena 50 puta, a jetra 20 puta. U epruvete smo dodali po 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D i inkubirali 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodali smo 200  $\mu\text{L}$  otopine E nakon čega smo snažno vorteksirali i inkubirali 30 min na sobnoj temperaturi. Količinu proteina odredili smo na spektrofotometru mjerenjem apsorbcije na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard upotrijebili smo albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) 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 apsorbcije o koncentracije BSA odredili smo nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunali smo koncentraciju proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli:  $c = ((A_{uzorka} - b_{st. krivulje}) / \text{nagib pravca st. krivulje}) \times \text{razrijeđenje}$ . Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL.

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

Otopina D	Pomiješati otopine u omjeru 48:1:1 (A:B:C) <b>A: 2 % (w/v) <math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math> u 0, 1M NaOH</b> 9, 6 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ + 480 mL 0, 1M NaOH <b>B: 1 % (w/v) natrij-kalij tartarat u <math>\text{dH}_2\text{O}</math></b> 0, 1 g natrij-kalij tartarat + 10mL $\text{dH}_2\text{O}$ <b>C: 0, 5 % (w/v) <math>\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}</math> u <math>\text{dH}_2\text{O}</math></b> 0, 05 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 10 mL $\text{dH}_2\text{O}$
Otopina E	Pomiješati Folin i Ciocalteu's fenol reagens i $\text{dH}_2\text{O}$ u omjeru 2:1

### 2.2.7.3. Mjerenje količine lipidne peroksidacije

Količinu lipidne peroksidacije odredili smo modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. 2007. U metodi se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Metoda koja se najčešće koristi za određivanje koncentracije MDA u biološkom uzorku je derivatizacija MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i nastaje MDA-(TBA)<sub>2</sub> kompleks. Reakcija se odvija u kiselim uvjetima i na visokoj temperaturi pri čemu nastaje crveni fluorescentni derivat MDA-(TBA)<sub>2</sub> čija koncentracija se može izmjeriti spektrofotometrijski pri valnoj duljini 532 nm. Princip ove metode se zasniva na sljedećoj reakciji:



**Slika 13. Mehanizam reakcije TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom**

(Preuzeto od: <http://www.supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/9203>)

U eppendorf epruvetu dodali smo 100  $\mu$ L homogenog uzorka i 1,6 mL reagensa A. Otopinu smo zatim stavili u vodenu kupelj na 95 °C na 60 minuta. Nakon toga otopinu smo naglo ohladili na ledu prilikom čega su se nastale folikule slegnule na dno. Nadtalog smo odvojili i izmjerili apsorbanciju pri 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izračunali smo prema sljedećoj formuli:  $c = (A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese}) / (\epsilon \times V_{uzorka} \times c_{proteina\ uzorka})$ , te je izražena kao nmol MDA po mg proteina.

**Tablica 9. Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA**

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

#### 2.2.7.4. Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze odredili smo spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984). U toj metodi aktivnost katalaze određuje se kao količina potrošenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

U reakcijsku smjesu u kivetu ukupnog volumena 1 mL dodali smo 980 µL 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je uzorak odgovarajućeg razrijeđenja. Nakon toga na spektrofotometru mjerili smo smanjenje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri 240 nm tijekom jedne minute. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon = 39, 4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) prema formuli:  $c = (A_{\text{uzorka}} / (\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times l)) \times \text{razrijeđenje}$ , gdje je  $l$  jednak putu koji zraka svijetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm. Rezultat je izražen kao U/mg proteina što odgovara µmol razgrađenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po minuti po miligramu proteina.

#### 2.2.7.5. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

Koncentraciju ukupnog glutationa odredili smo prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5, 5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična

kiselina (TNB) koja apsorbira pri valnoj duljini 405-414 nm. Osim TNB, stvara se i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanak TNB proporcionalna je recilirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Koncentracija ukupnog GSH mjeri se u mikrotitarskoj pločici. U jednu jažicu dodali smo 20  $\mu\text{L}$  uzorka razrijeđenog 40 puta, 40  $\mu\text{L}$  0, 035 M HCl i 40  $\mu\text{L}$  10 mM DTNB, te mjerili apsorbanciju na valnoj duljini od 415 nm. Zatim smo dodali 100  $\mu\text{L}$  otopine GR i NADPH te mjerili se apsorbanciju tijekom 5 min. Priprema navedenih otopina prikazana je u Tablici 10. Za standard koristili smo koncentraciju reduciranog GSH (0-100  $\mu\text{M}$ ). Nacrtni 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:

$$c = ((\text{nagib pravca uzorka} - \text{nagib pravca slijepe probe}) / \text{nagib pravca standarda}) \times \text{razrijeđenje}.$$

Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao  $\mu\text{M}$  GSH po mL proteina.

**Tablica 10. Priprema otopine za određivanje koncentracije GSH**

0, 5 M pufer PBS	<b>17 mL 1 M <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}</math></b> i (3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i $\text{dH}_2\text{O}$ do 17 mL) <b>183 mL 1 M <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}</math></b> (65, 5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i $\text{dH}_2\text{O}$ do 183mL)
0, 5 M EDTA	37, 2g EDTA u 200 mL $\text{dH}_2\text{O}$
0, 5M 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 u $\text{dH}_2\text{O}$ do 200 mL
10 mM DTNB	20 mg DTNB i 0, 5M pufer PBS s 0, 5 M EDTA do 5 mL
0, 8 mM NADPH	6, 67 mg NADPH i 0, 5M pufer PBS s 0, 5 M EDTA do 10 mL
Mješavina GR	20 $\mu\text{L}$ GR (50 U/mL) u 9980 $\mu\text{L}$ 0, 8 mM NADPH

### 2.2.7.6. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određena je prema metodi po Flohé i Ötting (1971). Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

U ovoj metodi korištene su dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 11) te je apsorbancija u spektrofotometru mjerena na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze. U kivetu je dodano redom: 25  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O, 1,45 mL otopine A i 15-30  $\mu$ L ksantin oksidaze (0,8 U/mL) (Tablica 2). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja mjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti oko 0,025 U/min. U ovom slučaju volumen XOD koji je odgovarao bio je 25 – 30  $\mu$ L. Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, analizirali smo uzorke. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH<sub>2</sub>O dodano je 25  $\mu$ L 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 formuli:  $\% \text{inhibicije} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{slijepa proba}}) \times 100$ . Enzimska aktivnost SOD računa se prema formuli:  $\text{aktivnost SOD} = 10^{((\% \text{inhibicije} + 12,757) / 30,932)}$ . Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina.

**Tablica 11. Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD**

50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O u 50 mL dH <sub>2</sub> O) i 183 mL (5,678 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> u 200 mL dH <sub>2</sub> O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
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 u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) 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 $\mu$ L ksantin oksidaze i 960 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O



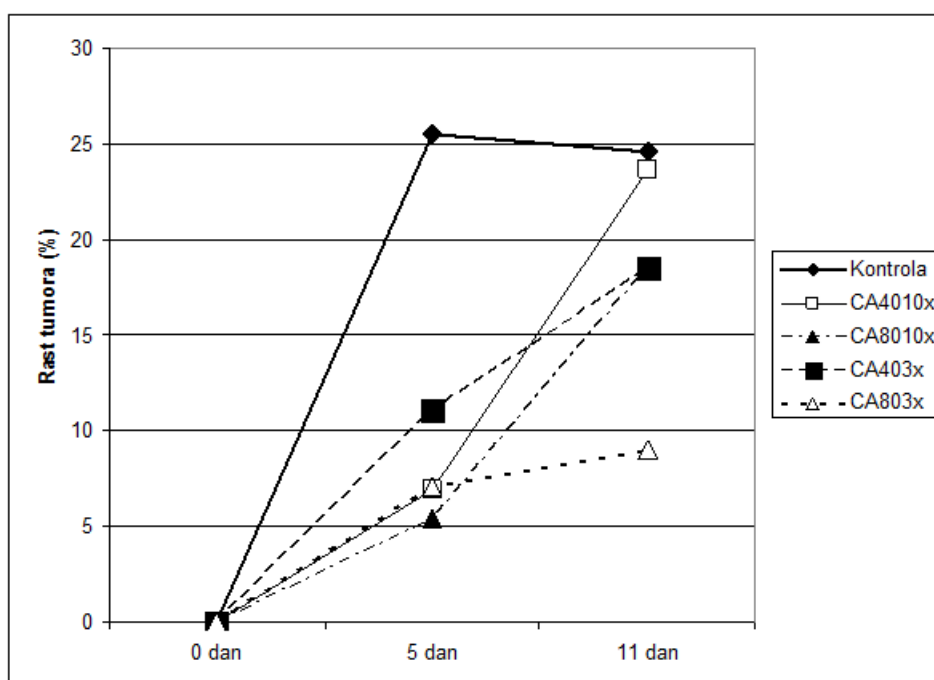
### **2.3. Statistička obrada podataka**

Dobivene rezultate smo obradili Student  $t$ -testom. Rezultate smo dobili iz najmanje 2 ili 3 pokusa te izrazili kao srednju vrijednost +/- standardna devijacija (SD). Razlike srednjih vrijednosti smatraju se značajnima ako je  $P$  manji od 0,05.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Promjene tjelesne težine

Praćenjem promjena tjelesne težine tijekom perioda obrade dobili smo uvid u brzinu rasta tumora (ascitesa) kod pojedine skupine, gdje je rast tumora izračunat kao % u odnosu na početnu težinu tumora unutar skupine. Rezultati su prikazani na Slici 14. Kod kontrole je zamijećen linearni rast tjelesne težine (TT) tijekom prvih 5. dana od unosa EAT stanica, te blaga stagnacija i gubitak TT prema 11. danu (dan žrtvovanja). Kod obrađenih skupina u odnosu na kontrolu dobitak na TT tokom prvih 5. dana je sporiji, da bi se 11. dana TT skupine obrađene CA 40 mg/kg(10x) približila TT kontrole. Obradene skupine CA 80 mg/kg (10x) i CA 40 mg/kg (3x) 11. dan imaju istu težinu. Najveće odstupanje u rstu tumora, tj. promijeni TT, pokazuje skupina obrađena CA 80 mg/kg (3x), koja ima najsporiji i najniži porast TT tijekom perioda obrade.



**Slika 14. Promjene mase tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Rast tumora izražen je kao % u odnosu na početnu težinu tumora unutar skupine.

### 3.2. Preživljenje životinja

Učinak kafeinske kiseline (40 i/ili 80 mg/kg *ip*) na miševe nositelje EAT-a istražili smo praćenjem vremena preživljenja obrađivanih skupina. Iz Tablice 12 vidljivo je da obrada miševa s CA u dozi od 80 mg/kg tijekom 10 dana je polučila najbolji rezultat i dovele do povećanja životnog vijeka (ILS) za 28, 395 % dok obrada tumora u naprednoj fazi rasta tijekom 3x u dozi od 80 mg/kg je dovela do povećanja od 17, 073 slično kao i dugotrajna obrada od 40 mg/kg (ILS %=17, 530).

**Tablica 12. Preživljavanje miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon obrade s kafeinskom kiselinom**

Skupina <sup>a</sup>	Raspon preživljenja (dani)	Srednja vrijednost preživljenja (dani)	T/C % <sup>b</sup>	ILS % <sup>c</sup>	Broj preživjelih životinja
5. KONTROLA	16-25	20, 5			0
6. CA 40 mg/kg (10x)	17-31	23, 8	117, 530	17, 530	0
7. CA 80 mg/kg (10x)	21-31	26	128, 395	28, 395	0
8. CA 40 mg/kg (3x)	16-21	20	97, 561	-2, 439	0
9. CA 80 mg/kg (3x)	17-31	24	117, 073	17, 073	0

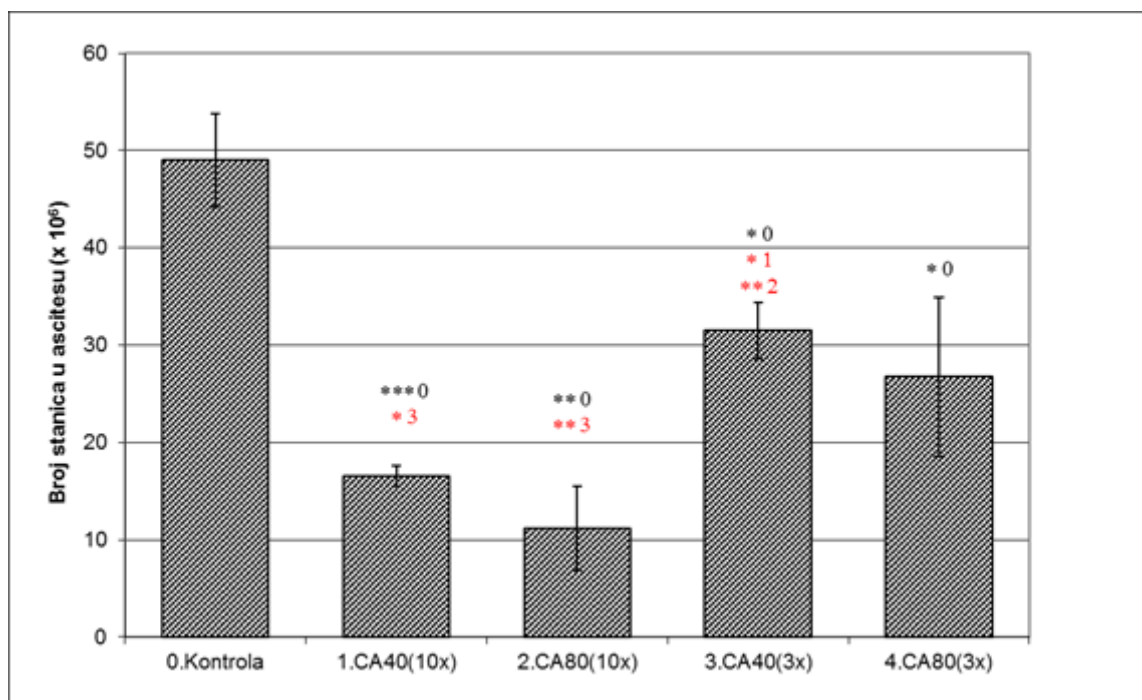
<sup>a</sup>Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica (2, 5x10<sup>6</sup>) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan.

<sup>b</sup>T/C % = T/C×100; T - srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; C - srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja.

<sup>c</sup>ILS % (engl. increased life span %), postotak povećanja životnog vijeka = (T–C)/C×100; T - srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; C - srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja.

### 3.3. Ukupni broja stanica u peritonealnoj tekućini

Rezultati određivanja ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini ukazuju da je srednja vrijednost broja stanica u obrađenim skupinama statistički značajno manja u odnosu na kontrolu (Slika 15), gdje je:  $P < 0,001$  za skupinu 1. CA 40 mg/kg (10x);  $P < 0,01$  za skupinu 2. CA 80 mg/kg (10x);  $P < 0,05$  za skupinu 3. CA 40 mg/kg (3x) i skupinu 4. CA 80 mg/kg (3x). Statistički značajne razlike postoje i između obrađenih skupina. Skupine 1. CA 40 mg/kg (10x) ima manji broj stanica u odnosu na skupinu 3. CA 40 mg/kg (3x) ( $P < 0,05$ ), te skupinu 2. CA 80 mg/kg (10x) ( $P < 0,01$ ).



**Slika 15. Ukupni broja stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  u odnosu na kontrolu; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  u odnosu na obrađenu skupinu. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju.

### 3.4. Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine

Diferencijalnom analizom stanica iz peritonealne tekućine miševa nositelja EAT nismo uočili statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ) između postotka tumorskih stanica, makrofaga, neutrofila ili limfocita (Tablica 12). Međutim iz Tablice 12 vidljiv je porast % makrofagnih stanica obradom životinja s CA u dozi od 40 ili 80 mg/kg tijekom 10 dana.

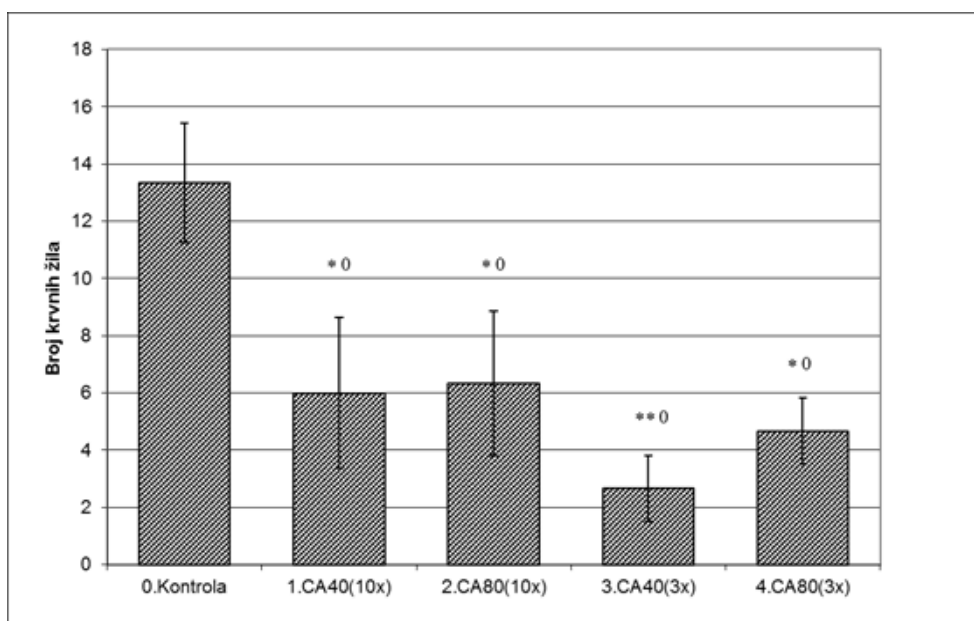
**Tablica 13. Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom**

Pokusne skupine <sup>a</sup>	Tumorske stanice (%)			
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum
0. Kontrola	73,75	7,135592	65,5	81,5
1. CA40(10x)	64,625	14,89057	44	78,5
2. CA80(10x)	66,625	10,49901	52	77
3. CA40(3x)	76	3,366502	74	81
4. CA80(3x)	68,125	15,14032	49,5	86,5
	Makrofagi (%)			
0. Kontrola	11	3,582364	7,5	16
1. CA40(10x)	21,125	10,9573	7,5	30
2. CA80(10x)	24,125	13,91866	11	43
3. CA40(3x)	12,5	3,488075	9,5	17,5
4. CA80(3x)	15	5,686241	8,5	21,5
	Neutrofili (%)			
0. Kontrola	14,875	7,586995	6,5	23,5
1. CA40(10x)	13,5	10,59088	4,5	25
2. CA80(10x)	8,625	7,295832	4	19,5
3. CA40(3x)	11,5	4,490731	7	16,5
4. CA80(3x)	15,875	13,60989	0,5	33
	Limfociti (%)			
0. Kontrola	0,375	0,478714	0	1
1. CA40(10x)	0,625	0,946485	0	2
2. CA80(10x)	0,75	0,5	0	1
3. CA40(3x)	0	0	0	0
4. CA80(3x)	0,75	1,190238	0	2,5

<sup>a</sup>Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan.

### 3.5. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti

Rezultati kvantitativnog mjerenja prožiljenosti ukazuju da je srednja vrijednost broja krvnih žila u obrađenim skupinama s CA statistički značajno manja u odnosu na kontrolu (Slika 16), gdje je:  $P < 0,05$  za skupine 1. CA 40 mg/kg (10x), 2. CA 80 mg/kg (10x) i 4. CA 80 mg/kg (3x);  $P < 0,01$  za skupinu 3. CA 40 mg/kg (3x).



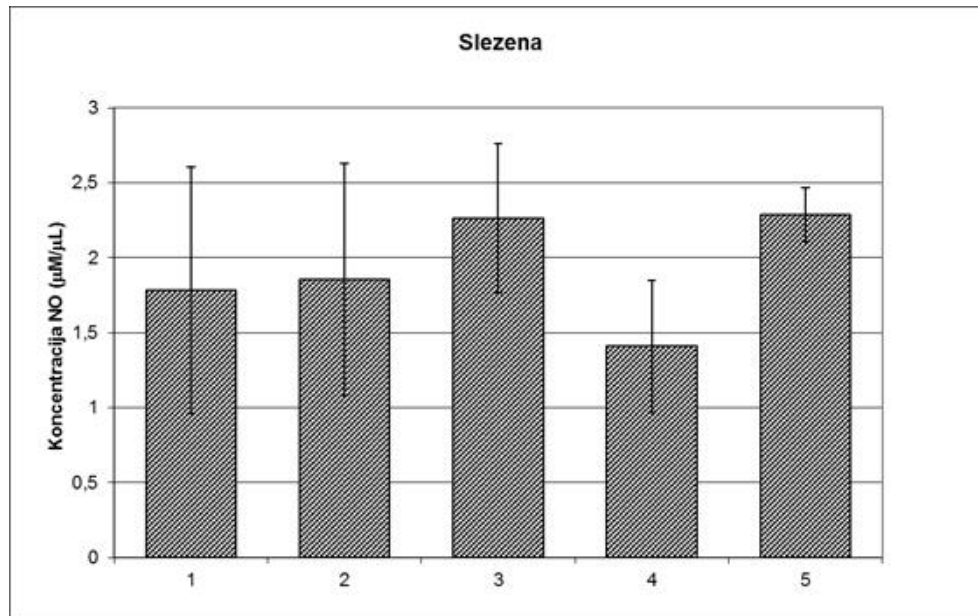
**Slika 16. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.**

Miševi ( $N=5$ ) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ )

### 3.6. Rezultati mjerenja dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

#### 3.6.1. Razina dušik oksida iz stimuliranih makrofaga slezene

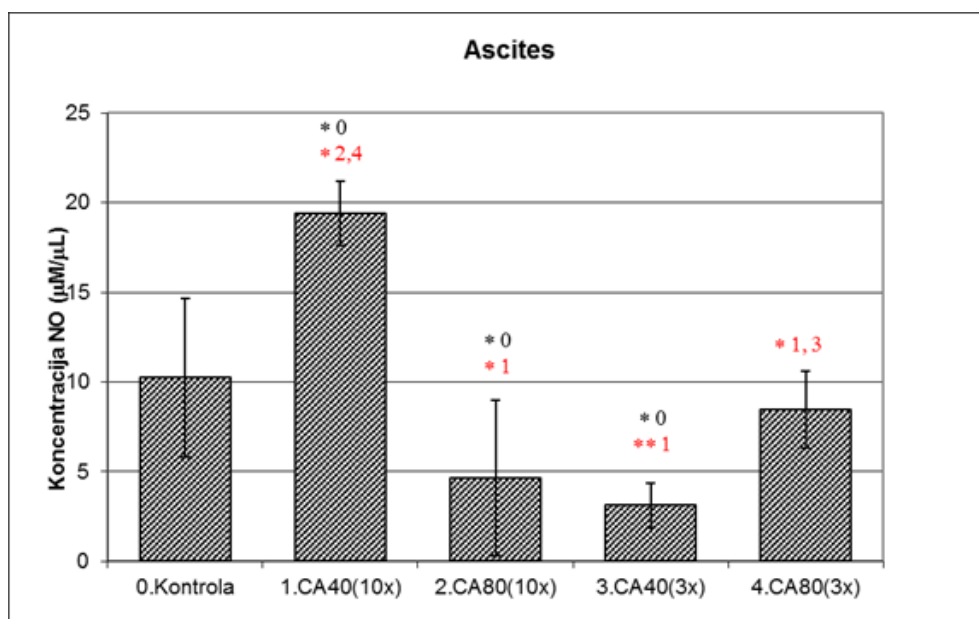
Razina NO iz stimuliranih makrofaga slezene s LPS-om prikazana je na Slici 17. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku ( $P > 0,05$ ) između istraživanih skupina.



**Slika 17. Određivanje koncentracije NO iz stimuliranih makrofaga slezene s LPS-om miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.

### 3.6.2. Razina dušik oksida iz ukupnih stanica ascitesa

Rezultati mjerenja koncentracije NO u uzorku ukupnih stanica ascitesa (Slika 18) ukazuju da je srednja vrijednost koncentracije NO u obrađenoj skupini 1. CA 40 mg/kg (10x) veća ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu i obrađene skupine 2. CA 80 mg/kg (10x) i 4. CA 80 mg/kg (3x), te veća ( $P < 0,01$ ) s obzirom na skupinu 3. CA 80 mg/kg (3x). Isto tako je uočena manja koncentracija NO ( $P < 0,05$ ) kod skupine 3. CA 40 mg/kg (3x) u odnosu na skupinu 4. CA 80 mg/kg (3x).

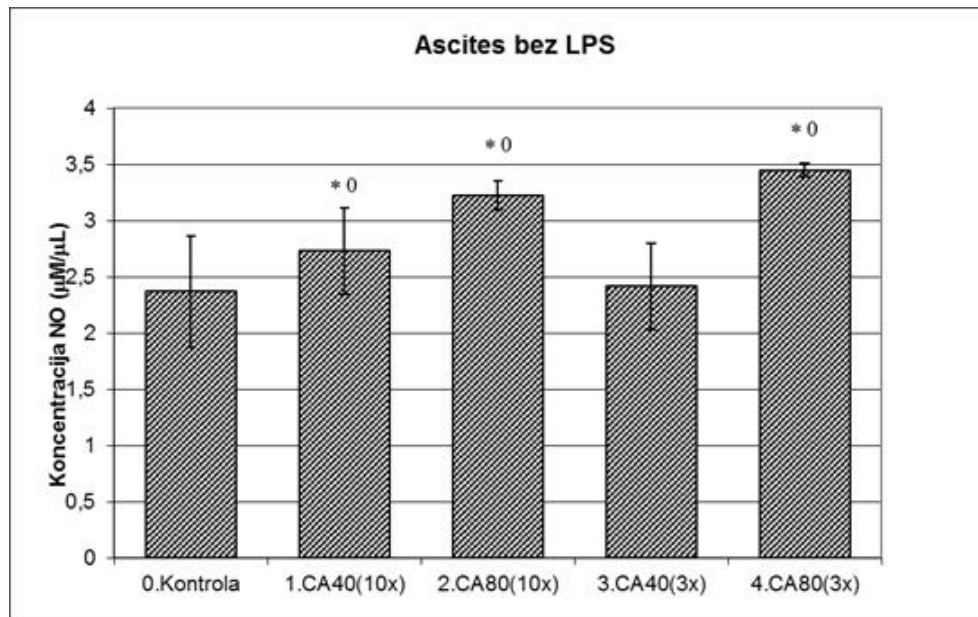


**Slika 18. Određivanje koncentracije NO iz ukupnih stanica ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ).



### 3.6.3. Razina dušik oksida iz nestimuliranih makrofaga ascitesa

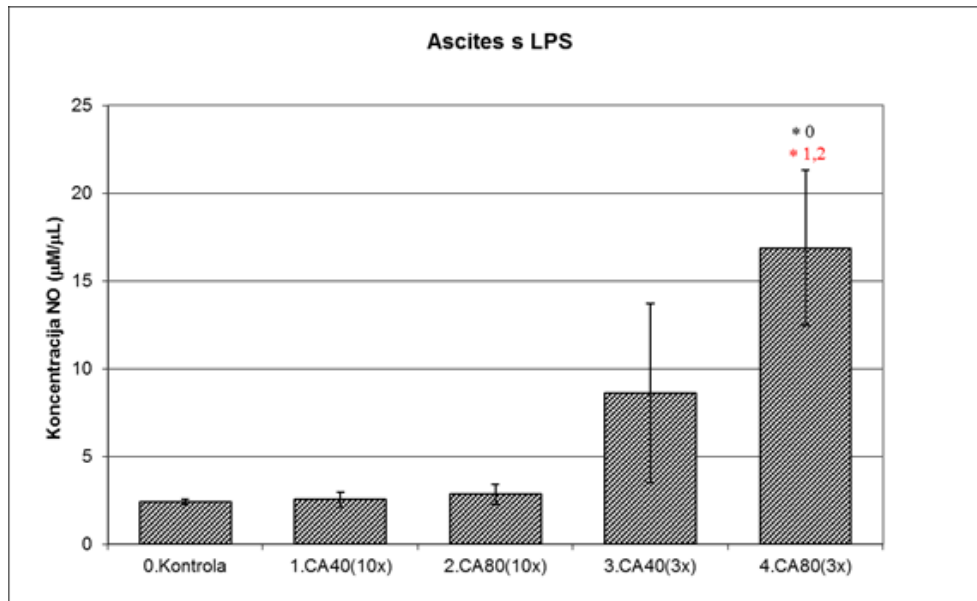
Rezultati mjerenja koncentracije NO u uzorku ascitesa nestimuliranih makrofaga (bez LPS-a) prikazani su na Slici 19. Rezultati ukazuju da je srednja vrijednost koncentracije NO u obrađenim skupinama 1. CA 40 mg/kg (10x), 2. CA 80 mg/kg (10x) i 4. CA 40 mg/kg (3x) statistički značajno veća ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu.



**Slika 19. Određivanje koncentracije NO iz makrofaga ascitesa bez LPS-a miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ ).

### 3.6.4. Razina dušik oksida iz stimuliranih makrofaga ascitesa

Slika 20 prikazuje da skupina 4. CA 80 mg/kg (3x) ima statistički značajno veću koncentraciju NO ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu, te u odnosu na skupinu 1. CA 40 mg/kg (10x) i 2. CA 80 mg/kg (10x).

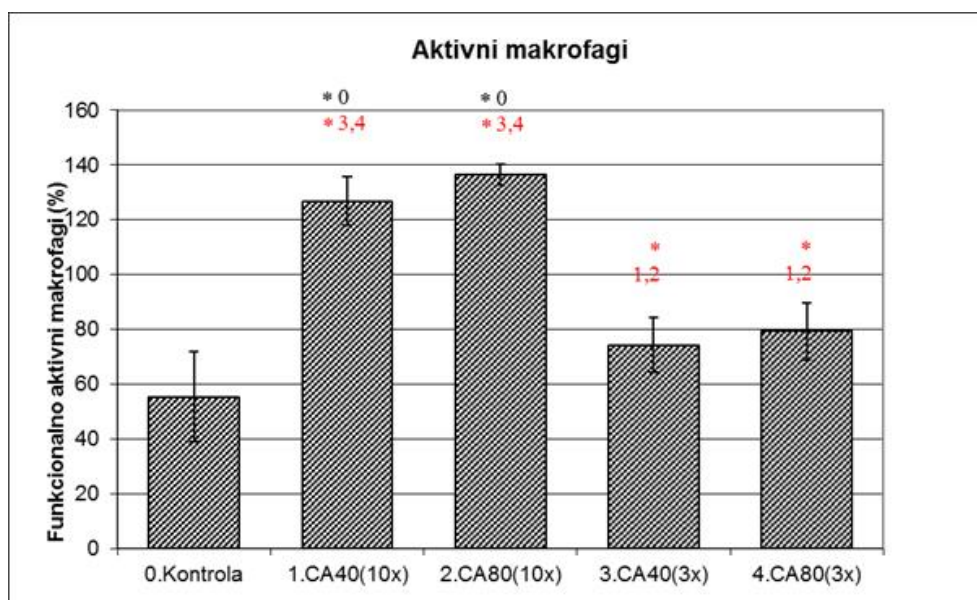


**Slika 20. Određivanje koncentracije NO iz stimuliranih makrofaga ascitesa s LPS-om miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0,05$ ).

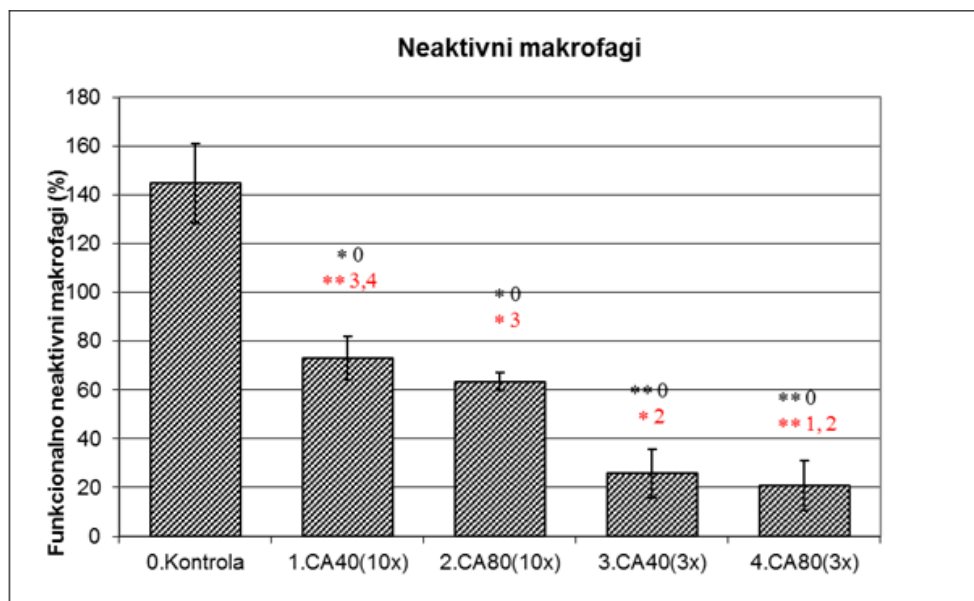
### 3.7. Funkcionalna aktivnost makrofaga iz peritonealne tekućine

Rezultati određivanja funkcionalne aktivnosti makrofaga ukazuju da je srednja vrijednost broja aktiviranih makrofaga (Slika 21) statistički značajno veća ( $P < 0,05$ ) unutar obrađenih skupina 1. CA 40 mg/kg (10x) i 2. CA 80 mg/kg (10x) u odnosu na kontrolu i obrađene skupine 3. CA 40 mg/kg (3x) i 4. CA 80 mg/kg (3x).

Rezultati određivanja funkcionalne aktivnosti makrofaga ukazuju da je srednja vrijednost broja neaktiviranih makrofaga (Slika 22) statistički značajno manja u skupina obrađenih s CA u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ). Isto tako uočene su statistički značajne razlike unutar obrađenih skupina; između skupine 1 i skupine 3 i 4 ( $P < 0,01$ ) te skupine 2 i 3 ( $P < 0,05$ ) te između skupine 4 i 1 i 2 ( $P < 0,01$ ).



**Slika 21. Aktivni makrofagi miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0,05$ ).

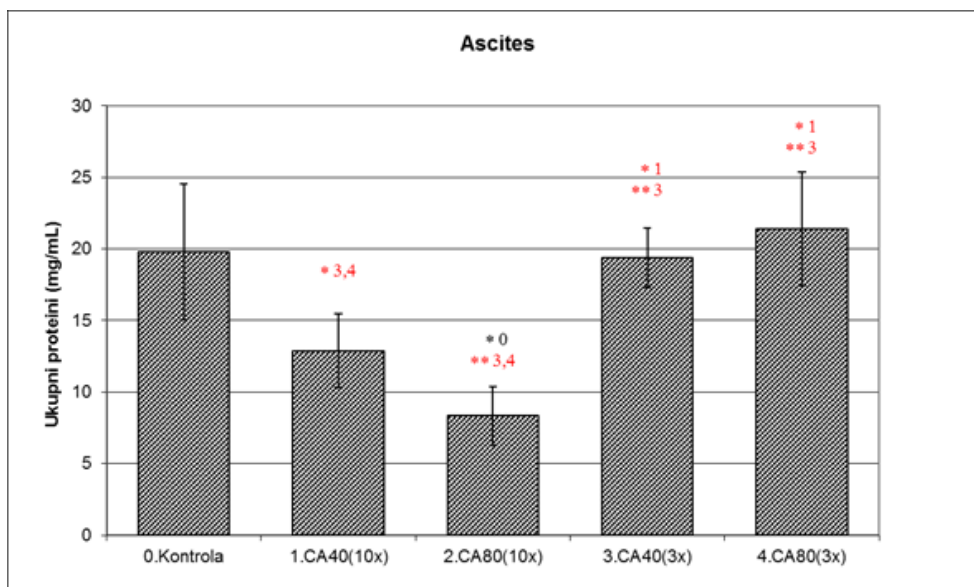


**Slika 22. Neaktivni makrofagi miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica (2, 5x10<sup>6</sup>) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost ± SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu (\* $P < 0, 05$ ) i između obrađenih skupina (\* $P < 0, 05$ ; \*\*  $P < 0, 01$ ).

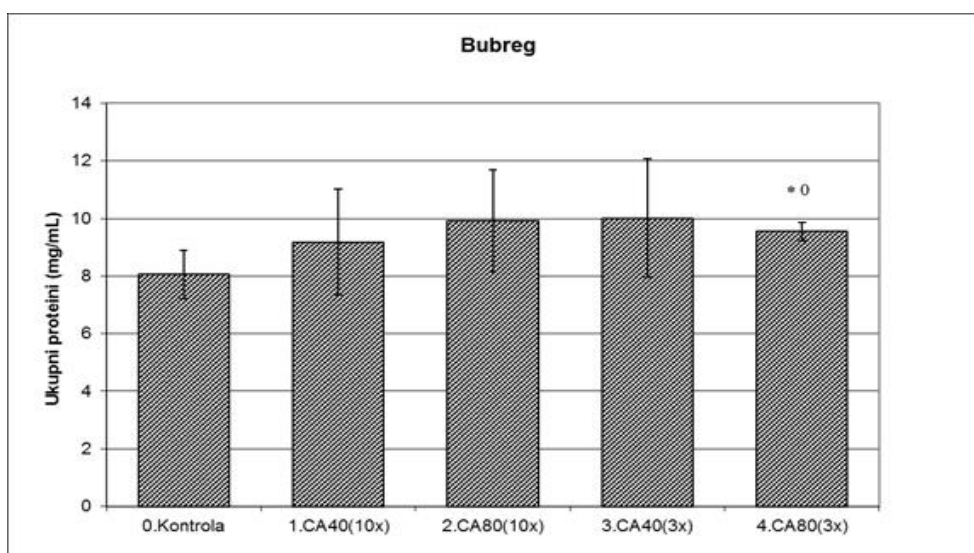
### 3.8. Ukupni proteini u uzorcima

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u uzorcima ascitesa ukazuju da je srednja vrijednost ukupnih proteina (Slika 23) statistički značajno manja ( $P < 0, 05$ ) kod skupine 2. CA 80 mg/kg (20x) u odnosu na kontrolu, dok kod ostalih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu nema statistički značajnih promijena. Obađene skupine 3. CA 40 mg/kg (3x) i 4. CA 80 mg/kg (3x) imaju veću količinu ukupnih proteina u odnosu na skupinu 1. CA 40 mg/kg (10x) ( $P < 0, 05$ ) i skupinu 2. CA 80 mg/kg (10x) ( $P < 0, 01$ ).

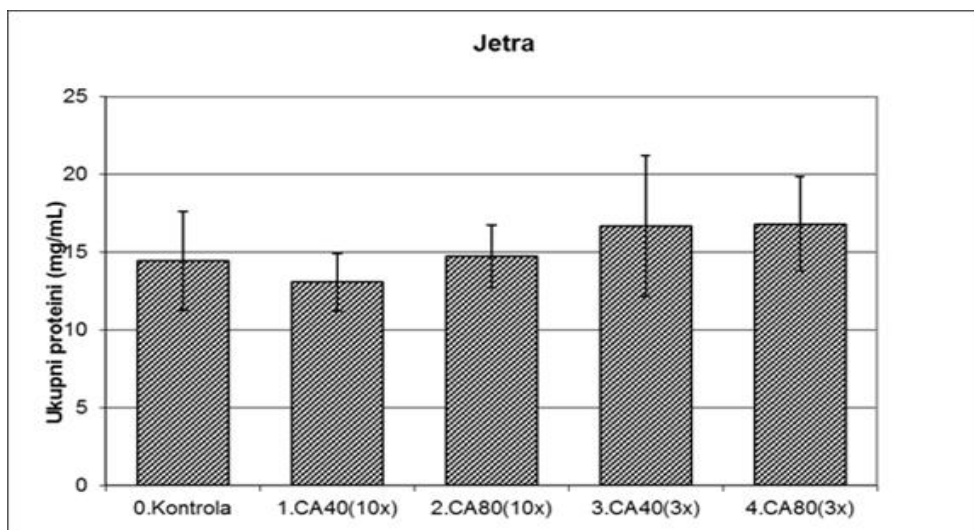
Rezultati mjerenja ukupnih proteina u uzorcima bubrega (Slika 24) ukazuju na statistički značajno višu srednju vrijednost ukupnih proteina ( $P < 0, 05$ ) kod skupine 4. CA 80 mg/kg (3x) u odnosu na kontrolu. Srednja vrijednost ukupnih proteina kod jetre (Slika 25) ne ukazuju na statistički značajnu razliku ( $P < 0, 05$ ), dok je u uzorcima slezene (Slika 26) uočena viša koncentracija proteina ( $P < 0, 05$ ) u skupini 1. CA 40 mg/kg (10x) u odnosu na kontrolu.



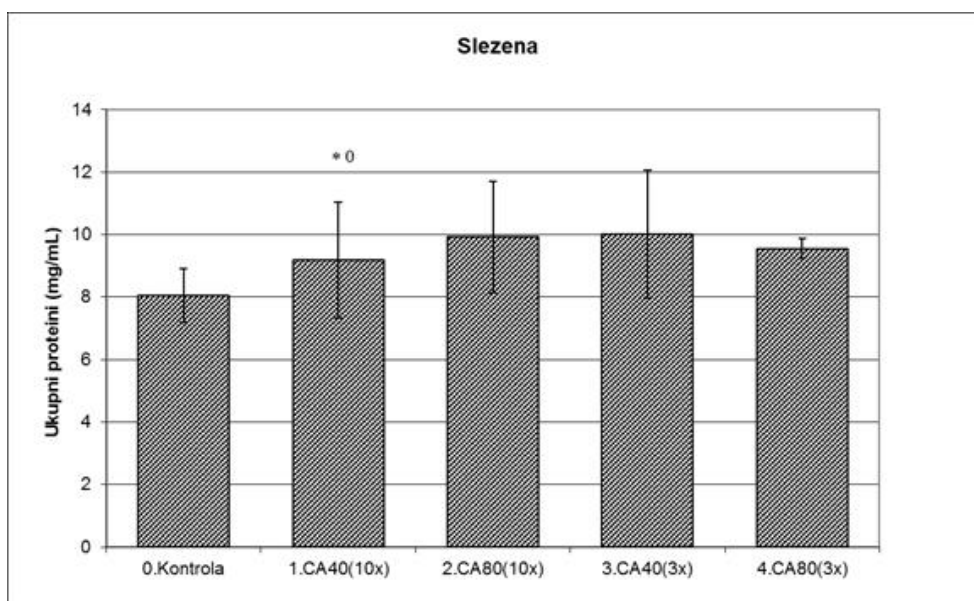
**Slika 23. Ukupni proteini u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0, 05$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0, 05$ ;  $**P < 0, 01$ ).



**Slika 24. Ukupni proteini u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0, 05$ ).



**Slika 25. Ukupni proteini u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.



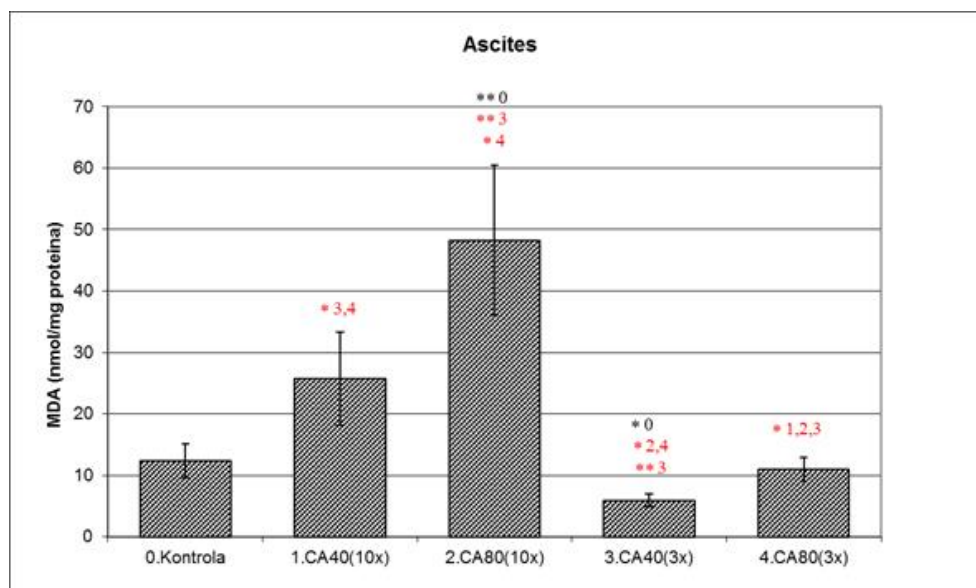
**Slika 26. Ukupni proteini u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0, 05$ ).

### 3.9. Koncentracija MDA u uzorcima

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorku ascitesa (Slika 27) ukazuju da je srednja vrijednost koncentracije MDA veća ( $P < 0,01$ ) kod skupine 2. CA 80 mg/kg (10x) u odnosu na kontrolu i skupinu 3. CA 80 mg/kg (3x), te u odnosu ( $P < 0,05$ ) na skupinu 4. CA 40 mg/kg (3x). Isto tako je uočeno da je srednja vrijednost koncentracije MDA veća ( $P < 0,05$ ) kod skupine 1. CA 40 mg/kg (10x) u odnosu na skupinu 3. CA 40 mg/kg (3x) i skupinu 4. CA 80 mg/kg (3x). Najniža srednja vrijednost koncentracije MDA u odnosu na kontrolu i obrađene skupine zabilježena je kod skupine 3. CA 80 mg/kg (10x).

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorku bubrega i jetre (Slika 28 i 29) ne pokazuju statističku značajnost ( $P < 0,05$ ).

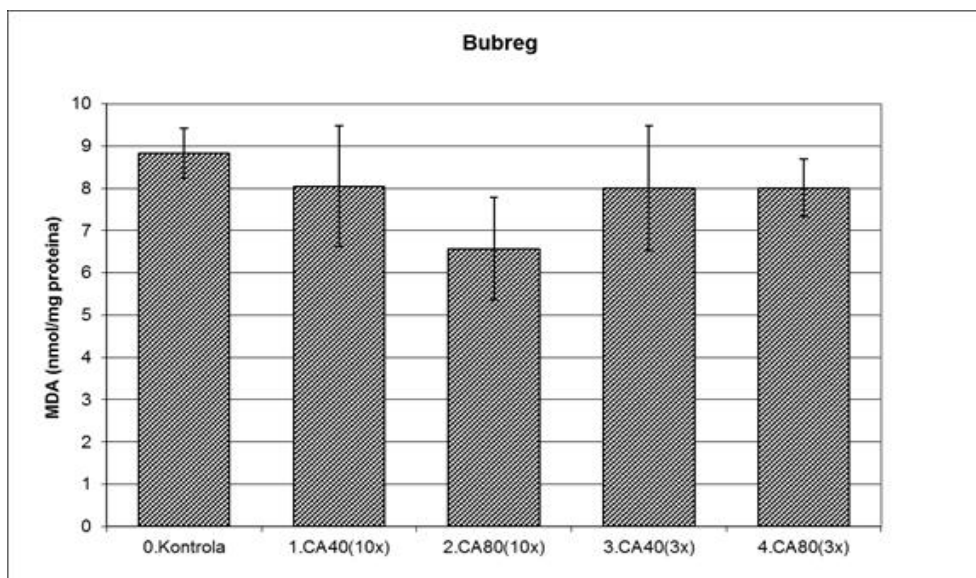
Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorku slezene (Slika 30) ukazuju da je srednja vrijednost mjernja koncentracije MDA statistički značajno manja kod skupine 1. CA 40 mg/kg (10x) u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ ), te viša ( $P < 0,05$ ) u odnosu na skupinu 2. CA 80 mg/kg (10x).



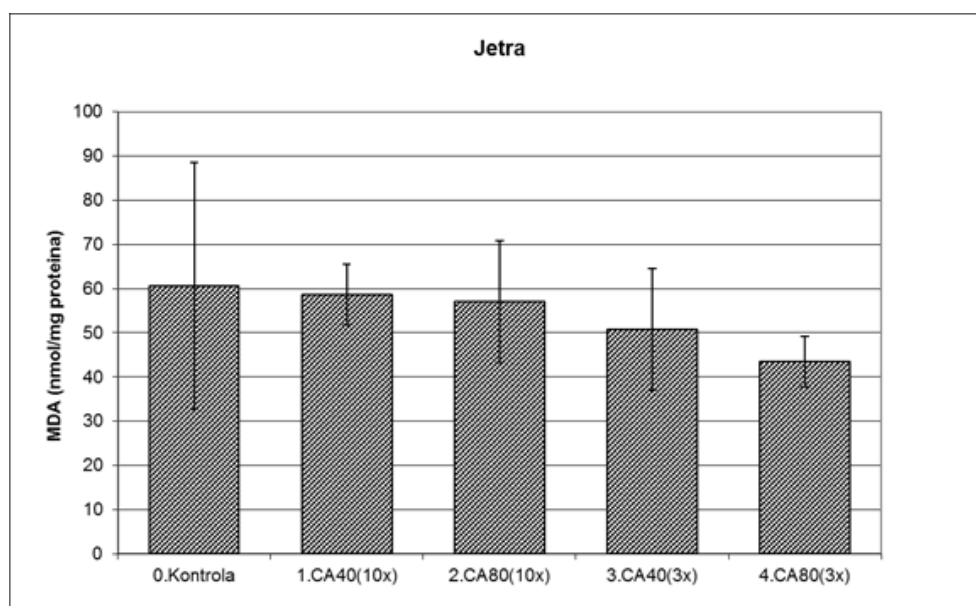
**Slika 27. Koncentracija MDA u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.**

Miševi ( $N=5$ ) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ).



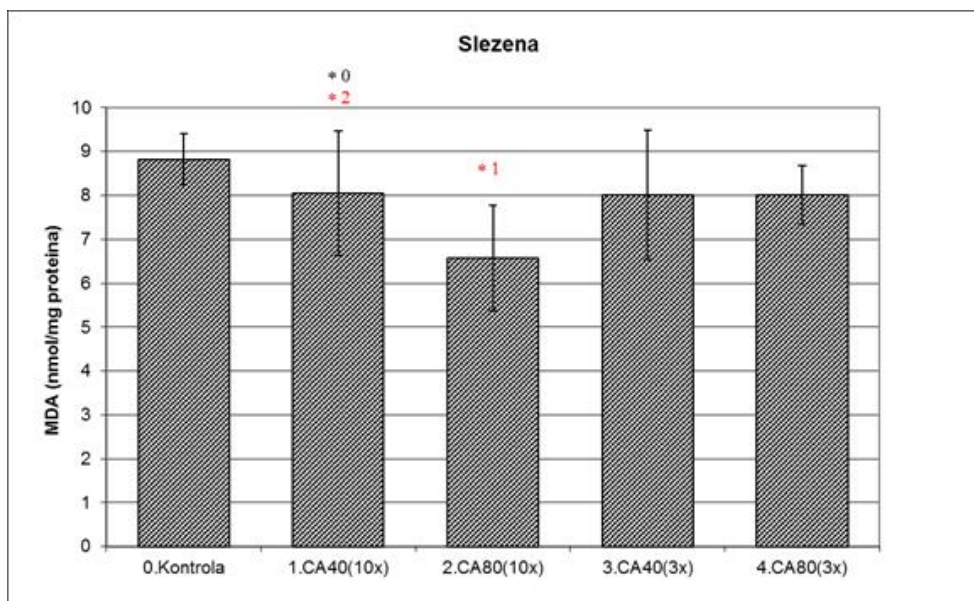


**Slika 28. Koncentracija MDA u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.



**Slika 29. Koncentracija MDA u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.





**Slika 30. Koncentracija MDA u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.**

Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0, 05$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0, 05$ ).

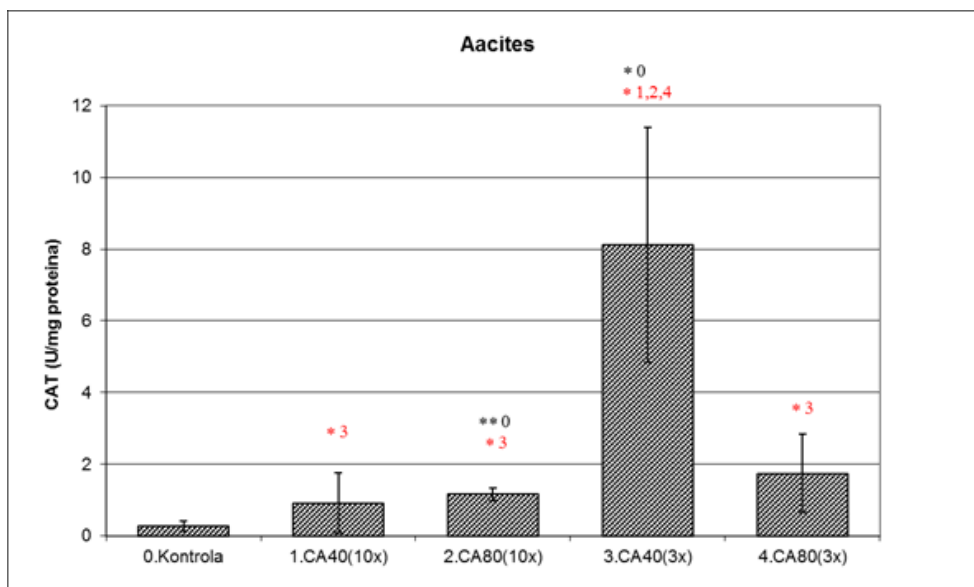
### 3.10. Aktivnost CAT u uzorcima

Rezultati određivanja aktivnosti katalaze u uzorku ascitesa (Slika 31) ukazuju na povećanu aktivnost katalaze kod skupine 3. CA 40 mg/kg (3x) u odnosu na kontrolu ostale obrađene skupine ( $P < 0, 05$ ), te statistički značajno povišenu aktivnost katalaze kod skupine 2. CA 80 mg/kg (10x) u odnosu na kontrolu ( $P < 0, 001$ ).

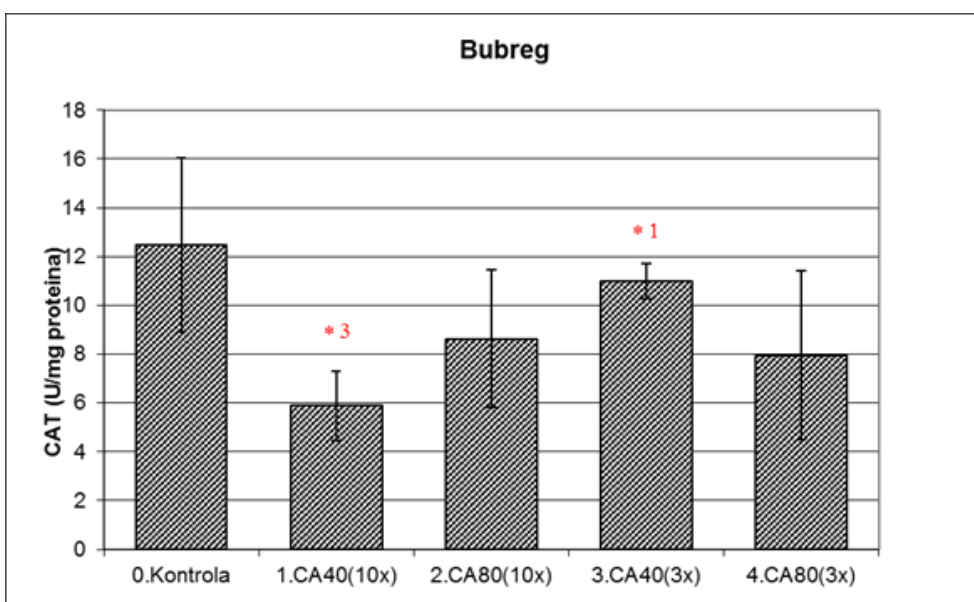
U uzorku bubrega (Slika 32) aktivnost katalaze je statistički značajno manja ( $P < 0, 05$ ) kod skupine 1. CA 40 mg/kg (10x) u odnosu na skupinu 3. CA 40 mg/kg (3x).

Rezultati određivanja aktivnosti katalaze u uzorku jetre (Slika 33) ne ukazuju na statistički značajnu razliku ( $P < 0, 05$ ).

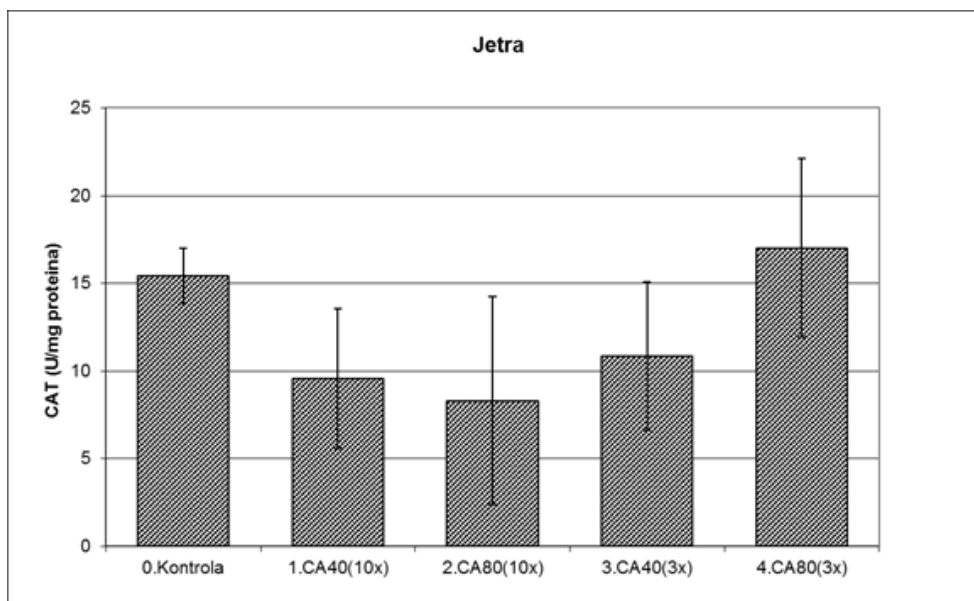
U uzorku slezene (Slika 34) aktivnost katalaze je statistički značajno viša ( $P < 0, 05$ ) kod skupine 2. CA 80 mg/kg (10x) u odnosu na skupinu 4. CA 80 mg/kg (3x).



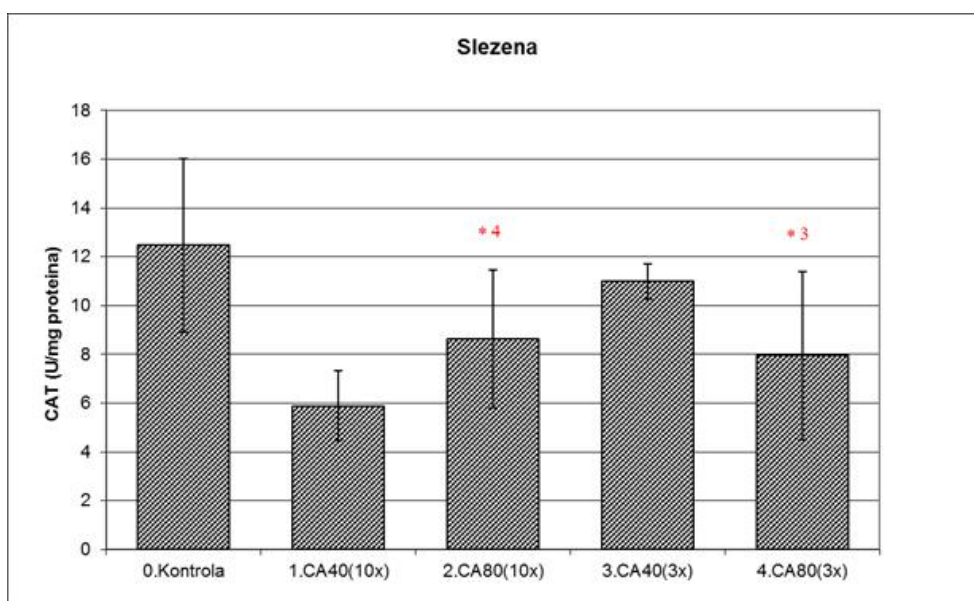
**Slika 31. aktivnost katalaze u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0, 05$ ;  $P < 0, 01$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0, 05$ ).



**Slika 32. Aktivnost katalaze u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.



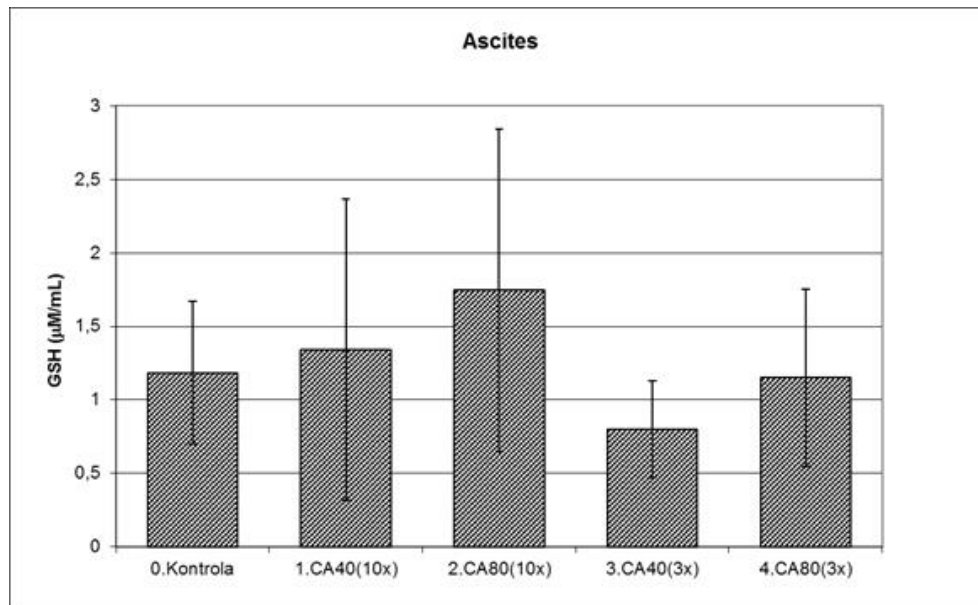
**Slika 33. Aktivnost katalaze u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.



**Slika 34. aktivnost katalaze u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost između obrađenih skupina (\* $P < 0, 05$ ).

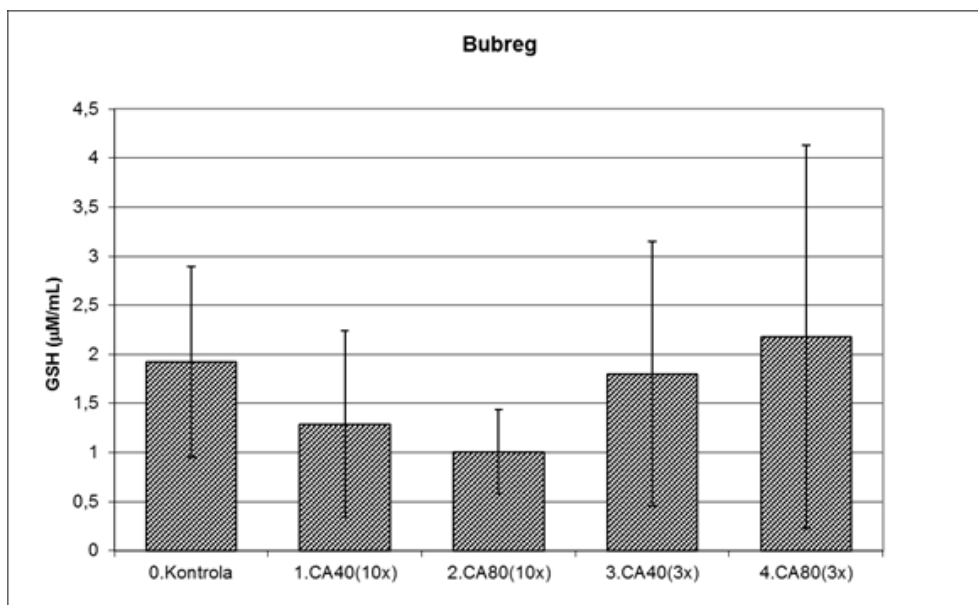
### 3.11. Koncentracija GSH u uzorcima

Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa ne pokazuju statistički značajnu srednju vrijednost koncentracije ukupnoga glutationa u uzorcima ascitesa, bubrega i jetre (Slike 35, 36, 37). Dok je u uzorcima slezena (Slika 38) uočena manja koncentracija ukupnoga glutationa kod skupine 1. CA 40 mg/kg (10x) u odnosu na kontrolu ( $P < 0, 01$ ).

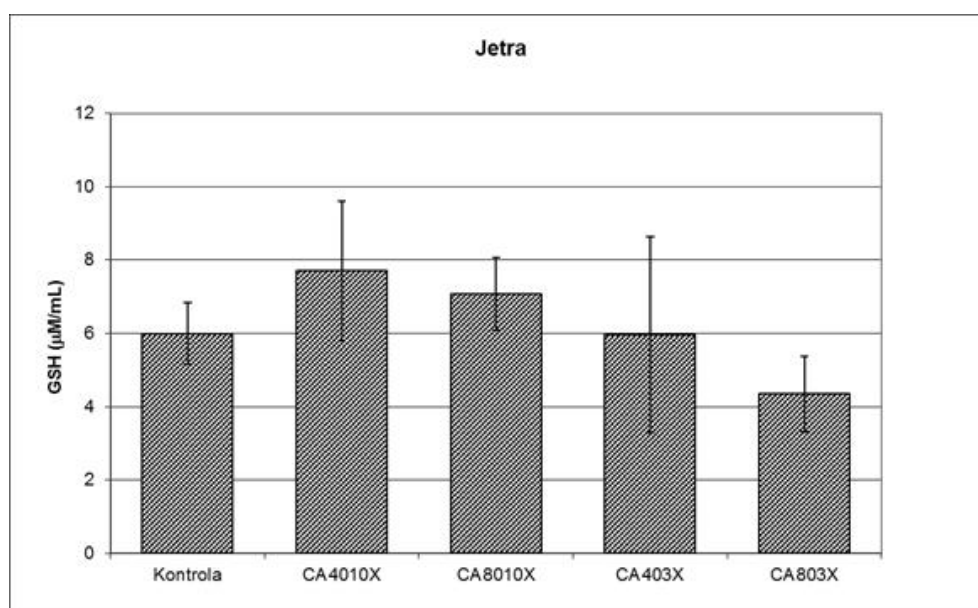


**Slika 35. Koncentracija GSH u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.**

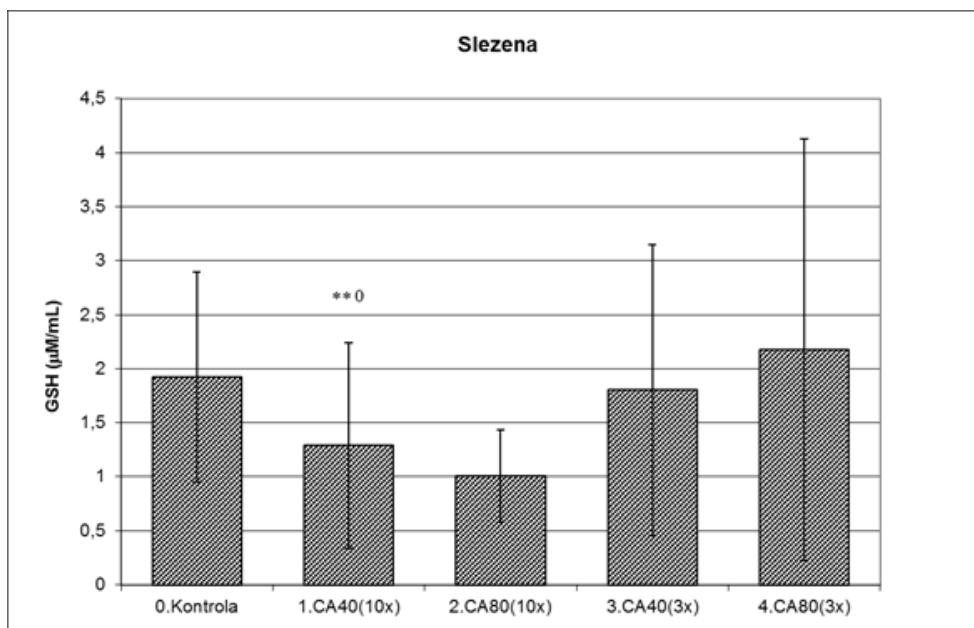
Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.



**Slika 36. Koncentracija GSH u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.



**Slika 37. Koncentracija GSH u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.



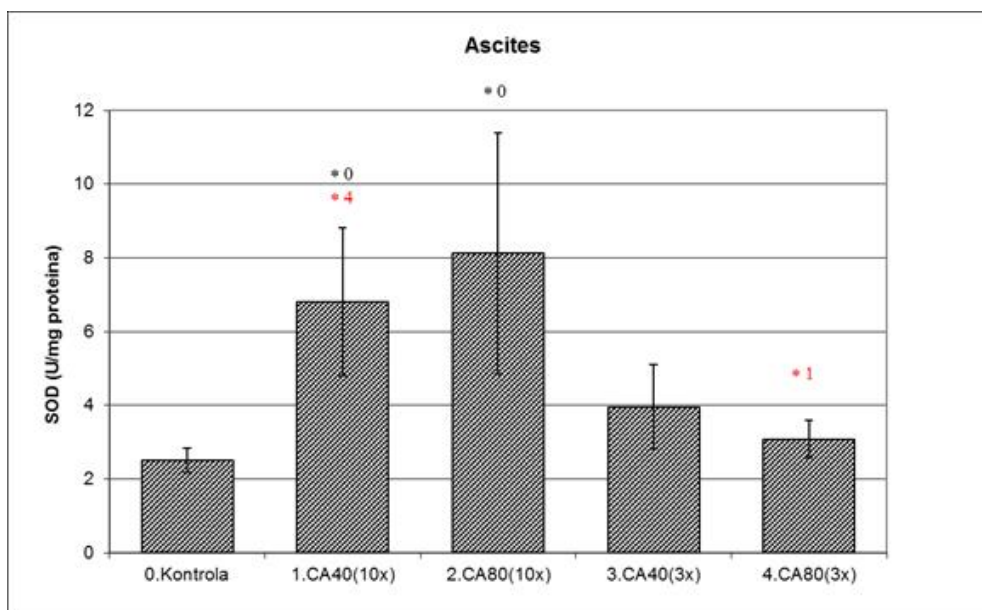
**Slika 38. Koncentracija GSH u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu (\*\* $P < 0,01$ ).

### 3.12. Aktivnost SOD u uzorcima

Rezultati određivanja aktivnosti SOD u uzorku ascitesa (Slika 39) ukazuju na povišenu aktivnost SOD kod obrade 1. CA 40 mg/kg (10x) u odnosu na obradu 4. CA 80 mg/kg (3x) i kontrolu ( $P < 0,05$ ). Uočena je statistički značajno veća aktivnost SOD ( $P < 0,05$ ) kod obrade 2. CA 80 mg/kg (10x) u odnosu na kontrolu.

Rezultati određivanja aktivnosti SOD u uzorku bubrega (Slika 40) ukazuju na manju aktivnost SOD kod skupine 2. CA 80 mg/kg (10x) u odnosu na skupinu 4. CA 80 mg/kg (3x) i kontrolu ( $p < 0,05$ ).

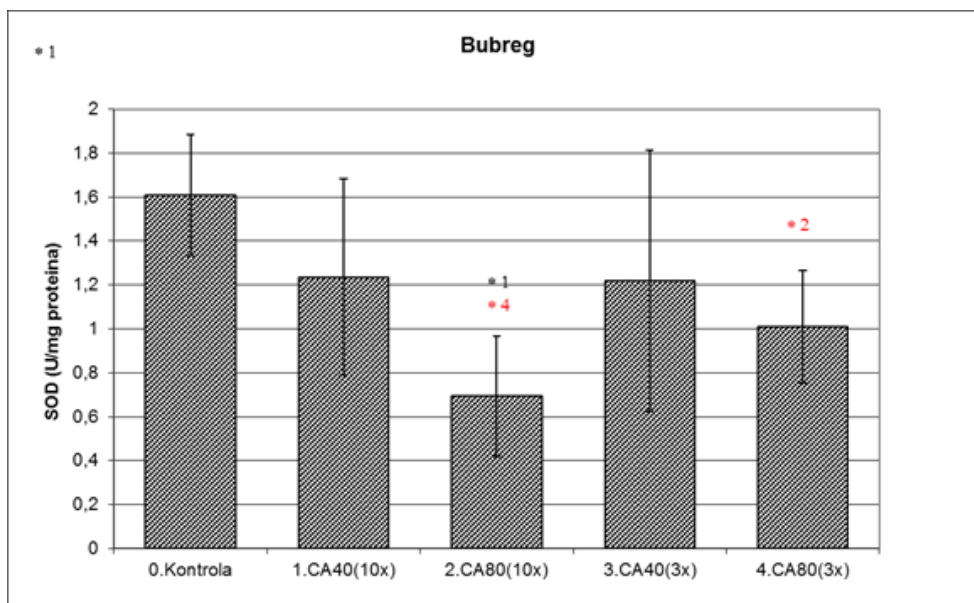
Rezultati određivanja aktivnosti SOD u uzorcima jetre i slezene (Slike 41 i 42) nisu pokazali statističku značajnost ( $P > 0,05$ ).



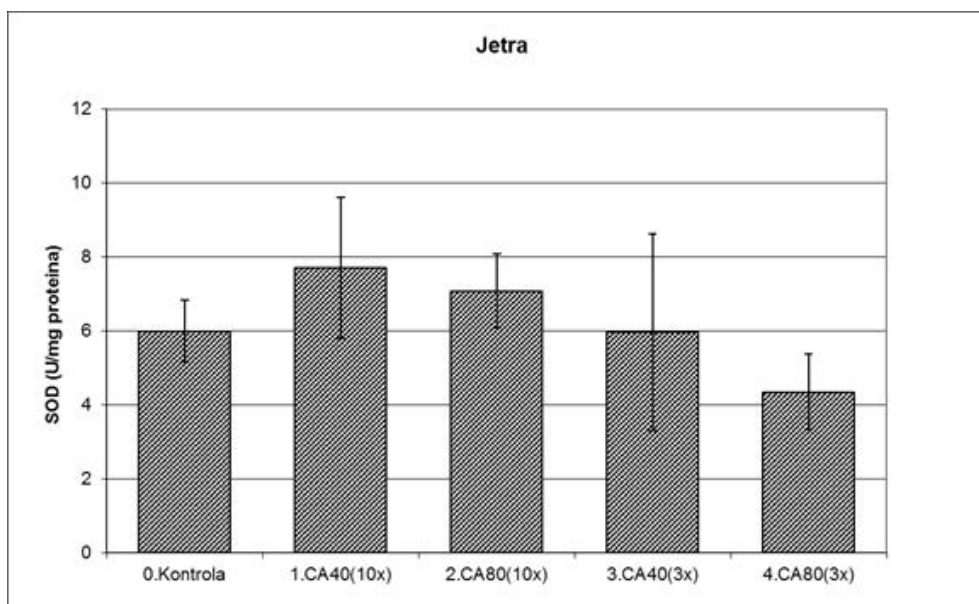
**Slika 39. Aktivnost SOD u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.**

Miševi ( $N=5$ ) nakon unosa EAT stanica ( $2,5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0,05$ ).



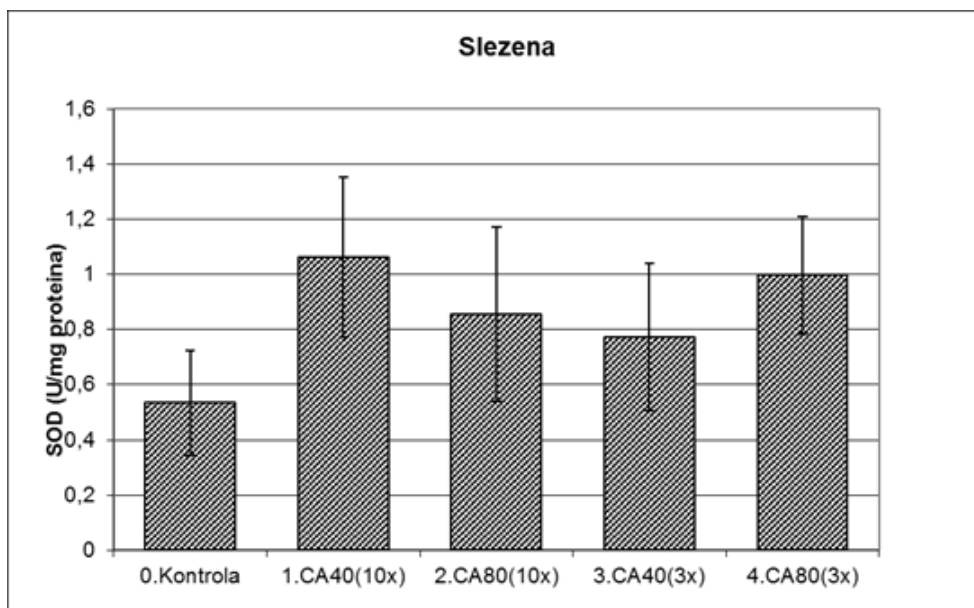


**Slika 40. aktivnost SOD u uzorku bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD. Brojevi iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ( $*P < 0, 05$ ) i između obrađenih skupina ( $*P < 0, 05$ ).



**Slika 41. aktivnost SOD u uzorku jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.





**Slika 42. Aktivnost SOD u uzorku slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s kafeinskom kiselinom.** Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ( $2, 5 \times 10^6$ ) su obrađeni *ip* kafeinskom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg tijekom 10 dana i/ili s početkom nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD.

#### 4. RASPRAVA

Učestalost zloćudnih bolesti je u porastu kao i njihova smrtnost. Posebice brzu smrt izazivaju tumori koji dovode do stvaranja peritonealne karcinomatoze te posljedičnog stvaranja ascitesa. Neučinkovita klasična terapija, kao i neselektivnost te posljedična toksičnost zahtijevaju pronalazak novih i učinkovitijih protutumorskih lijekova i nalaženje 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 sprečavaju procese karcinogeneze i proliferacije tumorskih stanica.

U ovom radu istražili smo učinak kafeinske kiseline (CA) na rast tumora, tumorsku angiogenezu, funkcionalnu sposobnost makrofaga i makrofagnu polarizaciju i oksidacijski stres u miševa. Kafeinska kiselina je biološki aktivna sastavnica propolisa koja pokazuje antioksidativna, protuupalna, antiproliferativna, citostatska, antiangiogena i antineoplastična svojstva.

Prema Shuklai i sur. (2008) flavonoidi nazočni u propolisu (35-50 %) pripadaju skupini prirodnih polifenolnih spojeva, široko rasprostranjenih u biljnom carstvu, koji pokazuju razne biološke aktivnosti, uključujući i inhibiciju rasta tumora.

Učinak CA na rast tumora potvrdili smo praćenjem promjena tjelesne težine tijekom perioda obrade kako bi dobili uvid izravnog učinka CA na brzinu rasta tumora (ascitesa) kod pojedine skupine s obzirom na ranu i kasnu fazu rasta tumora. CA je pokazala inhibicijski učinak na rast stanica EAT. Tijekom perioda obrade najznačajnije rezultate je dala skupina obrađena CA 80 mg/kg s početkom obrade nakon 5. dana od injiciranja tumora svaki drugi dan (3x). Međutim, tijekom praćenja perioda preživljavanja, ova skupina nije polučila najbolji učinak u preživljenju (ILS % = 17, 073 %) u odnosu na kontrolu; najbolji učinak na preživljavanje je polučila skupina obrađena CA u dozi od 80 mg/kg tijekom 10 dana obrade (Slika 14 i Tablica12), što povezujemo s svojstvima EAT tumora, koji je brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti. Temeljem navedenog čini se da bolji antitumorski učinak CA ima na EAT tumor u eksponencijalnoj fazi rasta ali da kratkotrajno injiciranje (3x; 5., 7. i 9. dan) je nedostavno za zaustavljanje proliferacije stanica EAT tumora i da je obradu miševa trebalo nastaviti kroz duže vrijeme. Protutumorski učinak CA smo potvrdili i reduciranim brojem stanica u trbušnoj šupljini (Slika 15) te učinkom na peritonealnu angiogenezu gdje je broj novonastalih krvnih žila bio vidno smanjen (Slika 16, i slike u prilogu). Rezultati određivanja ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini ukazuju da je srednja vrijednost broja stanica u

obrađenim skupinama statistički značajno manja ( $P < 0,05$ ;  $0,01$ ;  $0,001$ ) u odnosu na kontrolu, gdje se posebno ističe skupina obrađena s 1. CA 40 mg/kg i skupina 2. CA 80 mg/kg tijekom 10 dana, što je popraćeno porastom % makrofagnih stanica kao odrazom sposobnosti CA da aktivira makrofage i inducira apoptozu što u svome radu potvrđuju i Orban i sur. (2000).

Ovi rezultati smanjenja peritonealne angiogeneze i mikrožilne gustoće (MVD) pokazuju antiangiogeni potencijal CA *in vivo*. Dobiveni podaci navode na zaključak da bi dugotrajna obrada s CA mogla polučiti bolji protutumorski i antiangiogeni učinak. MVD jest zlatni morfološki standard za procjenu neovaskularizacije tumora jer MVD broj odražava angioarhitektonska 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).

Poznato je da proces tumorske angiogeneze počinje hipoksijom ili ishemijom tumora pri čemu je izražen transkripcijski faktor hipoksijom inducirani čimbenik-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), koji potiče transkripciju brojnih angiogenih čimbenika, npr. čimbenika rasta krvožilnog endotela (VEGF), (Gerald i sur. 2004). Tumorske stanice i makrofagi sintetiziraju VEGF čimbenik koji inducira sintezu proteaza i receptora važnih za širenje tumora u lokalna tkiva. U nazočnosti angiogenog poticaja započinje razgradnja bazalne membrane i endotelne stanice venula šire se 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 enzimatskom razgradnjom međustaničnog matriksa od strane makrofaga i/ili tumorskih stanica (Dedić Plavetić i sur. 2003). Nadalje, procesu rasta i širenja tumora pridonose brojni čimbenici, uključujući brojne genetske i epigenetske čimbenike, reaktivne radikale kisika (ROS), te oslabljeni imunski nadzor. Tijekom napredovanja tumora, tumor aktivno privlači (novači) 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 fenotipskih promjena, makrofagi mijenjaju svoju funkciju; dolazi do polarizacije makrofaga od klasičnih M1 u alternativne M2 makrofage. M1 makrofagi uključeni su u upalni odgovor, uništavanje patogena, i antitumorsku imunost. Nasuprot tome, M2 makrofagi utječu na protuupalni odgovor, zacjeljivanje rana i imaju pro-karcinogene značajke.

Temeljem brojnih čimbenika koji mogu utjecati na rast tumora dalje je bilo važno istražiti imunomodulatornu ulogu CA kao i njen antioksidacijski učinak u regulaciji tumorskog rasta i angiogeneze. Jedne od najvažniji stanica u regulaciji rasta tumora svakako su makrofagi.

Monociti-makrofagi su stanice s višestrukom ulogom; izlučuju i stvaraju brojne aktivne tvari kojima utječu na tijek imunodne reakcije, djeluju na tumorske stanice i sudjeluju u upalnoj reakciji i obnovi oštećenog tkiva. Nastaju iz višestrukoproizvodne matične stanice koštane srži i kao monociti u cirkulaciji se zadržavaju 1 – 4 dana, potom napuštaju cirkulaciju, transformiraju se u makrofage i migriraju u različita tkiva (vezivno tkivo, limfni čvorovi, krv). U tkivu makrofagi su nazočni kao pokretne (slobodne) ili nepokretne (fiksne) stanice. Slobodne stanice nalazimo u peritonealnoj i pleuralnoj šupljini, plućnim alveolama, koštanoj srži te u manjem broju u slezeni i limfnim čvorovima, dok nepokretne makrofage nalazimo u slezeni, limfnim čvorovima, jetrima i potkožnom tkivu (Andreis i sur., 2004. ) Na površini makrofaga su gotovo svi receptori za izlučevine (citokine) drugih tjelesnih stanica s kojima surađuju u imunodnoj reakciji.

Makrofagi luče niz monokina: IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , kojima djeluju na receptore limfocita T, kao i na receptore limfocita B, stanica NK, granulocita, ali i na druge monocite i makrofage. Prilikom predočavanja (prezentiranja) antigena limfocitima T na opni makrofaga u sklopu vlastitih molekula MHC II, IL-1 je nužni aktivirajući signal za limfocite T, dok su aktivirani mononuklearni fagociti glavni stanični izvor IL-1. Veliki broj podataka pokazuje da su makrofagi važan obrambeni čimbenik u obrani od tumora, ne samo kao stanice koje prezentiraju antigen, reguliraju imunološku reakciju, nego kao i potencijalne efektorske stanice koje izazivaju lizu tumora. Aktivirani makrofagi mogu postati citotoksični izravno ili posredstvom limfocita ovisnih o timusu. Slično makrofagima, limfociti T stvaraju niz limfokina: IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , kojima djeluju na makrofage, te limfocite T i B, stanice NK i granulocite. Obje vrste stanica mogu pojačati i vlastitu aktivnost (autokrino). INF- $\gamma$  je najjači čimbenik u aktivaciji makrofaga. Takve aktivirane makrofage obilježava bolje vezanje za podlogu, povećana pokretljivost i sposobnost fagocitiranja, kao i enzimska aktivnost (Oršolić 2010). Na taj način oboružani makrofagi su citotoksični za tumorske stanice, za razliku od normalni makrofaga koji ne iskazuju tu osobitost.

Međutim uloga i funkcija makrofaga tijekom rasta tumora se mijenja i tumoru pridruženi makrofagi (TAMs, engl. *Tumor-associated macrophages*) mogu pospješiti rast tumora. Kao što smo spomenuli, tijekom napredovanja tumora, tumor aktivno novači monocite i makrofage iz cirkulacije u tumor, gdje makrofagi stječu fenotipske i funkcionalne promjene u nazočnosti raznih mikrookolišnih signalnih molekula tumora i stromalnih stanica mijenjaju mikrookoliš tumora i ubrzavaju njegov rast. Makrofagi pridruženi tumoru podsjećaju na M2-polarizirane makrofage te su kritični modulatori okoline tumora, osiguravaju povoljno mikrookruženje za

rast i razvoj tumora kroz pojačanu angiogenezu i imunosupresiju. Ove imunosupresivne stanice usko su povezane s lošom prognozom oboljelih od raka. TAMs imaju slabi antigen-predodni kapacitet, a brojnim supresivnim čimbenicima smanjuju aktivnost citotoksičnih stanica T i stanica NK dok brojni čimbenici rasta i kemokina, proteaza te drugi čimbenici pojačavaju angiogenezu i progresiju tumora. Stoga, TAMs kao potencijalne ciljane stanice, su novi pristup za liječenje raka.

Temeljem navedenog istražili smo funkcionalnu sposobnost makrofaga te njihovu ulogu u stvaranju aktivnih molekula poput molekula NO koji ima citotoksični učinak na stanice tumora. Rezultati mjerenja koncentracije NO u uzorku ukupnih stanica ascitesa ukazuju da je srednja vrijednost koncentracije NO niža u odnosu na kontrolu kod obrade životinja s 2. CA 80 mg/kg (10x), 3. CA 80 mg/kg (3x) i 4. CA 80 mg/kg (3x). Dok je u peritonealnim makrofagima povećana razina NO. Smanjivanjem razine NO izostaje vazodilatacija kao odgovor na dušikov oksid i izazvanu pojačanu propustljivost već postojećih krvnih žila zbog djelovanja VEGF-a (Lešin i sur. 2008), čime se smanjuje dostava kisika. Međutim, niska razina aktivnosti NO može imati i stimulacijski utjecaj na rast tumora budući da izostaje citostatski i citolitički utjecaj visokih doza NO na tumorske stanice (Xu i sur. 2003), što je zapravo paradoks u kojem NO i RNS mogu imati genotoksična i angiogena svojstva.

Naši rezultati ukazuju da je broj funkcionalno aktivnih makrofaga povećan u svim skupinama obrađenim s CA u odnosu na kontrolu te da CA smanjuje razinu NO u stanicama EAT, dok razina NO je povećana u peritonealnim makrofagima, što potvrđuje da CA povećava M1 tumoricidnu djelotvornost TAMs; i blokira M2 tumorsku aktivnost TAMs. Sve u svemu, možemo zaključiti da CA može aktivirati makrofage i povećati njihov citotoksični učinak kroz povećanje proizvodnje NO te spriječiti rast tumora i angiogenezu.

Citotoksičnost makrofaga se temelji na bliskom doticaju s ciljnim stanicama, kao i jednakovrijednom broju efektorskih stanica (Oršolić 2010). Inhibicija tumorskog rasta se odnosi na citotoksične i citostatične mehanizme (što se odnosi na razinu aktivacije i osjetljivost tumorskih stanica). Tako, oslobađanje citotoksičnih čimbenika mijenja cjelovitost opne tumorskih stanica. Okoliš pak aktiviranih makrofaga može biti toksičan zbog metaboličke aktivnosti istih, kiselosti sredine, smanjene količine O<sub>2</sub>, nazočnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lizosomalnih enzima i NO što je vjerojatno osnova smrti ciljnih stanica posredovana makrofagima. Fagocitoza pak tumorskih stanica nije primarni mehanizam djelovanja makrofaga.

Pokazano je da CA djeluje imunomodulatorno (Oršolić, 2007, 2008), potičući aktivaciju makrofaga protiv stanica tumora. Osim što CA aktivira makrofage i pojačava preživljavane i zaštitu takođe i obnavlja imunološki sustav. Ovome svojstvu CA svakako doprinosi aktivacija

makrofaga, pošto oni imaju važnu ulogu u regulaciji imunološke reakcije i vode aktivaciji stanica T, B i NK. To je zasigurno i jedan od mogućih mehanizama učinka CA u protutumorskoj aktivnosti.

Brojni antioksidansi nazočni u hrani pokazuju izrazit protutumorski učinak temeljen na više različitih mehanizama, primjerice njihovim antioksidativnim svojstvima, inhibiciji prooksidativnih enzima (ciklooksigenaza, lipooksigenaza, ksantin oksidaza), inhibiciji prijenosa signalnih molekula, modulaciji aktivnosti onkogeni, 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. Nadalje, Oršolić i Bašić (2007) također pokazuju da flavonoidi djeluju selektivno na tumorske stanice u odnosu na normalne i da nije zanemariv imunostimulirajući učinak flavonoidnih sastavnica u odbacivanju tumora koji se prvenstveno temelji na aktivaciji makrofaga a preko njih na stimulaciji stanica B, T i NK.

Nadalje, reaktivne vrste kisika (ROS) su povezane s brojnim staničnim funkcijama, kao što su stanična proliferacija, diferencijacija, apoptoza i angiogeneza. Prema tome, inhibicija ROS, početnog koraka rasta tumora i angiogeneze, je obećavajući pristup za kemoprevenciju raka i terapiju.

Naime u mitotski aktivnim tkivima (sastavljenim od stanica koje sadržavaju genetski program koji podržava proliferaciju) i u visoko proliferativnim tkivima (nediferencirane, prekancerozne, kancerozne ili transformirane stanice) niske razine ROS-a mogu biti dodatni signal za proliferaciju. S druge strane, visoke koncentracije ROS-a u tim tkivima mogu inducirati apoptozu i na taj način potencijalno spriječiti daljnju diobu i karcinogenezu, točnije nediferencirane stanice su osjetljivije na citotoksičnost prouzročenu ROS-om od diferenciranih. Naši rezultati ukazuju da CA selektivno povećava nastanak ROS-a u stanicama tumora tijekom 10 dana obrade i mi pretpostavljamo da unutarstanična proizvodnja ROS-a može biti kritičan čimbenik u indukciji apoptoze i CA-selektivnog ubijanja stanica tumora, a čini se da inhibicija angiogeneze i rasta stanica EAT tumora u uznapredovalom stadiju, kada stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta temelji se na antioksidativnom kapacitetu CA.

Smatramo da je pojačana osjetljivost transformiranih stanica na CA povezana s nesposobnošću transformiranih stanica da sintetiziraju glutation kao odgovor na oksidativni stres, međutim

razina GSH u ascitesu pokusnih skupina nije bila smanjena što možemo pripisati velikoj heterogenosti stanica EAT. Redukcija oksidativnog stresa pomoću reducirajućih tvari sprječava proces apoptoze u nekim stanicama, dok u drugim redukcija oksidativnog stresa uzrokuje proces apoptoze (Oršolić i Bašić, 2007); tako da vanjske tvari mogu izazvati suprotne učinke unutar različitih okolnosti. Oksidativni stres mijenja signalni prijenos i genomske procese i može uzrokovati neodgovarajuću stimulaciju ili apoptozu izloženih stanica. Kontrola stanične proliferacije u odnosu na apoptozu u različitim tipovima životinjskih stanica je posredovana receptorima i događajima vezanim za njih, što vodi proizvodnji  $O_2^-$  i  $H_2O_2$ . Nadalje, stanična proliferacija i apoptoza su dva alternativna odgovora koja ovise o specifičnoj staničnoj redoks-ravnoteži u dato vrijeme. Da bi potvrdili navedene podatke svakako bi trebali tijekom obrade u različito vrijeme mjeriti apoptozu i razinu GSH gdje bi jasno vidjeli da osjetljive stanice povećanjem razine ROS-a propadaju a ostaju stanice otporne koje imaju povećanu razinu GSH kao i brojne druge prilagodbe koje dovode do otpornosti stanica na terapiju.

Zanimljivo je da zdrave stanice (jetra, bubreg i slezena) imaju smanjenu razinu lipidne peroksidacije i povećanje razine GSH, čime potvrđujemo antioksidacijski potencijal CA. Prooksidativna i antioksidativna sposobnost flavonoida kao i CA je davno potvrđena što svakako ovisi o brojnim čimbenicima kao što su pH, razina kisika i nazočnost metala s promjenjivom valencijom.

Temeljem svih rezultata možemo zaključiti da model angiogeneze prouzročen *ip* unosom stanica Ehrlichova ascitesnog tumora (EAT) u miša Swiss albino jest idealan model za proučavanje antioksidativnih, antiupalnih, apoptotskih, antitumorskih i antiangiogenetskih značajki CA na tumorske stanice te da se protutumorska djelotvornost CA temelji na inhibiciji proliferacije stanica EAT, antiangiogenom i antioksidativnom/prooksidativnom učinku te imunomodulacijskom učinku kroz povećanje M1 tumoricidne djelotvornosti TAMs; i blokiranja M2 tumorske aktivnosti TAMs.

## 5. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti kako slijedi:

1. CA statistički značajno smanjuje broj tumorskih stanica EAT u trbušnoj šupljini miševa nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora i povećava životni vijek miševa
2. Protutumorski učinak CA temelji se na antiangiogenom učinku i povećanoj imunomodulatornoj sposobnosti
3. CA povećava M1 tumoricidnu djelotvornost TAMs i blokira M2 tumorsku aktivnost TAMs
4. Citotoksična djelotvornost makrofaga na stanice tumora temelji se na povećanoj proizvodnji NO
5. Smrt tumorskih stanica u ranoj fazi obrade s CA temelji se na prooksidativnom učinku dok u kasnoj fazi obrade se temelji na inhibiciji angiogeneze kroz redukciju oksidacijskog stresa
6. Smanjena razina MDA i povećana razina GSH u jetri, slezeni i bubregu ukazuje na antioksidativni i zaštitni učinak CA na zdrave stanice
7. model angiogeneze prouzročen *ip* unosom stanica Ehrlichova ascitesnog tumora (EAT) u miša Swiss albino jest idealan model za proučavanje antioksidativnih, antiupalnih, apoptotskih, antitumorskih i antiangiogenetskih značajki CA



## 7. LITERATURA

1. Adair T. H., Montani J. P. (2010): *Angiogenesis*. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
2. Ah Mew N., Krivitzky L., McCarter R., Batshaw M., Tuchman M. (2013): Clinical outcomes of neonatal onset proximal versus distal urea cycle disorders do not differ. *J. Pediatr.* **162** (2): 324-329.
3. Aikens J., Dix T. A. (1991): Perohydroxyl radical (HOO) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* **266**: 15091-1598.
4. 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.
5. Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković 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
6. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović Šudar V., Marušić M., Tardi M., Višnjić D. (2010): *Imunologija*, 7. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb
7. Armstrong D. (1994): *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. Plenum Press: New York, 43-58.
8. Aruoma O. I. (1994): Free radicals and antioxidant strategies in sports. *J. Nutr. Biochem.* **5**: 370-81.
9. 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.
10. Biesalski H. K. (2007): Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **10** (6): 724-728.
11. Böhm H., Boeining H., Hempel J., Raab B., Kroke A. (1998): Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z. Ernährungswiss.* **37**: 147-163.
12. Bravo L. (1998): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**: 317-333.
13. Bryk R., Wolff D. J. (1998): Mechanism of inducible nitric oxide synthase inactivation by aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl)lysine. *Biochem. J.* **37** (14): 4844-4852.

14. Campbell L., Saville C. R., Murray P. J., Cruickshank S. M., Hardman M. J. (2013): Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. *J. Invest. Derm.* **133**: 2461-2470.
15. Cannon R. O. (1998): Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin. Chem.* **44**: 1809-1819.
16. Carmeliet P. i K. Jain R. K. (2011): Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**: 417-427.
17. Catala A. (2009): Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lip.* **157** (1): 1-11.
18. Cheeseman K. H., Slater T. F. (1993): An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* **49**: 481-93.
19. Clapp C., Thebault S., Jeziorski M. C., Martínez De La Escalera G. (2009): Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiol. Rev.* **89** (4): 1177-1215.
20. Close G. L., Ashton T. A., McArdle A., MacLaren D. P. (2005): The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **142**: 257-66.
21. Cooke J. P., Losordo D. L. (2002): Nitric Oxide and Angiogenesis. *Circ.* **105**: 2133-2135.
22. Cooper G. M., Hausman R. E. (2010): Stanica, 5. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb
23. Corraliza I. M., Campo M. L., Soler G., Modolell M. (1994): Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Meth.* **174**: 231-235.
24. Dedić Plavetić N., Letilović T., Vrbanec D. (2003): Uloga angiogeneze u rastu i progresiji tumora. *Liječ. Vjesn.* **125**: 260-265.
25. Escarpa A., Gonzalez M. C. (2001): An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31**: 57-139.
26. Esterbauer H., Schaur F. J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **11**: 81-128.

27. Falchook G. S., Wheler J. J., Naing A., Jackson E. F., Janku F., Hong D., Ng C. S., Tannir N. M., Lawhorn K. N., Huang M., Angelo L. S., Vishwamitra D., Hess K., Howard A. N., Parkhurst K. L., Amin H. M., Kurzrock R. (2014): Targeting hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in combination with antiangiogenic therapy: A phase I trial of bortezomib plus bevacizumab. *Oncotarget* **5** (21): 10280-10292.
28. Folkman J. (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N. Engl. J. Med.* **285**: 1182-1186.
29. Folkman J. (2002): Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* **29** (6 Suppl 16): 15-18.
30. Fukumura D., Gohongi T., Kadambi A., Izumi Y., Ang J., Yun C. O., Buerk D. G., Huang P. L., Jain R. K. (2001): Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (5): 2604-2609.
31. Fukumura D., Kashiwagi S., Jain R. K. (2006): The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 521-534.
32. Gerald D., Berra E., Frapart Y. M., Chan D. A., Giaccia A. J., Mansuy D., Pouyssegur J., Yaniv M., Mehta Grigoriou F. (2004): JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* **118** (17): 781-794.
33. Halliwell B. (2000): Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc. Res.* **47** (3): 410-418.
34. Halliwell B., Gutteridge J. M. (1995): The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Rad. Biol. Med.* **18**: 125-6.
35. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine* 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press, New York.
36. Hansel T. T., Kharitonov S. A., Donnelly L. E., Erin E. M., Currie M. G., Moore W. M., Manning P. T., Recker D. P., Barnes P. J. (2003): A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB J.* **17** (10): 1298-1300.
37. 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.
- 38.** Hudiček Martinčić G., Kušan Jukić M., Salihagić Kadić A. (2004): Dušikov oksid – važna signalna molekula u normalnoj i patološkoj trudnoći. *Liječ. Vjesn.* **126**: 80-85.
- 39.** Hulbert A. J. (2010): Metabolism and longevity: is there a role for membrane fatty acids? *Integr. Comp. Biol.* **50** (5): 808-817.
- 40.** Iyer R. K., Yoo P. K., Kern R. M., Rozengurt N., Tsoa R., O'Brien W. E., Yu H., Grody W. W., Cederbaum S. D. (2002): Mouse model for human arginase deficiency. *Mol. Cell. Biol.* **22** (13): 4491-4498.
- 41.** Kanwar J. R., Kanwar R. K., Burrow H., Baratchi S. (2009): Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr. Med. Chem.* **16** (19): 2373-2394.
- 42.** Kim J. H., Yu J., Mahoney N. E., Chan K. L., Molyneux R. J., Varga J., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Campbell B. C. (2008): Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* **122** (1-2): 49-60.
- 43.** Kroll J. (1998): VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**: 743-746.
- 44.** Lešin J., Zlopaša G., Plavec A., Aleksandrova Stanojević A., Vujić G. (2008): Angiogeneza u malignih tumorima. *Medicus* **17** (1): 143-148.
- 45.** Liao H. F., Chen Y. Y., Liu J. J., Hsu M. L., Shieh H. J., Liao H. J., Sieh C. J., Ming-Shi Shiao M. S., Chen Y. J. (2003): Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *Agric. Food Chem.* **51** (27): 7907-7912.
- 46.** Lingaraju S. M., Keshavaiah K., Salimath B. P. (2008): Inhibition of in vivo angiogenesis by *Anacardium occidentale* L. involves repression of the cytokine VEGF gene expression. *Drug. Discov. Ther.* **2** (4): 234-244.
- 47.** 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in mice. *Immunol. Cell Biol.* **89**: 130-142.

48. Lovrić J., Mesić M., Macan M., Koprivanac M., Kelava M., Bradamante V. (2008. ): Measurment of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Period. Biol.* **110**: 63-67.
49. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951. ): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
50. Manach C., Schalbert A., Morand C., Rémèsy C., Jiménez L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavilability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79** (5): 727-747.
51. 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): 677-686.
52. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. (2009): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23** (11): 549-555.
53. Martinez F. O., Sica A., Mantovani A., Locati M. (2008): Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **13**: 453-461.
54. Matsunaga T., Weihrauch D. W., Moniz M. C., Tessmer J., David C., Chilian W., Chilian W. M. (2002): Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circ. J.* **105**: 2185-2191.
55. McCawley L. J., Matrisian L. M. (2000): Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol. Med. Today* **6** (4): 149-156.
56. McCord J. M. (2000): The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108** (8): 652-659.
57. Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T. C. (2000): The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52** (4): 673-751.
58. Murray P. J., Wynn T. A. (2011): Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* **89** (4): 557-563.
59. Murray P. J., Wynn T. A. (2011): Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11** (11): 723-737.

- 60.** Nagaraj S. R. M, Lingaraj S. M., Balaraju Y., Kumar A., Salimath B. P. (2012): MTA1 induced angiogenesis, migration and tumor growth is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. IOSR J. Pharm. **2** (4): 34-43.
- 61.** Nematollahi S., Nematbakhsh M., Haghjooyjavanmard S., Khazaei M., Salehi M. (2009): Inducible nitric oxide synthase modulates angiogenesis in ischemic hindlimb of rat. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. **153** (2): 125-130.
- 62.** Orban Z., Mitsiades N., Burke T. R., Tsokos M., Chrousos G. P. (2000): Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. Neuroimmunomod. **7**: 99-105.
- 63.** Oršolić N. (2010): A review of propolis antitumor action *in vivo* and *in vitro*. J. of ApiProd. and ApiMed. Scien. **2** (1): 1-20.
- 64.** Oršolić N., Bašić I. (2003): Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. J. Ethnopharmacol. **84** (2-3): 265-273.
- 65.** Oršolić N., Bašić I. (2007): Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. Phytochem. and Pharmacol. III, Recent Progress in Medicinal Plants **17**: 55-113.
- 66.** Oršolić N., Šver L., Terzić S., Tadić Z., Bašić I. (2003): Inhibitory effect of water-soluble derivate of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastazing ability: a possible mode of antitumor action. Nutr. Cancer **47** (2): 156-163.
- 67.** Papapetropoulos A., Garcia Cardena G., Madri J. A., Sessa W. C. (1997): Nitric oxide contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J. Clin. Invest. **100**: 3131-3139.
- 68.** Rak J. W., St Croix B. D., Kerbel R. S. (1995): Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. Anticancer Drugs **6** (1): 3-18.
- 69.** Reed T. T. (2011): Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. Free Rad. Biol. Med. **51** (7): 1302-1319.
- 70.** Rodrigo R. (2009): Oxidative stress and antioxidants: Their role in human disease. Nova Biomedical Books, New York.

71. Rodríguez P. C., Ochoa A. C. (2008): Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* **222**: 180-191.
72. Saraswati S., Agrawal S. S., Alhaider A. A. (2013): Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial: dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor. *Chem. Biol. Interact.* **206 (2)**: 153-165.
73. Sharma J. N., Al-Omran A., Parvathy S. S. (2007): Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol.* **15 (6)**: 252-259.
74. Stevanović J., Borozan S., Jović S., Ignjatović I. (2011): Fiziologija slobodnih radikala. *Vet. glasnik* **65 (1-2)**: 95-107.
75. Štefan L., Tepšić T., Zavidic T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* **43**: 84-93.
76. Través P. G., Luque A., Hortelano S. (2012): Macrophages, inflammation and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators Inflamm.* **2012**: ID 568783.
77. Velikova M., Bankova V., Sorkun K., Houcine S., Tsvetkova I., Kujungiev A. (2000): Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z. Naturforsch. [c]* **55 (9-10)**: 790-793.
78. Xie Q. W., Leung M., Fuortes M., Sassa S., Nathan C. (1996): Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93 (10)**: 4891-4896.
79. Xu W., Liu L. Z., Loizidou M., Ahmed M., Charles I. G. (2002): The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.* **12 (5-6)**: 311-320.
80. Yang J. M., Xu Z., Wu H., Zhu H., Wu X., Hait W. N. (2003): Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **1**: 420-427.
81. Yoon J. H., Baek S. J. (2005): Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.* **46 (5)**: 585-596.
82. Ziche M., Morbidelli L., Choudhuri R. (1997): Nitric oxide syntase lies downstream from vascular endothelia growth factor-induced angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**: 2625-2634.

## SLIKE SA INTERNETA

- 83.** <http://www.agrool.gr/files/caffeic%20acid.jpg>
- 84.** <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/Images/MacrophagesInCancerFig1.png>
- 85.** <http://www.supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/9203>
- 86.** <http://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol/>



## 7. ŽIVOTOPIS

**Datum rođenja:** 26. 10. 1983., Banja Luka (Bosna i Hercegovina)

**Obrazovanje:** 2012. – 2015. PMF – Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalna biologija – fiziologija i imunobiologija

2006. – 2012. PMF – Biološki odsjek, preddiplomski studij biologije

1998. – 2002. Srednja škola za medicinske sestre – tehničare Mlinarska, Zagreb

**Posao:** ožujak 2008. – danas KBC ZAGREB

Klinika za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata

- Specijalistički zavod za dječju otorinolaringologiju
- Specijalistički zavod za kirurgiju štitnjače
- Zavod za kirurgiju glave i vrata
  - Odjel za tumore glave i vrata
  - Odjel za kraniomaksilofacijalnu kirurgiju
  - Odsjek za intenzivnu njegu onkoloških bolesnika
  - Odjel za plastičnu i rekonstruktivnu kirurgiju glave i vrata
- Zavod za rinosinusologiju
- Zavod za otoneurologiju

prosinao 2002. – prosinao 2006. KBC ZAGREB

Klinika za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata

- Specijalistički zavod za dječju otorinolaringologiju
- Zavod za kirurgiju glave i vrata
- Zavod za rinosinusologiju
- Previjalište I i II

**Demonstrator:** ljetni semestar akademske godine 2013. / 2014.

- praktikum iz kolegija Imunologija tumora i metastaza
- praktikum iz kolegija Fiziologija oksidativnoga stresa u ljudi i životinja

### **Laboratorijska stručna praksa**

- ožujak 2013. Institut za imunologiju, Laboratorij za molekularnu biomedicinu (pod vodstvom dr. sc. Tanje Košutić Gulija)
- travanj 2010. – kolovoz 2010. PMF – Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju (pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić)

### **Rad na projektu: Učinkovitost fenolnih kiselina na polarizaciju makrofaga, angiogenezu i rast Ehrlichovog asitesnog tumora**

- travanj 2014. – završetka projekta  
PMF – Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju  
(nositelj projekta : prof. dr. sc. Nada Oršolić)

**Noć biologije:** 2009., 2010. i 2011. Zoologijski zavod; 2012. Zavod za animalnu fiziologiju

### **Sažeci u zbornicima skupova**

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. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

### **Znanstveni radovi u drugim časopisima**

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 (sažetak, znanstveni)

### **Interna literatura ORL Klinika KBC Zagreb**

- M. Kukolj: Postupak s pacijentom kod gušenja (2011), protokol
- S. Palaković Hasan i Marina Kukolj: Toaleta govorne proteze (2015), brošura



# PRILOG



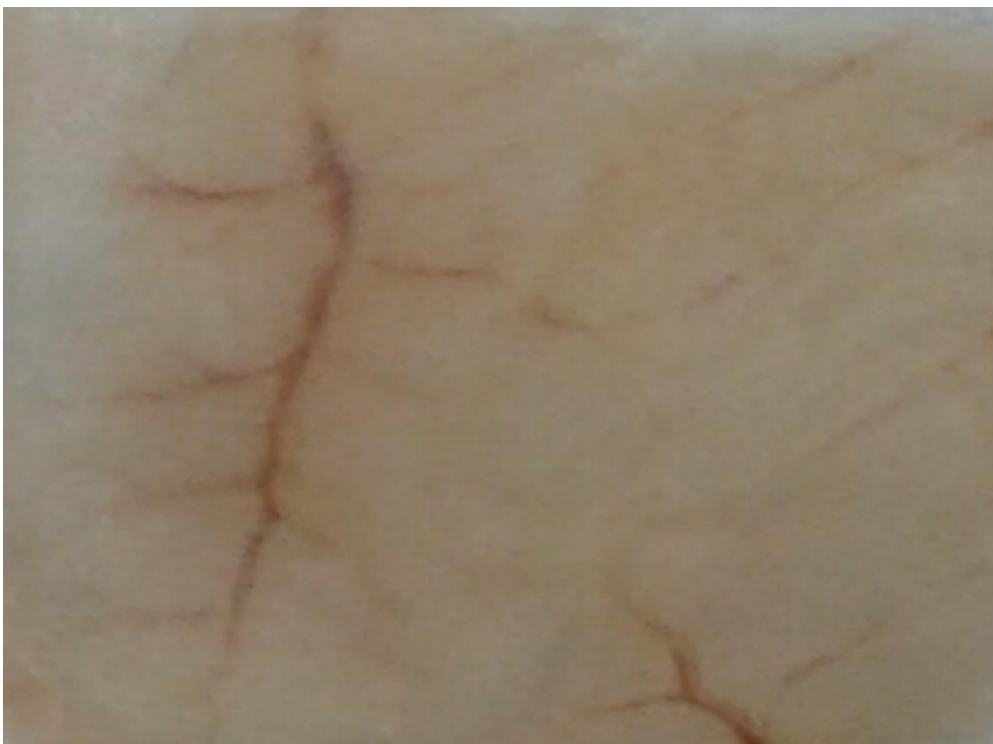
**Prilog I. Izolirana potrbušnica miša nositelja EAT (kontrola), makroskopski prikaz krvnih žila**



**Prilog II. Izolirana potrbušnica miša obrađenog sa CA 40 mg/kg tijekom 10 dana, makroskopski prikaz krvnih žila**



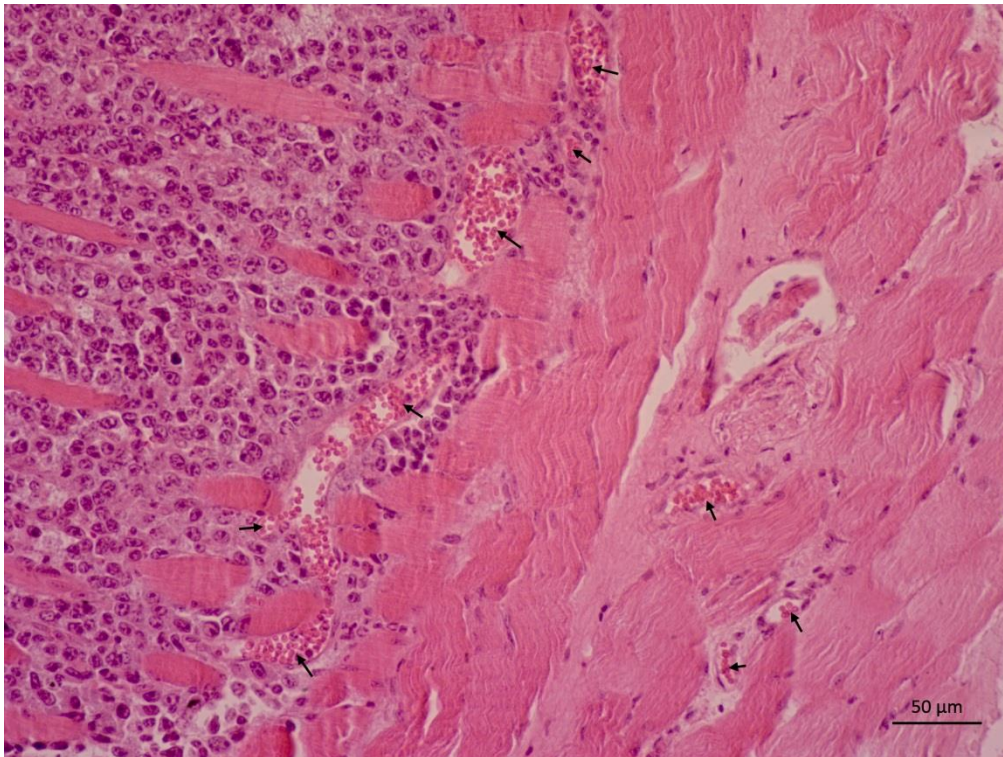
**Prilog III. Izolirana potrbušnica miša obrađenog sa CA 80 mg/kg tijekom 10 dana, makroskopski prikaz krvnih žila**



**Prilog IV. Izolirana potrbušnica miša obrađenog sa CA 40 mg/kg tijekom 3 dana, makroskopski prikaz krvnih žila**

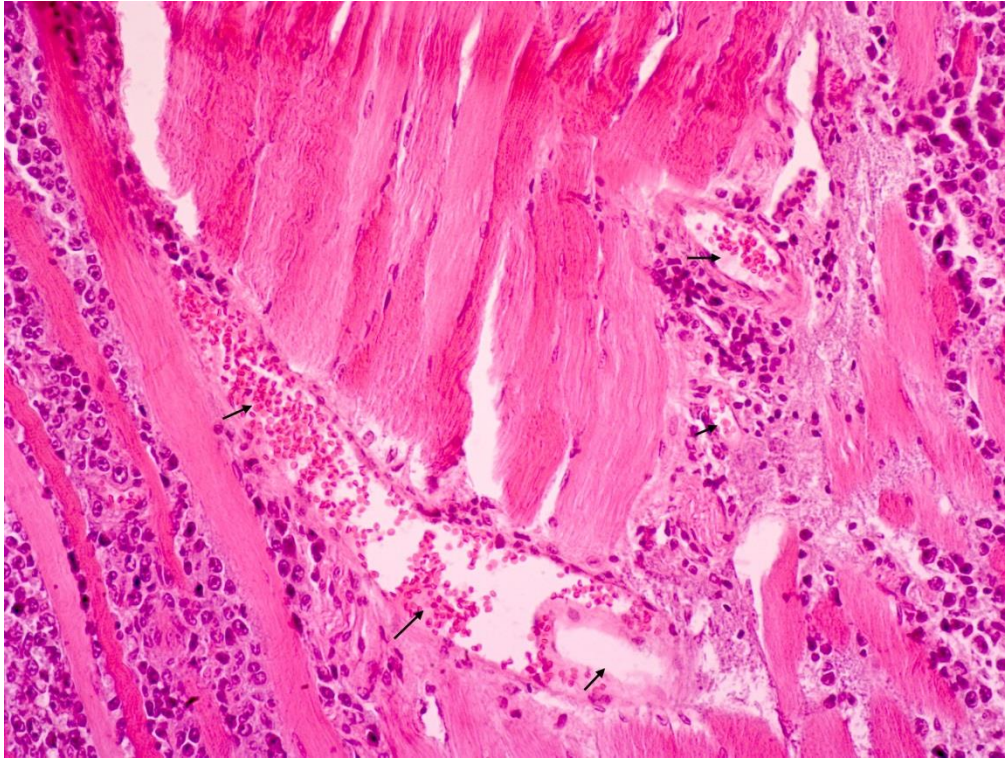


**Prilog V. Izolirana potrbušnica miša obrađenog sa CA 80 mg/kg tijekom 3 dana, makroskopski prikaz krvnih žila**

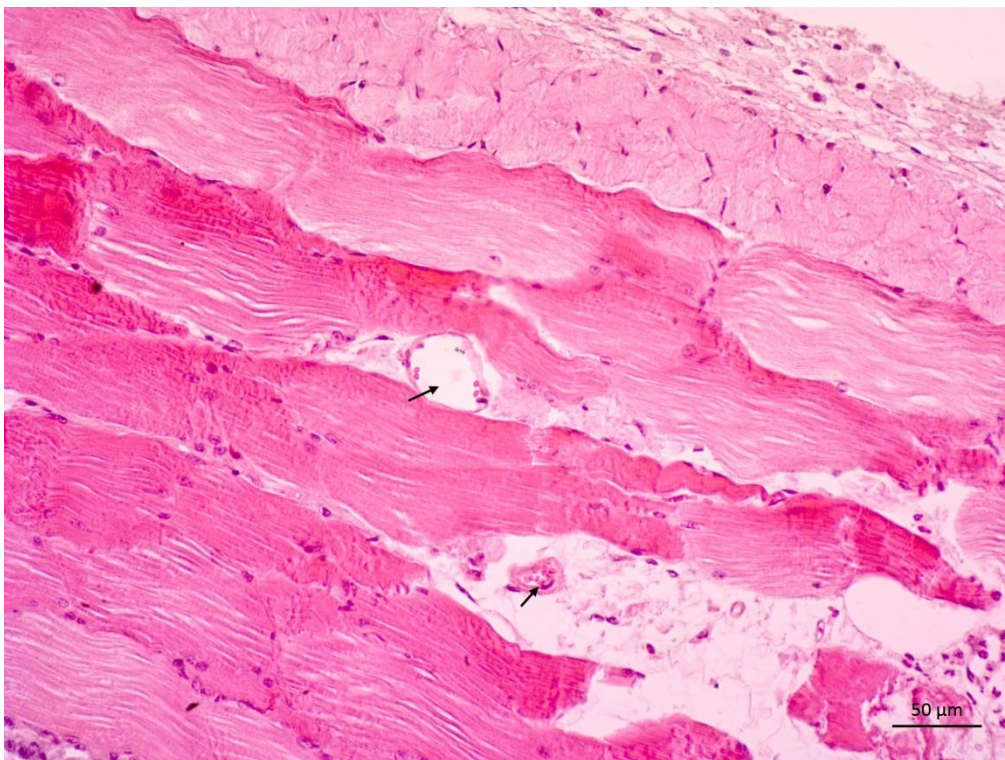


**Prilog V. Histološki preparat potrbušnice miša nositelja EAT (kontrola: HE x 200)**



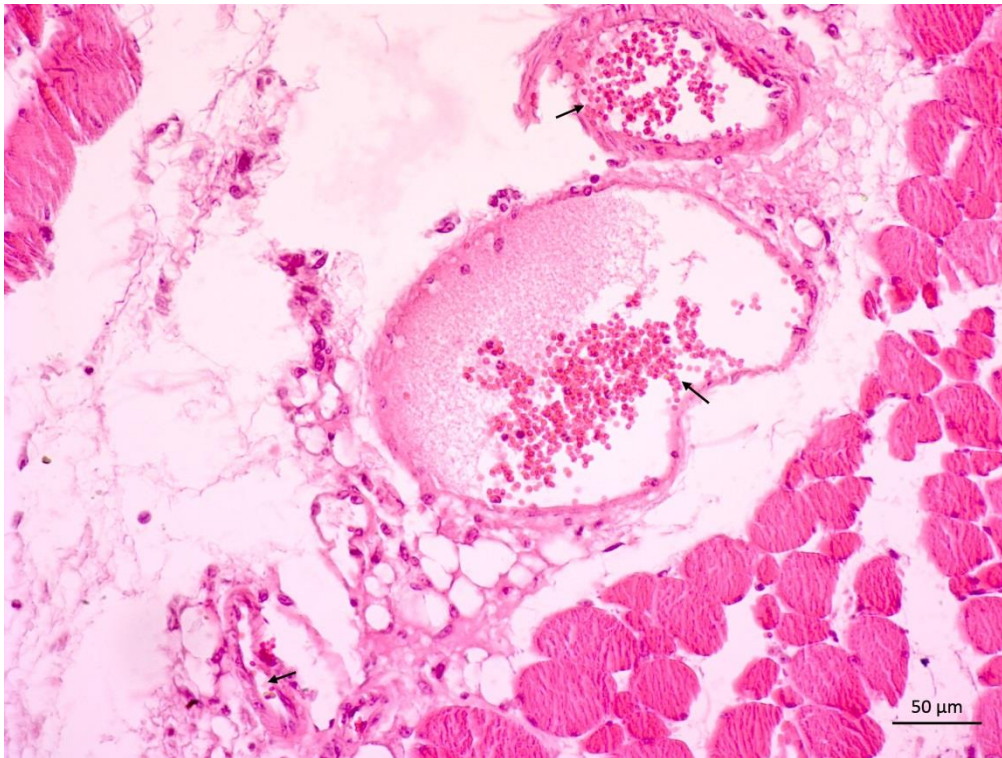


**Prilog VI. Histološki preparat potrbušnice miša obrađenog sa CA 40 mg/kg tijekom 10 dana (HE x 200)**

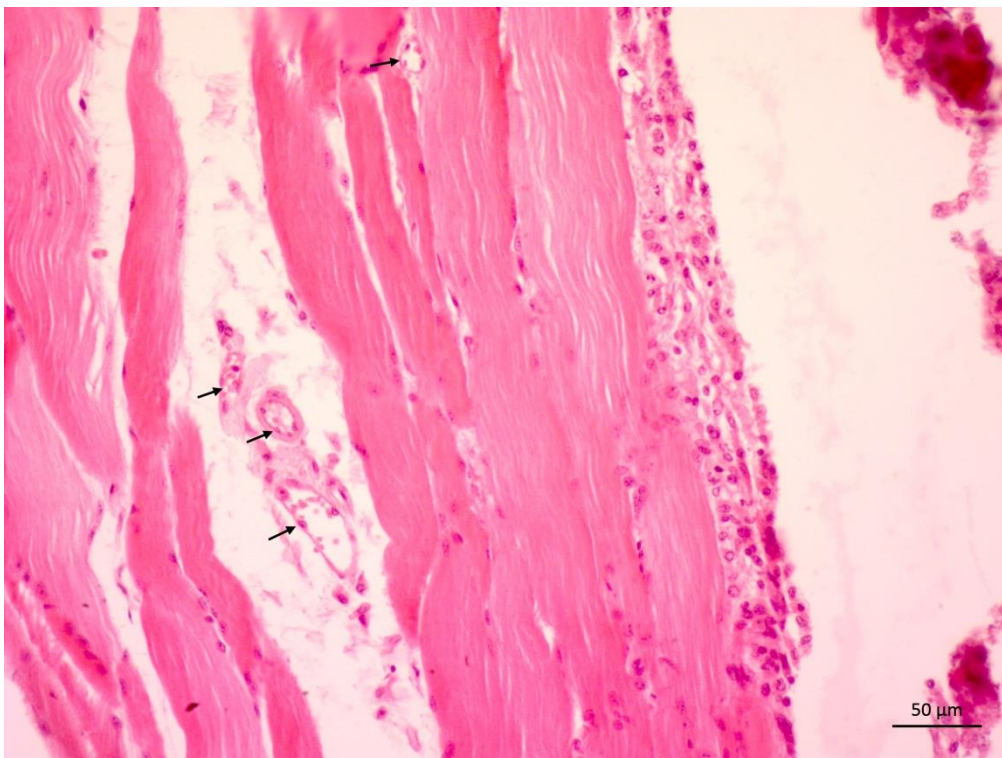


**Prilog VII. Histološki preparat potrbušnice miša obrađenog sa CA 80 mg/kg tijekom 10 dana (HE x 200)**



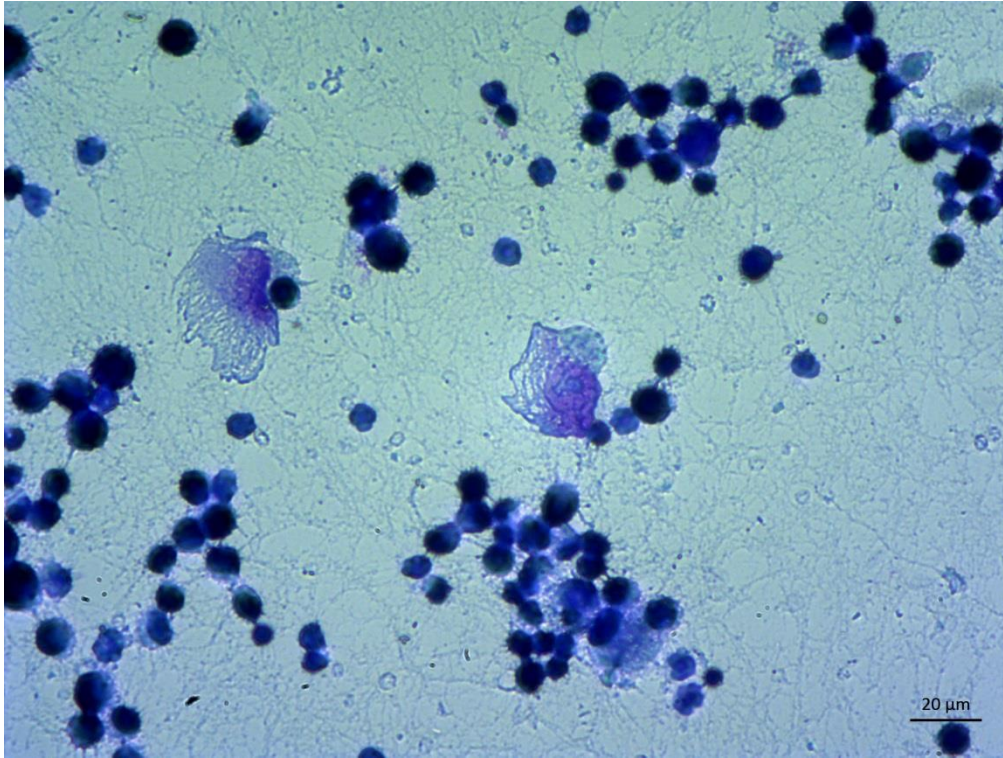


**Prilog VIII. Histološki preparat potrbušnice miša obrađenog sa CA 40 mg/kg tijekom 3 dana  
(HE x 200)**

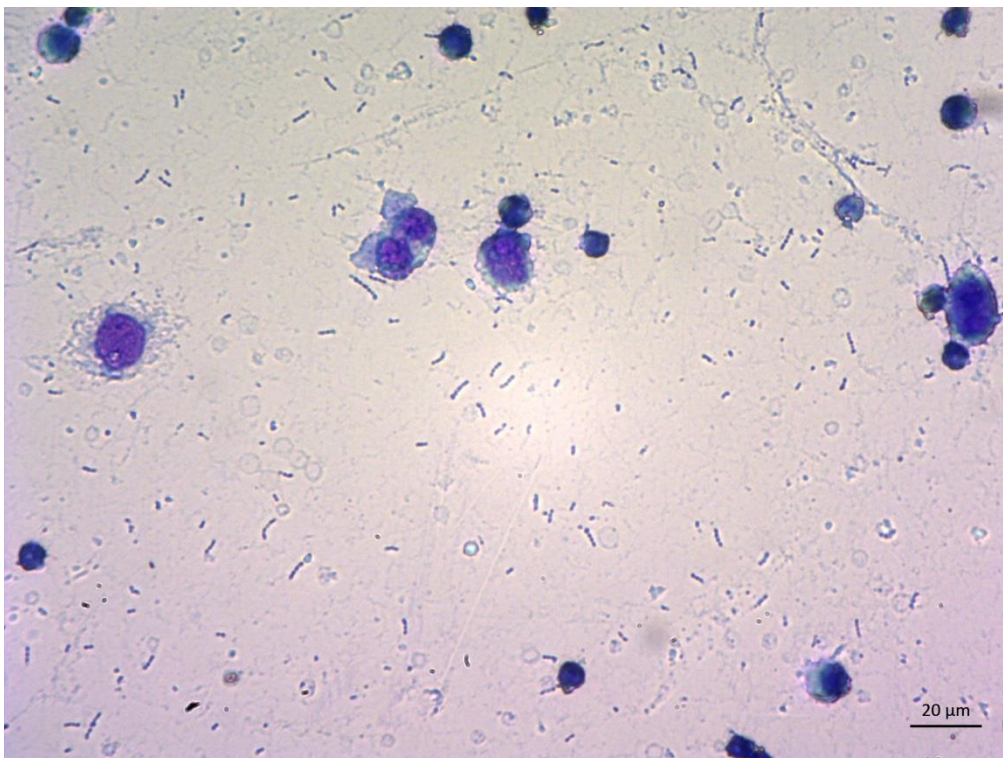


**Prilog IX. Histološki preparat potrbušnice miša obrađenog sa CA 80 mg/kg tijekom 3 dana  
(HE x 200)**



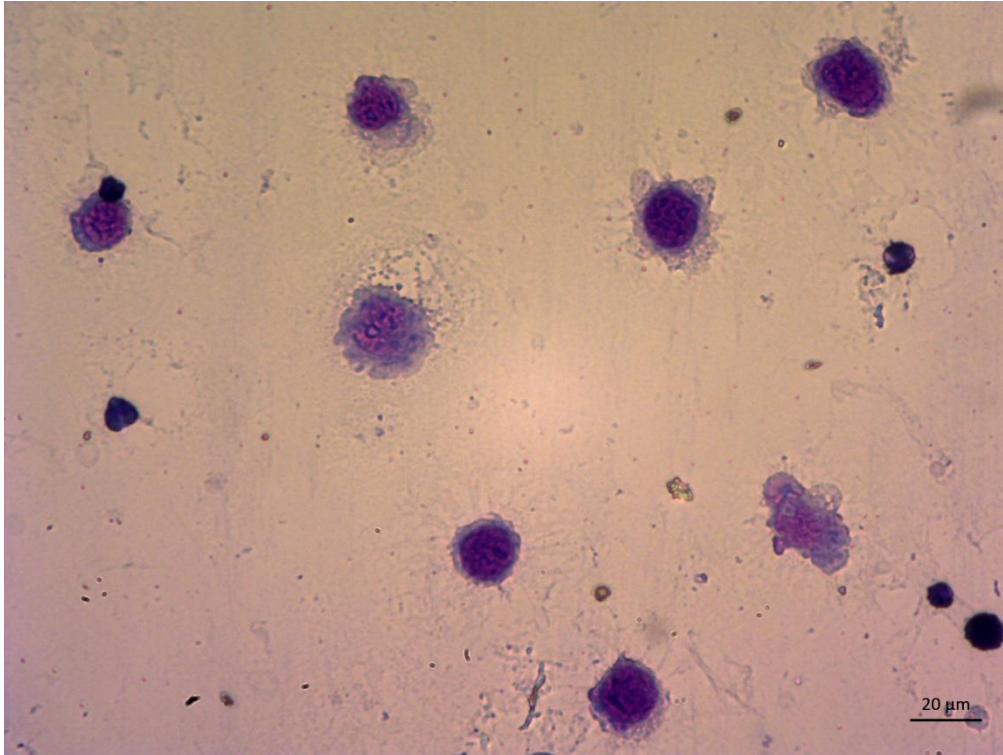


**Prilog X. Mikroskopska slika funkcionalne aktivnosti makrofaga kod miša nositelja EAT  
(kontrola: May Grünwald i Giemsa x 400)**

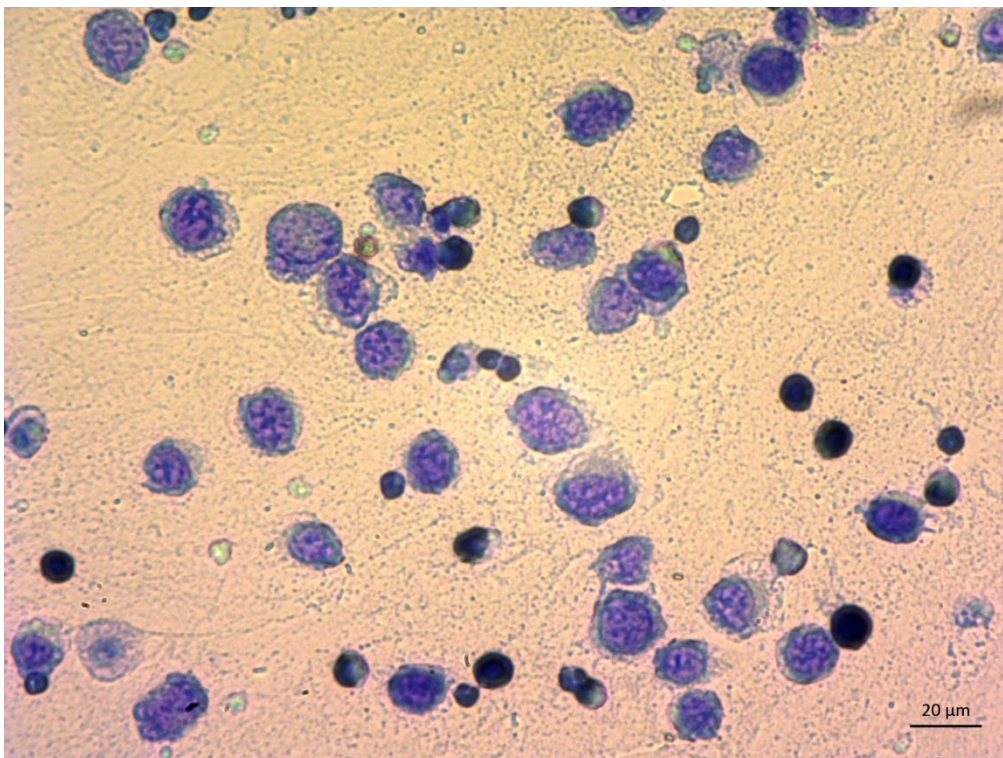


**Prilog XI. Mikroskopska slika funkcionalne aktivnosti makrofaga kod miša obrađenog sa  
CA 40 mg/kg tijekom 10 dana (May Grünwald i Giemsa x 400)**

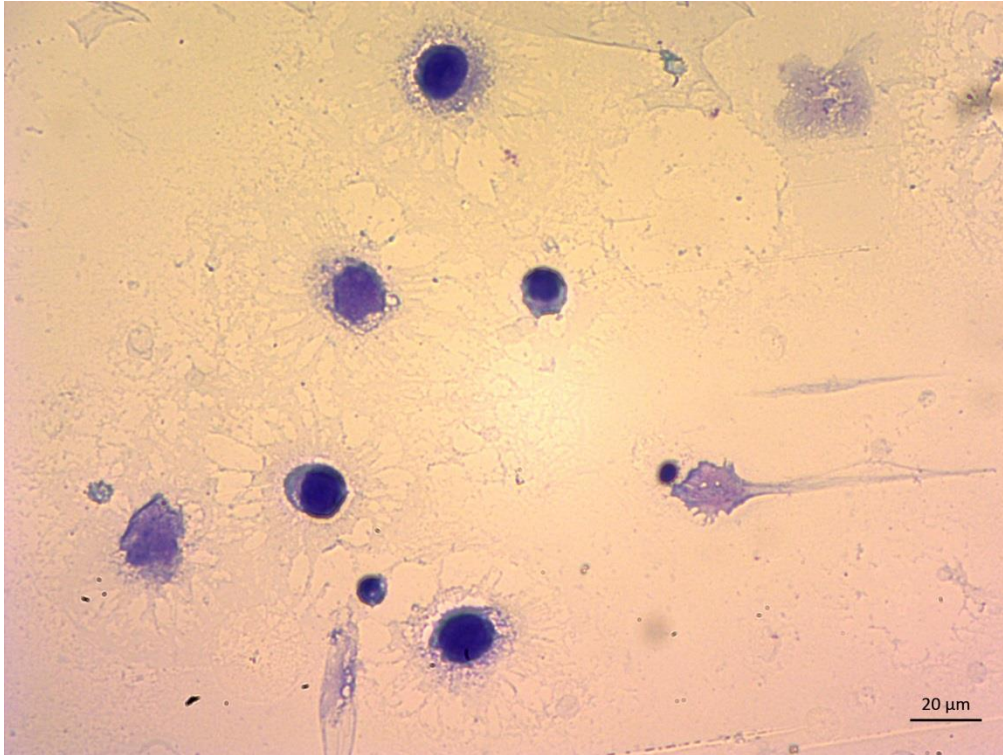




**Prilog XII. Mikroskopska slika funkcionalne aktivnosti makrofaga kod miša obrađenog sa CA 80 mg/kg tijekom 10 dana (May Grünwald i Giemsa x 400)**



**Prilog XIII. Mikroskopska slika funkcionalne aktivnosti makrofaga kod miša obrađenog sa CA 40 mg/kg tijekom 3 dana (May Grünwald i Giemsa x 400)**



**Prilog XIV. Mikroskopska slika funkcionalne aktivnosti makrofaga kod miša obrađenog sa CA 80 mg/kg tijekom 3 dana (May Grünwald i Giemsa x 400)**