

Združeno djelovanje cisplatine i resveratrola na metaloproteinaznu aktivnost u Ehrlichovom ascitesnom solidnom tumoru miša

Pinjuh, Dominik

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:588142>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dominik Pinjuh

**Združeno djelovanje cisplatine i resveratrola na metaloproteinaznu
aktivnost u Ehrlichovom ascitesnom solidnom tumoru miša**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić te neposrednim vodstvom Dyane Odeh, *spec. techn. aliment.* Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

ZDRUŽENO DJELOVANJE CISPLATINE I RESVERATROLA NA
METALOPROTEINAZNU AKTIVNOST U EHRLICHOVOM ASCITESNOM
SOLIDNOM TUMORU MIŠA

Dominik Pinjuh

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti združeno djelovanje citostatika cisplatine i resveratrola na inhibiciju angiogeneze i razvoja tumora, povećanje životnog vijeka domaćina, te istražiti aktivnost makrofaga u tkivu tumora kroz analizu inducibilne dušik oksid sintaze. Uz to cilj je bio utvrditi kako višekratno djelovanje citostatika djeluje na razinu proteina toplinskog stresa i da li obrada resveratrolom modulira njihovu aktivnost vodeći dokidanju rezistencije tumorskih stanica na citostatik. Tumor je izazvan injiciranjem 1×10^6 stanica EAT subkutano (sc) u bedro miševa soja Swiss albino. Obrada životinja s EAT započeta je unosom resveratrola *per os* u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana. Dobiveni rezultati pokazuju da resveratrol združen s cisplatinom može inhibirati proces angiogeneze, usporiti rast tumora te povećati životni vijek nositelja tumora jačanjem imunomodulatorne aktivnosti domaćina kroz modulaciju proteina toplinskog stresa HSP-90 i HSP-70 i smanjuje štetne učinke cisplatine na normalne stanice i tkiva, što ukazuje na mogućnost kliničke uporabe ove kombinacije.

(63 stranice, 16 slika, 1 tablica, 146 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: solidni tumor, resveratrol, cisplatina, angiogeneza, kemorezistencija

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Neposredni voditelj: Dyana Odeh, spec. techn. aliment.

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Prof. dr. sc. Božena Mitić

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Rad prihvaćen: 17. veljače 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduation Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

COMBINED EFFECT OF CISPLATIN AND RESVERATROL ON
METALLOPROTEINASE ACTIVITY IN EHRLICH ASCITES SOLID MOUSE TUMOR

Dominik Pinjuh

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The aim of this study was to investigate the combined effect of cytostatic cisplatin and resveratrol on inhibition of angiogenesis and tumor development, increase of host lifespan, and to investigate macrophage activity in tumor tissue through analysis of inducible nitric oxide synthase. In addition, the aim was to determine how the repeated action of cytostatics affects the level of heat shock proteins and whether resveratrol treatment modulates their activity leading to the abolition of tumor cell resistance to cytostatics. The tumor was induced by injecting 1×10^6 EAT cells subcutaneously (sc) into the thighs of Swiss albino mice. Treatment of animals with EAT was initiated by administration of resveratrol *per os* at a dose of 50 mg/kg for 5 consecutive days beginning on day 2 after tumor injection while cisplatin was injected at a dose of 2.5 mg/kg on days 10 and 12 and at a dose of 5 mg/kg on day 15. The results show that cisplatin combined with resveratrol can inhibit angiogenesis, slow tumor growth, and increase host lifespan by enhancing host immunomodulatory activity by modulating heat shock proteins HSP-90 and HSP70 and reducing the adverse effects of cisplatin on normal cells and tissues, which suggest the possibility of clinical use of this combination.

(63 pages, 16 figures, 1 table, 146 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Keywords: solid tumor, resveratrol, cisplatin, angiogenesis, chemoresistance

Supervisor: PhD Nada Oršolić, Full Professor

Assistant Supervisor: Dyana Odeh, spec. techn. aliment.

Reviews: PhD Nada Oršolić, Full Professor

PhD Božena Mitić, Full Professor

PhD Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 17th of February, 2021.

Popis Kratica:

CDPP- cisplatina (engl. *cis-diamminedichloroplatinum(II)*)

DMSO- dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

EAT- Ehrlichov ascitesni tumor (engl. *Ehrlich ascites tumor*)

ECM- izvanstanični matriks (engl. *Extracellular matrix*)

EMT- epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *Epithelial- mesenchymal transition*)

FGF- čimbenik rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast growth factor*)

HIF 1- hipoksijom 1 induciran čimbenik (engl. *Hypoxia-inducible factor*)

HSP- proteini toplinskog šoka (engl. *Heat- shock proteins*)

IGF-I -inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. *Insulin-like growth factor*)

iNOS- inducibilna dušik oksid sintaza

MMP- matriks metaloproteinaza (engl. *Matrix metalloproteinase*)

NER- mehanizam izrezivanja nukleotida (engl. *Nucleotide excision repair*)

PDGF- trombocitni čimbenik rasta (engl. *Platelet derived growth factor*)

ROS- reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*)

TAM- tumoru pridruženi makrofagi (engl. *Tumor- associated macrophages*)

TGF- α - transformirajući čimbenik rasta (engl. *Transforming growth factor alpha*)

TNF- α - čimbenik nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor alpha*)

VEGF- krvožilni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor*)

VPF- čimbenik permeabilnosti krvnih žila (engl. *Vascular permeability factor*)

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Biologija tumora	3
1.2. Angiogeneza	6
1.2.1. Tumorski mikrokoliš	9
1.2.2. Endogeni angiogeni čimbenici	11
1.2.3. Čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF).....	11
1.2.4. Matriks metaloproteinaze (MMPs)	12
1.3. Invazivnost i metastaziranje tumora	14
1.4. Cisplatina	14
1.5. Resveratrol	17
1.6. Cilj.....	19
2. Materijali i metode	20
2.1 Materijali	20
2.1.1. Pokusne životinje	20
2.1.2. Tumorske stanice.....	20
2.1.3. Kemijski spojevi.....	20
2.1.4. Laboratorijska oprema.....	21
2.2. Metode.....	21
2.2.1. Obrada životinja	21
2.2.2. Praćenje promjene tjelesne mase i procjena toksičnosti	22
2.2.3. Mjerenje volumena tumora i inhibicija rasta tumora	23
2.2.4. Preživljavanje	23
2.2.5. Izolacija i priprema tkiva.....	23
2.2.6. Određivanje razine krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF)	24
2.2.7. Određivanje aktivnosti matriks metaloproteinaza 2 (MMP-2) i 9 (MMP-9)	25
2.2.8. Određivanje razine proteina toplinskog stresa HSP-70 (<i>engl. HSP-70 heat-shock protein</i>).....	26
2.2.9. Određivanje razine proteina toplinskog stresa HSP-90 (<i>engl. HSP-90 heat-shock protein</i>)	26
2.2.10. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u	27
2.2.11. Statistička obrada podataka	28
3. Rezultati	29
3.1. Promjena tjelesne mase životinja	29

3.2. Promjena mase unutarnjih organa	30
3.3. Promjena volumena tumora	32
3.4. Inhibicija rasta tumora.....	33
3.5. Preživljavanje životinja	34
3.6. Razina krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) u tumorskim stanicama	36
3.7. Razina matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) u tumorskim stanicama.....	37
3.8. Razina matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tumorskim stanicama.....	38
3.9. Razina proteina toplinskog stresa HSP-70 (<i>engl. HSP-70 heat-shock protein</i>).....	40
3.10. Razina proteina toplinskog stresa HSP-90 (<i>engl. HSP-90 heat-shock protein</i>).....	41
3.11. Aktivnost dušikovog oksida (NO) u tumorskim stanicama	42
4. Rasprava	43
5. Zaključak	49
6. Literatura	50

1. Uvod

Angiogeneza je proces nastanka novih krvnih žila i jedan je od glavnih čimbenika koji potiču rast tumora. Javlja se kao odgovor na hipoksiju koja zajedno s nedostatkom nutrijenata pojačava ekspresiju upalnih signala i citokina koji novače krvožilne stanice za stvaranje spleta novih krvnih žila tumora (Zuazo-Gaztelu i Casanovas, 2018). Tumori bez krvne opskrbe mogu narasti samo do veličine od 1-2 mm³ i formiranje krvnih žila ključno je za daljnji rast tumora kao i proces metastaziranja. Angiogeneza se odvija kroz nekoliko koraka koji uključuju: otpuštanje angiogenih čimbenika, otpuštanje proteolitičkih enzima (razgrađuju bazalnu membranu postkapilarne venule), migraciju endotelnih stanica prema tumoru te proliferaciju i sazrijevanje endotelnih stanica u pravu krvnu žilu. Tumori koji imaju veći postotak angiogenih stanica ujedno pokazuju veći metastatski potencijal i mnogo su agresivniji (John i Tuszynski, 2001). Matriks metaloproteinaze (MMP) imaju ključnu ulogu u procesu tumorske angiogeneze tako što sudjeluju u razgradnji izvanstaničnog matriksa i probijanju bazalne membrane. Proteolitička aktivnost ove porodice enzima također je zadužena za kapilarnu elongaciju, formiranje lumena žile te remodeliranje izvanstaničnog matriksa. MMP služe kao biomarkeri i potencijalni terapijski cilj kod liječenja raka, ali i drugih krvožilnih bolesti (Deryugina i Quigley, 2015; Wang i Khalil, 2018). Upravo zbog navedene uloge angiogeneze vlada veliki interes za razvoj anti-angiogenih pristupa koji bi mogli inhibirati vaskularizaciju tumora i spriječiti njegov daljnji rast i širenje. Uobičajeni pristupi obuhvaćaju primjenu anti-angiogenih lijekova koji ciljaju i blokiraju aktivnosti pro-angiogenih čimbenika. S obzirom na to da se o njihovoj učinkovitosti i dalje vode rasprave, novi pristupi koriste kombiniranje anti-angiogenih sredstava s kemoterapijom ili imunoterapijom (Teleanu i sur., 2019).

U inhibiciji proliferacije i rasta tumora primjenjuje se često cistostatik cisplatina kao jedan od najučinkovitijih kemoterapeutika u liječenju raka. Kemoterapija na bazi platine koristi se u liječenju raznih tipova tumora, a posebice je preporučena kao prva linija liječenja za većinu uznapredovalih i operativno nedostupnih karcinoma kao što je primjerice rak pluća (Ramer i sur., 2018). Citotoksična aktivnost cisplatine temelji se na induciranju oksidacijskog stresa, oštećenju DNA i aktivaciji signalnih putova koji rezultiraju apoptozom. Osim što primjena cisplatine ima za cilj ubiti (eliminirati) tumorske stanice ona također djeluje i na normalne, zdrave stanice domaćina izazivajući neurotoksičnost,

suprimiranje aktivnosti koštane srži, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost i rezistenciju tumorskih stanica na lijek (Oršolić i sur., 2013).

U svrhu unaprjeđenja i poboljšanja zdravlja ljudi sve više znanstvenika usredotočuje se na primjenu terapije porijeklom iz biogenih izvora. Povezivanjem prirodnih spojeva i kemoterapeutika poboljšala bi se osjetljivost stanica raka, prevladala rezistencija, pojačala citotoksičnost terapeutika, te bi ishodi liječenja mogli bi biti znatno poboljšani, a nuspojave značajno smanjene. Primjer takvog spoja je resveratrol, fitoestrogen i polifenol, koji posjeduje antioksidacijska, protuupalna, kardioprotektivna i protutumorska svojstva. Primjena resveratrola može poništiti rezistenciju na više lijekova i u kombinaciji s cisplatinom ima aditivni i/ili sinergijski učinak povećanja kemoosjetljivosti stanica raka (Ko i sur., 2017; Liu i sur., 2018). Također je otkriveno da resveratrol pojačava učinke cisplatine na inhibiciju proliferacije stanica raka, induciranje apoptoze, otpuštanje citokroma c i abnormalnu ekspresiju proteina Bcl-2 i Bax (Ramer i sur., 2018).

Učinak združenog djelovanja cisplatine i resveratrola na metaloproteinaznu aktivnost, angiogenezu i rast tumora te preživljavanje miševa biti će istraženo na modelu miša nositelja solidnog oblika Ehrlichovog ascitesnog tumora kao pogodnog modela u tumorskoj biologiji korisnog za proučavanje patogeneze tumora i razvoja protutumorskih lijekova (Mishra i sur., 2018).

1.1. Biologija tumora

Tumori ili novotvorine su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Nazivaju se još i neoplazmama (grč. *neos* - nov, *plasia* – rast, tj. novi rast). Za zloćudne tumore, koji mogu biti opasni po život, rabi se i izraz rak (lat. *cancer*). Prema definiciji koju je prije oko 70 godina predložio australsko-engleski patolog Rupert Willis, tumori su abnormalne nakupine tkiva čiji rast nadmašuje rast normalnih tkiva, nije usklađen s rastom normalnih tkiva, a nastavlja rasti u prekomjernom obliku i nakon što je uklonjen stimulans koji je uzrokovao taj rast (Jukić i sur., 2008).

Pojavnost tumora može se shvatiti kao narušavanje cjelovitosti organizma, do čega dolazi tako da jedna stanica u organizmu izgubi sposobnost adekvatnog odgovaranja na signale koji kontroliraju njezin rast, diobu i staničnu smrt. Nekontroliranom diobom jedne jedine promijenjene stanice (monoklonalno podrijetlo) nastaje tumor. Međutim, tijekom razvoja tumora u pojedinim tumorskim stanicama dolazi do dodatnih promjena, tako da je većina tumora heterogena te se sastoji od različitih populacija stanica koji se međusobno fenotipski i genotipski razlikuju. Nastanak novih populacija tumorskih stanica izaziva promjene u svojstvima tumora tijekom vremena što je označeno kao tumorska progresija. Tumorska je progresija najčešće usmjerena prema povećanju zloćudnosti. Uz navedenu definiciju tumora može se pridodati da je rast tumora nesvrhovit, autonoman, progresivan, parazitski, nepravilan i neorganiziran (Šamija i sur., 2006).

Tumor zbog poremećaja proliferacije može nastati iz bilo koje vrste stanica u tijelu, tako da postoji više od stotinu vrsta tumora koji se jako razlikuju po ponašanju i odgovoru na liječenje. Za kliničke i terapijske potrebe većina tumora može se svrstati u dvije skupine: dobroćudne i zloćudne. Dobroćudni ili benigni tumori, primjerice kožna bradavica, ostaju ograničeni na mjestu na kojem su nastali, ne šire se u susjedna normalna tkiva niti u udaljene dijelove tijela, ne ugrožavaju bitno zdravlje i imaju povoljan klinički ishod. Zloćudni ili maligni tumori rastu infiltrativno razarajući okolno tkivo organa u kojem su nastali te su u stanju proširiti se na susjedna normalna tkiva i čitavo tijelo preko krvožilnog ili limfnog sustava. Takav način širenja zove se metastaziranje i upravo zbog toga su maligni tumori izrazito opasni jer ako se ne liječe mogu djelovati pogubno i uzrokovati smrt bolesnika u kojeg su nastali (Cooper, 2004; Jukić i sur., 2008).

I dobroćudni i zloćudni tumori klasificiraju se prema vrsti stanica iz koje su nastali. Većina tumora može se svrstati u jednu od tri glavne skupine: karcinome, sarkome i leukemije ili limfome. Karcinomi, kojima pripada otprilike 90% slučajeva raka u ljudi, zloćudne su bolesti epitelnih stanica. Sarkomi su solidni tumori vezivnih tkiva poput mišića, kosti, hrskavice, fibroznog tkiva i kao takvi se kod ljudi rijetko pojavljuju. Leukemije i limfomi na koje otpada otprilike 7% zloćudnih bolesti u ljudi, nastaju iz krvotvornih stanica ili iz stanica imunološkog sustava. Tumori se dalje klasificiraju prema tkivu iz kojeg su nastali (primjerice karcinom pluća ili dojke) i vrsti zahvaćenih stanica (primjerice fibrosarkomi nastaju iz fibroblasta, a eritroidne leukemije iz preteča eritrocita) (Cooper, 2004).

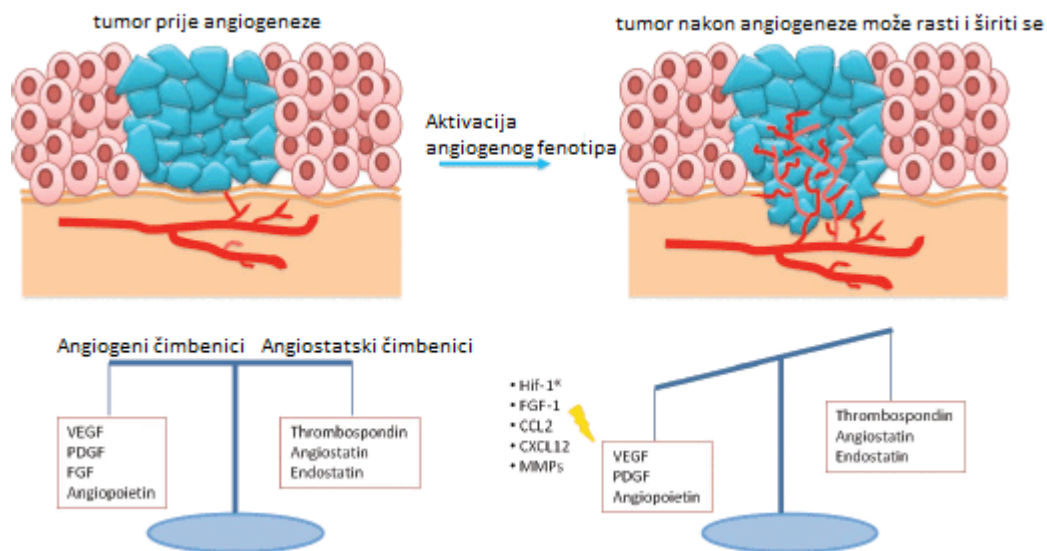
Danas je poznato da su promjene koje dovode do pretvorbe zdrave stanice u tumorsku, genske. Tri su temeljne skupine gena koji su važni za nastanak tumora i na različite su načine uključeni u kontrolu stanične diobe, rasta i diferencijacije, a to su onkogeni, tumor- supresorski geni i geni za popravak pogriješaka u molekuli DNA. Kako bi tumor mogao nastati, potrebno je da se u stanici nakupi više različitih genskih promjena, a istraživanja upućuju na to da je za nastanak tumora potrebno šest do sedam neovisnih događaja. Onkogeni su promijenjena verzija normalnih staničnih gena koji se nazivaju protoonkogeni. Pokazano je da protoonkogeni sudjeluju u regulaciji normalnoga staničnog rasta i diobe, te da su odgovorni za autonomni rast neoplastičnih stanica. Proteini koji nastaju od aktiviranih protoonkogenata svrstani su u nekoliko skupina kao što su čimbenici rasta, receptori za čimbenike rasta, signalne molekule i transkripcijski čimbenici. Najvažniji procesi koji dovode do funkcionalnih onkogenata su točkaste mutacije (npr. oštećenja DNA koja se očituju zamjenom jedne baze drugom, s posljedičnom sintezom proteina u kojemu je jedna aminokiselina zamijenjena drugom), genska amplifikacija (npr. prekomjerno izražavanje inače normalnih protoonkogenata), translokacija (npr. prebacivanje nekih protoonkogenata na kromosomski lokus u kojem će taj gen biti prekomjerno stimuliran) ili insercija virusnoga gena (insercija virusnih gena poremeti transkripciju normalnih gena te dovodi do neoplastične transformacije inficirane stanice). Za nastanak onkogenata potrebna je promjena samo u jednom alelu da bi se očitovao njegov učinak. Tumor-supresorski geni djeluju kao antioonkogeni i suprimiraju prekomjernu proliferaciju stanica i može se reći da su povezani s negativnom regulacijom stanične diobe i rasta. Proteinski produkti tumor-supresorskih gena sudjeluju u popravku oštećenja DNA, zaustavljanju staničnog ciklusa ne dopuštajući replikaciju oštećene DNA i poticanju apoptoze. Mutacije tumor- supresorskih gena obično imaju recesivan učinak, tj. potrebna je inaktivacija oba alela da bi se očitovao njihov učinak (Šamija i sur., 2006; Jukić i sur., 2008).

Osim toga, nastanak tumora popraćen je i nekim epigenetskim promjenama kao što su promjene u metilaciji molekula DNA i promjene u građi i funkciji kromatina (poput različitih kovalentnih modifikacija histona). Iako tumori nastaju kao posljedica genskih promjena u jednoj stanici, daljnji nastanak i tijek tumorske bolesti u velikoj mjeri ovise o tumorskom okolišu koji čine susjedne stanice i izvanstanična stroma, razne signalne topljive molekule, imunološki i hormonalni sustav te razni drugi čimbenici u organizmu ili njegovu okolišu (Šamija i sur., 2006).

1.2. Angiogeneza

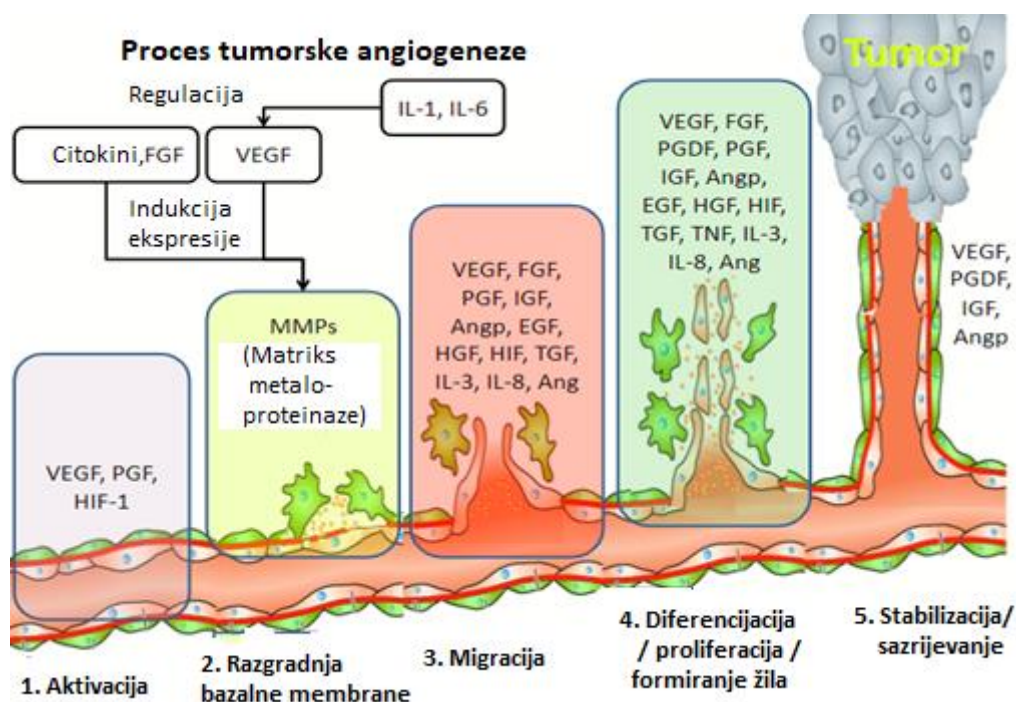
Stanice tumora baš kao i ostale stanice u organizmu kako bi preživjele i proliferirale imaju potrebu za odgovarajućim krvožilnim sustavom koji bi im osiguravao kisik, hranjive tvari i odlaganje otpadnih produkata (Lugano i sur., 2020). Osim što služe za dopremanje hranjivih tvari i kisika, krvne žile također omogućavaju širenje tumorskih stanica na udaljena mjesta, promovirajući metastaziranje. Tumorska angiogeneza stoga se definira kao proces stvaranja, prodiranja i rasta krvnih žila u mikrookoliš tumora (Zuazo-Gaztelu i Casanovas, 2018).

Angiogeneza se normalno odvija tijekom ljudskog rasta i razvoja i krvožilno remodeliranje je kontrolirana serija događaja koji vode neovaskularizaciji kako bi se zadovoljile tkivne potrebe (Carmeliet i Jain, 2011). Krvne žile i stromalne komponente reagiraju na pro- i anti-angiogene čimbenike koji omogućuju modeliranje krvnih žila tijekom normalnog rasta tkiva, zacjeljivanja rana i trudnoće. Međutim, u patološkim stanjima poput karcinoma isti angiogeni signalni putovi su inducirani i prekomjerno iskorišteni (Folkman, 2002). Kako bi bile krvno opskrbljene, tumorske stanice pomiču ravnotežu prema stimulirajućim angiogenim čimbenicima da bi se potaknuo rast krvnih žila privlačenjem i aktiviranjem stanica iz tumorskog mikrookoliša. Jačina i kvaliteta angiogenog odgovora u konačnici je određena zbrojem pro- i anti-angiogenih signala, točnije, njihovim jedinstvenim aktivnostima na više tipova stanica (Slika 1). Razumijevanje regulacije ovih različitih komponenata potrebno je za dizajn i razvoj učinkovitih antiangiogenih terapija za liječenje raka (Weis i Cheresch, 2011).



Slika 1. Regulacija angiogeneze između proangiogenih i antiangiogenih čimbenika (preuzeto i prilagođeno prema Gelao i sur., 2013)

Aktivacija angiogenog fenotipa javlja se kao odgovor na hipoksiju, koja zajedno s nedostatkom hranjivih tvari pojačava ekspresiju upalnih signala i citokina koji novače krvožilne stanice za stvaranje novog spleta tumorskih žila (Muz i sur., 2015; Elshamy i sur., 2016) (Slika 2). Još tijekom rane progresije tumora, hipoksija pokreće transkripciju nekoliko gena koji su ključni posrednici angiogeneze poput krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) i čimbenika rasta izoliranog iz trombocita (PDGF) (Yang i sur., 2013). Ukratko, aktivacija angiogenog procesa uključuje razgradnju krvožilnog izvanstaničnog matriksa (ECM) na različitim razinama što omogućuje naknadnu invaziju endotelnih stanica i stvaranje novih krvnih žila (Vandekeere i sur., 2015). Osim uloge tumorskih stanica kao glavnih sekretornih promotora migracije endotelnih stanica, za stabilnost novih žila potrebna je i interakcija s drugim stromalnim stanicama poput pericita.



Slika 2. Proces rasta krvnih žila reguliran proangiogenim čimbenicima (preuzeto i prilagođeno prema <https://slideplayer.com/slide/9011892/>)

Uobičajeni mehanizmi neovaskularizacije uključuju vaskulogenezu i „klijajuću“ (engl. *Sprouting angiogenesis*) angiogenezu. Oba mehanizma su važna za stvaranje i remodeliranje krvnih žila za vrijeme normalnog rasta i razvoja, a jednako tako su i ponovno aktivirani tijekom faze progresije tumora. Vaskulogeneza se definira kao *de novo* stvaranje krvnih žila diferencijacijom vaskularnih progenitorskih stanica iz koštane srži, dok „klijajuća“

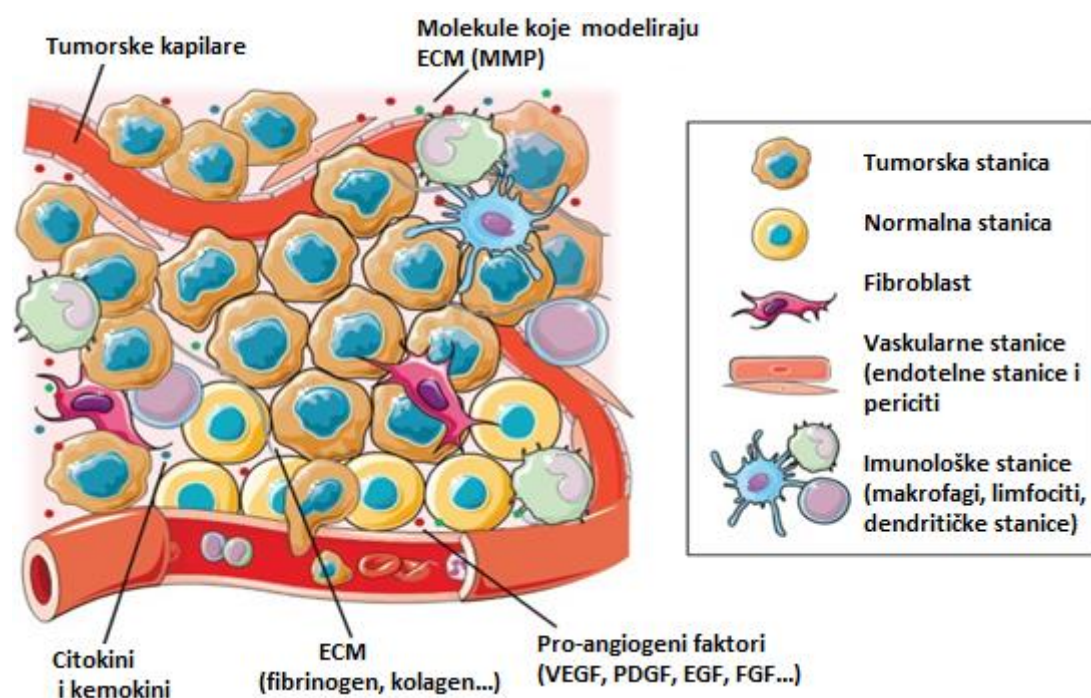
angiogeneza označava stvaranje novih krvožilnih struktura iz već postojeće mreže krvnih žila (Zuazo-Gaztelu i Casanovas, 2018).

Angiogeneza iz već postojeće mreže krvnih žila pokreće se destabilizacijom endotelno-pericitnog kontakta koje je inače presudno za održavanje cjelovitosti i stanja mirovanja krvnih žila. Jednom kada se bazalna membrana koja štiti endotelne stanice destabilizira, te stanice prolaze kroz endotelno-mezenhimalnu tranziciju kojom se pokreću njihove proliferativne, migracijske i invazivne sposobnosti. Takva aktivacija nadalje pojačava oslobađanje nekoliko proteaza koje induciraju razgradnju ECM-a i bazalne membrane, što dovodi do migracije i proliferacije krvožilnih stanica. Polarizacija migrirajućih endotelnih stanica na kraju uspostavlja lumen žile, tvoreći nezrelu krvnu žilu (Ferrara i sur., 2003). Tada se aktivira obrnuti mezenhimalno-endotelni prijelazni program koji vraća endotelne stanice u njihovo prethodno stanje mirovanja. Posljednji korak, poznatiji kao sazrijevanje žila, karakterizira odsutnost pro-angiogenih čimbenika, novačenje periendotelnih i muralnih stanica te sinteza nove bazalne membrane (Jain, 2003).

Nakon angiogene stimulacije mirujuće endotelne stanice mijenjaju svoj fenotip prema invazivnom i migrirajućem ponašanju, istodobno aktivirajući sekreciju proteaza, remodeliranje kontakata stanica-stanica i promjenu polarnosti. Vodeće endotelne stanice tijekom procesa stvaranja novih žila poznate su kao "vršne stanice". Njihov odgovor na VEGF signalizaciju uključuje izduživanje velikih filopodija koje omogućuju vođenje formiranja novih žila, kao i oslobađanje molekularnih signala koji novače stromalne stanice za stabilizaciju žila. S druge strane, endotelne stanice također mogu evoluirati u visoko proliferativne stanice smještene na „stabljici“ angiogenog izdanka. Te su prateće stanice „stabljike“ odgovorne za stvaranje cijevi kapilara i razgranatost krvnih žila, osiguravajući tako širenje krvožilne strukture kao odgovor na VEGF (Gerhardt i sur., 2003). Stanice „stabljike“ također sudjeluju u odlaganju bazalne membrane i uspostavljaju veze sa susjednim stanicama kako bi ojačale cjelovitost novonastalih izdanaka krvnih žila (Dejana i sur., 2009).

1.2.1. Tumorski mikrookoliš

Tumorski mikrookoliš sastavljen je od složene mreže normalnih, tumorskih i stromalnih stanica, izvanstaničnog matriksa i izlučenih čimbenika, što se savršeno uklapa u definiciju tumora kao organskog ekosustava (Liotta i Kohn, 2001). Promjena genske ekspresije tumorskih stanica izaziva poremećaj u normalnoj tkivnoj homeostazi, pogodujući lučenju određenih molekula poput citokina, čimbenika rasta i sličnih molekula koje novače stromalne stanice. Stanice koje čine tumorsku stromu su fibroblasti povezani s rakom (engl. *Cancer-associated fibroblasts*), endotelne stanice, periciti, adipociti i imune stanice, uključujući monocite, makrofage, limfocite i dendritičke stanice (Slika 3). Te su stanice smještene u heterogenom izvanstaničnom matriksu i na njih utječu promjene biofizičkih parametara, uključujući oksigenaciju i pH (Hanahan i Weinberg, 2011).



Slika 3. Stanične i molekularne sastavnice tumorskog ekosustava koje oblikuju tumorski angiogeni okoliš (preuzeto i prilagođeno prema Zuazo-Gaztelu i Casanovas, 2018)

Tumorske stanice nastanjene su u simbiozi s ostatkom tijela oponašajući i kopirajući nekoliko normalnih fizioloških procesa na temelju njihove okolne strome. Zajedno s kontinuiranom proliferacijom i novačenjem imunoloških stanica, angiogeneza je jedan od promotora tumorskog rasta i preživljavanja (Mittal i sur., 2014).

Jednom kada tumorska lezija dosegne veličinu od nekoliko milimetara (1-2 mm) u promjeru, hipoksija i nedostatak hranjivih tvari pokreću aktivaciju angiogenog fenotipa ("angiogeni switch") koji omogućuju tumoru daljnji rast i napredak (Folkman i Hanahan, 1991). Tumorske stanice iskorištavaju svoje mikrookruženje oslobađajući citokine i čimbenike rasta kako bi aktivirale normalne, mirne stanice oko sebe i pokrenule kaskadu događaja koji brzo postaju disregulirani. Na primjer, krvožilni endotelni čimbenik rasta (VEGF) oslobođen iz tumorskih stanica potiče nicanje (klijanje) i proliferaciju endotelnih stanica. Iako induciranje angiogeneze u početku može pružiti tumoru više kisika i hranjivih tvari, krajnji je odgovor slab, jer su kontinuiranim preuređivanjem krvne žile propusne i prekomjerno razgranate (vijugave), što uzrokuje nepravilan protok krvi. Mjesta bazalne lamine koja su izložena tijekom krvožilnog curenja novače i aktiviraju trombocite, koji zauzvrat oslobađaju angiogene čimbenike propusnosti u lokalno okruženje da bi dodatno potaknuli lokalni odgovor. Povećane količine trombocitnog čimbenika rasta (PDGF) koje oslobađaju trombociti i aktivirane endotelne stanice novače i aktiviraju perivaskularne stanice. Iako perivaskularna pokrivenost novonastalih žila obično osigurava krvožilnu stabilnost i sazrijevanje, ona ne dovodi u potpunosti do nastanka zrelih žila s pravilnom funkcijom jer su te žile i dalje izložene trajnim stimulacijskim signalima unutar tumorskog mikrookoliša (Weis i Cheresch, 2005). Daljnje remodeliranje potaknuto je novačenjem fibroblasta koji talože proteine izvanstaničnog matriksa u pokušaju popravljivanja nastalog oštećenja, ali također i oslobađaju stimulacijske čimbenike koji povećavaju propusnost žila (Franco i sur., 2010; Gonda i sur., 2010). Matriks metaloproteinaze cijepaju i razgrađuju izvanstanični matriks ili izlažu prethodno skrivene epitope koji funkcioniraju kao endogeni inhibitori angiogeneze, na primjer, tumstatin ili endostatin (Sund i sur., 2005).

Mijeloidne stanice privučene VEGF-om, PDGF-om i FGF-om u hipoksičnim područjima mogu se diferencirati u tumoru pridružene makrofage ili neutrofile, koji se usko povezuju s krvožilnim endotelnim stanicama i oslobađaju vlastite zalihe citokina i pro-angiogenih čimbenika rasta (Grunewald i sur., 2006). S vremenom, invazija mijeloidnih stanica u tumor rezultira akumulacijom tih stanica (koje čine čak 25% mase tumora) i dodatno potiče napredovanje tumora (Schmid i sur., 2011). Novačenje mijeloidnih stanica povezano je s lošijim ishodom kod brojnih tipova tumora u kliničkoj praksi (Ruhrberg i De Palma, 2010). Primjerice, u osoba s klasičnim Hodgkinovim limfomom veći sadržaj tumoru pridruženih makrofaga bio je povezan sa skraćenim vremenom preživljenja pacijenta (Steidl i sur., 2010).

1.2.2. Endogeni angiogeni čimbenici

Poznato je da veliki broj pro-angiogenih čimbenika i njihovih srodnih receptora potiče stvaranje krvnih žila u tumorima, uključujući krvožilni endotelni čimbenik rasta (VEGF), čimbenik rasta fibroblasta 2 (FGF-2), čimbenik rasta izveden iz trombocita (PDGF), transformirajući čimbenik rasta (TGF- α), čimbenik nekroze tumora (TNF- α) i brojne druge kemokine. Ti su čimbenici često izraženi istodobno i na taj način učinkovito surađuju u različitim fazama tumorske angiogeneze. (Lugano i sur., 2020; Nishida i sur., 2006).

Povećanje sinteze (up-regulacija) pro-angiogenih čimbenika samo po sebi nije dovoljno za pokretanje rasta krvnih žila i ono zahtijeva da funkcioniranje negativnih regulatora ili inhibitora rasta krvnih žila bude potisnuto (down-regulirano). Postoje mnogi proteini koji mogu inhibirati angiogenezu, uključujući angiostatin, endostatin, interferon α , trombocitni čimbenik 4, trombospondin i tkivni inhibitor metaloproteinaze-1, -2 i -3. Angiostatin se sastoji od jednog ili više fragmenata plazminogena (Stack i sur., 1999). On inducira apoptozu u endotelnim i tumorskim stanicama, te inhibira migraciju i stvaranje tubula u endotelnim stanicama (Claesson-Welsh i sur., 1998). Imunohistokemijsko ispitivanje tumora tretiranih angiostatinom ukazalo je na smanjenje ekspresije mRNA za VEGF i bFGF (Kirsch i sur., 1998). Endostatin je 20-kDa C-terminalni fragment kolagena tipa XVIII (komponenta bazalne membrane) (O'Reilly i sur., 1997). Veže se na $\alpha 5 \beta 1$ / $\alpha v \beta 3$ integrin, glavni receptor fibronektina u endotelnim stanicama (Rehn, 2001) i može blokirati adheziju endotelnih stanica (Wickström i sur., 2002). Endostatin također inhibira čimbenike rasta (npr. bFGF i VEGF-A) i tako inhibira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (O'Reilly i sur., 1997; Dhanabal i sur., 1999; Olsson i sur., 2004).

1.2.3. Čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF)

Porodica čimbenika rasta krvožilnog endotela sastoji se od pet članova: VEGF (također označen kao VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i placentalnog čimbenika rasta (engl. *placenta growth factor* PlGF) (Lugano i sur., 2020). VEGF, prvotno identificiran kao čimbenik permeabilnosti krvnih žila (VPF), jedan je od najmoćnijih induktora angiogeneze (Ferrara i sur., 2003). Proizvode ga i izlučuju tumorske stanice i okolna stroma, a povezan je s povećanom gustoćom krvnih žila, progresijom, invazivnošću i metastaziranjem tumora (Apte i sur., 2019).

Transkripcija i ekspresija VEGF, ali i drugih pro-angiogenih čimbenika poput PDGF, matriks metaloproteinaza (MMP-2 i MMP-9), angiopoetina je pod kontrolom hipoksija

inducibilnog čimbenika (HIF). HIF-1, transkripcijski aktivator ovisan o kisiku sastavljen je od podjedinice HIF-1 β i jedne od podjedinica HIF-1 α , HIF-2 α ili HIF-3 α . U uvjetima normoksije (aerobni uvjeti) HIF-1 α se brzo razgradi produktima Von Hippel-Lindau tumor supresor gena putem ubikvitin proteasom kompleksa. S druge strane u uvjetima hipoksije HIF-1 α je stabiliziran te zajedno s HIF-2 α heterodimerizira s HIF-1 β i čini kompleks HIF-1 α/β koji se veže za regiju promotora hipoksija odgovornih elemenata i inducira ekspresiju i oslobađanje VEGF u većini stanica (Lee i sur., 2004; Lv i sur., 2017).

VEGF je pojačano reguliran tijekom hipoksije i upravlja stvaranjem krvnih žila uglavnom kroz aktivaciju VEGF receptora-2 (VEGFR-2) eksprimiranog u endotelnim stanicama (Ferrara, 2004). VEGFR-2 aktivacija pokreće nekoliko signalnih putova koji vode do specifičnih odgovora endotelnih stanica kao što su preživljavanje stanica, proliferacija, migracija, invazija, krvožilna propusnost i upala. Čvrsta koordinacija ovih staničnih procesa presudna je za uspješno uspostavljanje novih žila (Claesson-Welsh i Welsh, 2013).

VEGF inducira krvožilnu propusnost (preduvjet za uspješnu angiogenezu) pomoću nekoliko mehanizama, uključujući remodeliranje pukotinskih spojišta (engl. *junction*) između endotelnih stanica, stvaranje fenestracije i vezikulo-vaskularne organele (VVO) (Weis i Cheresh, 2005). U patološkim stanjima kao što je rak, poremećaj regulacije ovih mehanizama dovodi do krvožilne hiperpropusnosti koja zauzvrat može izravno utjecati na mikrookoliš tumora, uključujući povećani intersticijski tlak i oslabljenu terapijsku isporuku lijeka (Azzi i sur., 2013). Štoviše, propusno krvožilje može olakšati bijeg tumorskih stanica u krvotok i tako potaknuti uspostavljanje udaljenih metastaza (Weis i sur., 2004).

1.2.4. Matriks metaloproteinaze (MMPs)

Matriks metaloproteinaze (MMP) su obitelj strukturno povezanih, o cinku ovisnih endopeptidaza sposobnih razgraditi bazalnu membranu i sve komponente izvanstaničnog matriksa (ECM). MMP su uključene u aktivaciju i otpuštanje različitih citokina, kemokina, čimbenika rasta i adhezijskih molekula što im omogućuje sudjelovanje u različitim fiziološkim procesima poput remodeliranja tkiva i razvoja organa, regulacije upalnih procesa te angiogeneze. Osim toga, aktivnosti MMP su uključene u brojna patološka stanja s pretjeranom razgradnjom ECM-a, poput reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, puknuća aterosklerotskog plaka, aneurizme aorte, parodontitisa, invazije i metastaziranja tumora (Gonzalez-Avila i sur., 2019; Kessenbrock i sur., 2010; Reunanen i Kähäri, 2013).

Do sada je kod kralježnjaka otkriveno 28 MMP dok se kod ljudi pojavljuju 24 uključujući dva ekvivalentna oblika MMP-23 (MMP-23A i MMP-23B) kodirana s dva različita gena u kromosomu 1. Prema organizaciji domene, sličnosti sekvenci i specifičnosti supstrata, MMP se mogu klasificirati u **kolagenaze** (MMP-1, MMP-8, MMP-13), **gelatinaze** (MMP-2, MMP-9), **stromelizine** (MMP-3, MMP-10, MMP-11) **matrilizine** (MMP-7, MMP-26), **membranske MMP** (MT1-MMP ili MMP-14, MT2-MMP ili MMP-15, MT3-MMP ili MMP-16, MT4-MMP ili MMP-17, MT5-MMP ili MMP-24, MT6-MMP ili MMP-25) i **ostale MMP** (Gonzalez-Avila i sur., 2019).

MMP imaju ključnu ulogu u promoviranju angiogeneze tumora, a gotovo sve MMP mogu olakšati angiogenezu razgradnjom kapilarne bazalne membrane zajedno s ostalim izlučenim pro-angiogenim čimbenicima (Alaseem i sur., 2019). Glavne MMP koje sudjeluju u angiogenezi tumora su MMP-2, -9 i -14, a u manjoj mjeri MMP-1 i -7. S obzirom na to da je nekoliko MMP-a izraženo u svim tumorima, očigledno je da svaka MMP može pridonijeti različitim krvožilnim događajima unutar istog tumora (Kessenbrock i sur., 2010). Poznato je da MMP-9 dominira regulacijom angiogeneze kroz mnoštvo katalitičkih i ne katalitičkih funkcija oslobađajući angiogene kemokine poput CXCL5, 8, 6 i citokine poput čimbenika rasta fibroblasta (FGF) i VEGF koji zauzvrat mogu nizvodno promovirati tumorsku i patološku angiogenezu. Također za poticanje ekspresije VEGF-a kao ključnog regulatora angiogeneze zadužene su i MMP-2 i MMP-14. MMP-9 i u manjoj mjeri MMP-2 sudjeluju u razgradnji angiostatskog proteina Multimerina 2 kojeg proizvode endotelne stanice te također i na taj način mogu doprinijeti angiogenezi (Alaseem i sur., 2019).

Gelatinaze MMP-2 i MMP-9 su povezane s invazijom tumora u okolno tkivo zbog sposobnosti razgradnje ključnih komponenti bazalne membrane, posebno kolagena tip IV (Chuang i sur., 2008; Poswar i sur., 2015). Uz to, obje gelatinaze mogu razgraditi i druge supstrate poput kolagena tipa I, V, VII i X, fibronektina i elastina te su neophodne u razgradnji fragmenata fibrilarnog kolagena nakon njihove početne razgradnje kolagenazama (Vayalil i sur., 2004; Wen i sur., 2012; Yao i sur., 2015). MMP-2 igra važnu ulogu u stvaranju prikladnog mikrookruženja za proliferaciju stanica karcinoma i doprinosi epitelno-mezenhimalnoj tranziciji (EMT). EMT ovisi o uklanjanju adhezijskih molekula, kao što su kadherini i integrini, te o značajnoj reorganizaciji citoskeleta, pri čemu oba procesa olakšavaju odvajanje zloćudnih stanica od primarnog tkiva (Sbardella i sur., 2012). MMP-9 u velikoj mjeri izražavaju upalne stanice poput makrofaga, neutrofila i mastocita, a u manjoj mjeri tumorske stanice (Boyd i sur., 2008; Hartmann-Petersen i sur., 2009). Makrofagi koji su prisutni unutar tumorskog

mikrookoliša zovu se tumoru pridruženi makrofagi (TAMs) te predstavljaju M2 tip makrofaga koji podržavaju rast tumora. Osim što izlučuju proteaze, M2 makrofagi mogu aktivirati cikloksigenazu (COX-2) u tumorskim stanicama, a prekomjerna ekspresija COX-2 inducira lučenje angiogenih čimbenika kao što su VEGF i bFGF (Tjiu i sur., 2009).

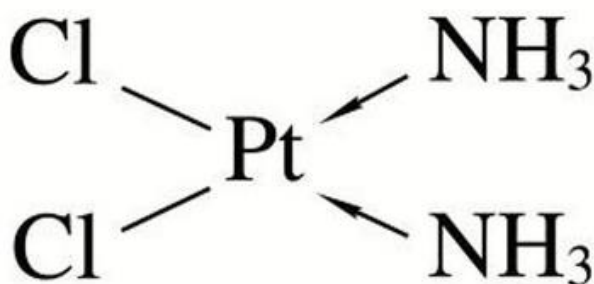
1.3. Invazivnost i metastaziranje tumora

Metastaziranje (grč. metastasis - premještanje) je prijenos tumorskih stanica iz mjesta nastanka, odnosno primarnog tumora u susjedno tkivo ili udaljeni organ i glavni je uzrok visoke stope smrtnosti oboljelih od raka (Seyfried i Huysentruyt, 2013). Procjenjuje se da su metastaze odgovorne za oko 90% smrti uzrokovanih rakom (Chaffer i Weinberg, 2011). Metastaziranje je složen proces koji se zbiva u više stupnjeva, a uključuje: 1. aktivaciju epitelno- mezenhimalne tranzicije tijekom koje stanice tumora gube međustanični, adhezivni kontakt i stječu pokretni fenotip, 2. lokalnu invaziju kojom zloćudne stanice razgrađuju bazalnu membranu, a posebno izvanstanični matriks koji odvaja epitelno tkivo od strome, 3. intravazaciju tijekom koje tumorske stanice prolaze kroz stijenke krvnih ili limfnih žila i ulaze u krvotok, 4. sposobnost preživljavanja u krvotoku, 5. ekstravazaciju, pri čemu tumorske stanice izlaze iz krvotoka, prolazeći kroz stijenke krvnih žila u tkivo određenog organa; 5. diobu tumorskih stanica u tkivima organa gdje će nastati metastaze, odnosno sekundarni tumori (Valastyan i Weinberg, 2011).

1.4. Cisplatina

Cisplatina (CDDP), citostatik, sredstvo protiv raka na bazi platine, jedan je od najčešće korištenih kemoterapijskih lijekova u liječenju bolesnika s različitim vrstama tumora, kao što su tumor mokraćnog mjehura, testisa, jajnika, vrata maternice, glave i vrata, pluća, jednjaka, i dojke (Dasari i Bernard Tchounwou, 2014). Pokazalo se da cisplatina i njezini analozi, karboplatina i oksaliplatina, imaju značajnu učinkovitost u liječenju karcinoma s kurativnom i palijativnom namjerom (Muggia i sur., 2015). Uz monoterapiju, antikancerogeno djelovanje cisplatine također je dokazano kada se koristi u kombinaciji s drugim sredstvima u kemoterapiji, radioterapiji, pa čak i imunoterapiji. Do danas je procijenjeno da će približno 50% svih pacijenata oboljelih od raka biti liječeno cisplatinom u svojim antikancerogenim terapijama (Ghosh, 2019).

Molekularna struktura CDDP-a sadrži osnovni kompleks platine, dva amida i dva kloridna liganda u cis elementnoj orijentaciji (Slika 4). Ovaj prvi kemoterapijski lijek na bazi metala otkrio je talijanski kemičar Michele Peyrone 1845. godine, a njegovu sposobnost inhibiranja diobe stanica prepoznao je američki biofizičar dr. Barnett Rosenberg 1965. godine. Američka uprava za hranu i lijekove odobrila je 1978. godine upotrebu CDDP-a za liječenje pacijenata s tumorom testisa i mokraćnog mjehura (Ghosh, 2019). Od tada je liječenje CDDP-om pokazalo visok stupanj protutumorske aktivnosti kod različitih solidnih tumora, a milijuni pacijenata primali su ovaj kemoterapijski lijek u svojim terapijama protiv raka (Amable, 2016).



Slika 4. Kemijska struktura cisplatine (preuzeto iz Dai i sur., 2017)

Cisplatina se primjenjuje intravenozno i postaje aktivirana nakon ulaska u stanicu. U citoplazmi se reakcijom hidrolize kloridni ligandi zamjene molekulama vode što takav hidrolizirani spoj čini jakim elektrofilom koji može reagirati s bilo kojim nukleofilom uključujući sulfhidrilne skupine na proteinima i atome dušika u nukleinskim kiselinama. Cisplatina se veže za N7 dušikov atom, reaktivni centar na ostacima purina, i kao takva može prouzročiti oštećenje DNA u stanicama raka, blokirajući staničnu diobu i rezultirajući apoptotskom staničnom smrću. 1,2- unutarlančane poprječne veze purinskih baza s cisplatinom najistaknutije su među promjenama u DNA (Dasari i Bernard Tchounwou, 2014).

Oksidacijski stres je također vrlo česti mehanizam citotoksične aktivnosti cisplatine. Cisplatina inducira oksidacijski stres stvaranjem reaktivnih vrsta kisika (ROS) poput hidroksilnih radikala i superoksida što pak ovisi o koncentraciji cisplatine i vremenu izloženosti (Brozovic i sur., 2010). Smatra se da je ROS odgovoran za peroksidaciju lipida, iscrpljivanje sulfhidrilnih skupina proteina, promjenu signalnih putova, hemolizu kalcija itd. što može uzrokovati oštećenje DNA i posljedično apoptozu stanica (Florea i Büsselberg, 2011). Mitohondriji su jedna od najvažnijih meta oksidacijskog stresa, a ROS može utjecati na

respiratornu funkciju mitohondrija i uzrokovati staničnu disfunkciju koja u konačnici rezultira rupturom mitohondrija i njihovom apoptozom (Saad i sur., 2004).

Unatoč pozitivnim učincima cisplatine, ona je izrazito otrovna. Pacijenti koji primaju sredstva na bazi platine imaju ozbiljne nuspojave koje ograničavaju dozu koja se može primijeniti. Sposobnost upravljanja ovom induciranom toksičnošću presudna je za uspjeh kemoterapijskog liječenja raka. Nuspojave primjene cisplatine uključuju općenite štetne učinke na stanice, poput mučnine i povraćanja, smanjenu proizvodnju krvnih stanica i trombocita u koštanoj srži (mijelosupresija) i smanjeni odgovor na infekciju (imunosupresija). Specifičnije nuspojave uključuju oštećenje bubrega (nefrotoksičnost), oštećenje srca (kardiotoksičnost), oštećenje neurona (neurotoksičnost) i gubitak sluha (Desoize i Madoulet, 2002; Florea i Büsselberg, 2006; Shah i Dizon, 2009; Tsang i sur., 2009)

Glavni nedostatak terapije cisplatinom je razvoj otpornosti stanica raka na primjenu terapeutika. Otpornost na cisplatinu ovisi o vrsti tumora pa su primjerice rak testisa, rak jajnika, rak glave i vrata te rak malih stanica pluća vrlo osjetljivi na cisplatinu, dok su rak ne- malih stanica pluća i kolorektalni karcinom vrlo otporni na cisplatinu (Muggia i Los, 1993; Fuertes i sur., 2003). Postoje dva oblika otpornosti: unutrašnja (intrizična) otpornost i stečena otpornost. Unutarnja rezistencija je rezistencija koja se javlja od početka liječenja, dok je kod stečene rezistencije djelovanje lijeka u početku primjene aktivno, ali s vremenom postaje ne učinkovito (Florea i Büsselberg, 2011). Otpornost na cisplatinu može biti uzrokovana smanjenjem staničnog unosa lijeka, primjerice cisplatina se prolaskom kroz krvotok može vezati za tiolne skupine humanog serumskog albumina ili cisteina, smanjenim prolaskom kroz staničnu membranu ili povećanim izlučivanjem lijeka, detoksikacijom lijeka staničnim tiolima kao što su glutationi i metalotioneini, promjenom cilja lijeka i popravljanjem oštećenja DNA kroz mehanizam izrezivanja nukleotida (engl. NER, *Nucleotide excision repair*) (Kartalou i Essigmann, 2001; Brabec i Kasparkova, 2005; Sedletska i sur., 2005).

Osim toga, cisplatina kao genotoksični spoj aktivira u tumorskim stanicama brojne molekularne mehanizme, uključujući gene za "heat shock" proteine koji pomažu stanicama da prežive stresne i nepovoljne uvjete. Porodica proteina toplinskog šoka (HSP) uključuje skupinu molekularnih nadzornika koji igraju važnu ulogu tijekom smatanja proteina i konformacijskog sazrijevanja. HSP-90 kritično je uključen u funkciju i stabilnost mnogih onkogenih produkata i molekula koje djeluju na signalne procese unutar stanica. Tako je pokazano da inhibicija HSP-90 vodi inhibiciji Raf-1, cdk4 i Akt17. Inhibicija Akt signalnog puta je posebice važna zato što Akt regulira preživljavanje stanica putem fosforilacije višestrukih supstrata uključenih u

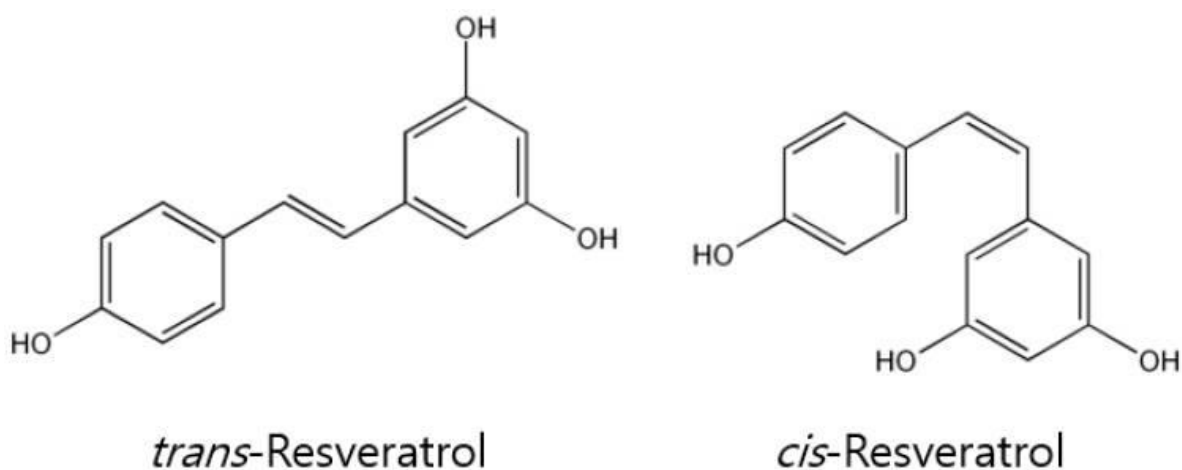
regulaciju apoptoze (Smith i sur., 2005; Ito i sur., 2009). Smatra se da destabilizacija protein-HSP-90 multi-molekularnih kompleksa vjerojatno uzrokuje brzo propadanje nekoliko važnih signalnih proteina preko ubikvitin-proteasom sustava (Stancato i sur., 1997). Ekspresija HSP-90 je pojačana u tumorima, u usporedbi s normalnim tkivom, a tumorske stanice su posebno osjetljive na HSP-90 inhibiciju (Kamal i sur., 2003), kao i na sposobnost HSP-90 inhibitora da poboljšaju osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapiju (Oršolić i Car, 2014).

Poznato je da je HSP-70 snažan negativni regulator stanične smrti i bitan čimbenik koji podržava preživljavanje tumorskih stanica i rast tumora; štoviše, povišene razine HSP-70 unutar tumora koreliraju s lošom prognozom u bolesnika s karcinomom (Ciocca i Calderwood, 2005). Osiromašenje HSP-70 ne samo da povećava smrt tumorskih stanica, već i selektivno senzibilizira maligne stanice na kemoterapijska sredstva (Vang i sur., 2012). Tako, niža regulacija HSP-70 preokreće otpornost na stanice raka, vjerojatno kroz njegovu sposobnost da inhibira apoptozu i uzvodno i nizvodno od mitohondrijske signalizacije (Ray i sur., 2004).

1.5. Resveratrol

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroksistilben) je fitoaleksin koji se nalazi u mnogim biljnim vrstama, uključujući one koje ljudi često konzumiraju, poput grožđa, kikirikija i bobičastog voća. Proizvode ga biljke kao odgovor na mehaničke ozljede, gljivične infekcije i UV zračenje (Langcake i Pryce, 1976). Najviša razina resveratrola u prirodi nalazi se u *Reynoutria japonica* (japanski dvornik), biljci koja se stotinama godina koristi u tradicionalnoj azijskoj medicini za liječenje upala i drugih bolesti (Burns i sur., 2002).

Resveratrol se javlja u *trans*- i *cis*- izomernoj formi (Slika 5). *Trans*- izoforma je glavna izoforma i opsežnije je izučeni kemijski oblik. Izloženost toplini i ultraljubičastom zračenju može dovesti do toga da se *trans*-izoforma pretvori u *cis*-izofornu, čija struktura blisko podsjeća na strukturu sintetskog estrogena dietilstilbestrola. Zbog toga je resveratrol također klasificiran i kao fitoestrogen (Soleas i sur., 1997).



Slika 5. Kemijska struktura dva izomera resveratrola (preuzeto iz Ko i sur., 2017)

Fitokemikalije poput fitoestrogena moduliraju više staničnih signalnih putova bez ili s minimalnom toksičnošću za normalne stanice (Newman i Cragg, 2016). Primjena tvari koje sprječavaju ili odgađaju razvoj karcinogeneze označena je kao kemoprevencija, a interes za korištenjem prirodnih spojeva kao mogućih kemopreventivnih i terapijskih sredstava u stalnom je porastu (Hong i Sporn, 1997).

U *in vitro* uvjetima pokazalo se da resveratrol ima citotoksične učinke na široki spektar ljudskih tumorskih stanica uključujući limfoidne i mijeloidne karcinome, karcinome dojke, jajnika, grlića maternice, prostate, debelog crijeva, želuca, jetre, gušterače i štitnjače (Aggarwal i sur., 2004; Kundu i Surh, 2008; Tomé-Carneiro i sur., 2013).

U animalnim modelima dodatak doze resveratrola štiti od mnogih štetnih učinaka prehrane s visokim udjelom masti i pružaju dodatne zdravstvene dobrobiti (Bradamante i sur., 2004; Baur i sur., 2006; Ramadori i sur., 2009). Brojna *in vitro* istraživanja pokazala su da resveratrol ima višestruke antikancerogene učinke, štiteći od putova inicijacije i progresije karcinoma. Na primjer, resveratrol može promovirati zaustavljanje staničnog ciklusa što dovodi do apoptoze tumorskih stanica, spriječiti ekspresiju sintetaze dušikovog oksida izvedene iz tumora kako bi blokirao rast i migraciju tumora, te djelovati kao antioksidans u sprječavanju oštećenja DNA koje može dovesti do stvaranja tumora (Nakagawa i sur., 2001; Murakami i sur., 2003; Garvin i sur., 2006). Uz to, resveratrol inhibira aktivnost ciklooksigenaze (COX), za koju je poznato da sudjeluje u karcinogenezi pretvarajući arahidonsku kiselinu u prostaglandine, upalne spojeve koji potiču proliferaciju tumorskih stanica (Maccarrone i sur., 1999). U više istraživanja pokazano je da resveratrol smanjuje aktivnost vezanja DNA nuklearnog čimbenika κB (NF- κB), transkripcijskog čimbenika pojačano reguliranog u

karcinomima koji pokreće transkripciju gena koji potiču rast tumora (Benitez i sur., 2009; Roy i sur., 2009).

Što se tiče angiogeneze, resveratrol djeluje indirektno kroz smanjenje (down-regulaciju) angiogenih čimbenika koje proizvode tumorske stanice. Na primjer, pokazano je da resveratrol inhibira ekspresiju VEGF-a u humanim stanicama raka jajnika smanjujući hipoksijom inducibilni čimbenik 1α (HIF- 1α). Osim toga, resveratrol ne samo da je inhibirao bazalnu ekspresiju HIF- 1α i njenu indukciju pomoću IGF-I (engl. *insulin-like growth factor*), već je i stimulirao proteasomalnu razgradnju HIF- 1α (Cao i sur., 2004).

Slično tome, resveratrol inhibira ekspresiju VEGF i staničnu proliferaciju u stanicama ljudskog osteosarkoma U2OS, što ukazuje da resveratrol može imati antiosteosarkomski učinak inhibiranjem proliferacije tumorskih stanica i neovaskularizacije (Liu i sur., 2012). Isto tako, derivat stilbena rapoantigenin inhibira angiogenezu izazvanu stanicama karcinoma prostate razgradnjom HIF- 1α (Jung i sur., 2011). Također se pokazalo da su resveratrol i drugi prirodni i sintetski stilbeni inhibirali rast ksenopresatskih stanica karcinoma debelog crijeva kod miševa osiromašenjem VEGF-a i pro-MMP-9 (Kimura i sur., 2008). Uz to je još pokazano da resveratrol inhibira rast kapilarnih endotelnih stanica blokirajući VEGF- i FGF-receptor posredovanu aktivaciju kinaze MAPK, te prema tome, suzbija rast novih krvnih žila kod životinjskih modela raka (Brâkenhielm i sur., 2001).

1.6. Cilj

Cilj rada jest istražiti združeno djelovanje citostatika cisplatine i resveratrola na inhibiciju VEGF-a, MMP-2 i MMP-9, inhibiciju razvoja tumora, povećanje životnog vijeka domaćina, te istražiti aktivnost M1 makrofaga u tkivu tumora kroz analizu inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS). Nadalje cilj nam je utvrditi kako višekratno djelovanje citostatika djeluje na razinu HSP-70 i HSP-90 i da li obrada resveratrolom modulira njihovu aktivnost vodeći dokidanju rezistencije tumorskih stanica na citostatik, direktnoj toksičnosti na stanice tumora, inhibiciji angiogeneze i rasta tumora, jačanju imunomodulacijskog učinka makrofaga kroz podržavanje M1 fenotipa te posljedičnom povećanju životnog vijeka miševa.

2. Materijali i metode

2.1 Materijali

2.1.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na visokosrodnim Swiss albino miševima iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Miševi su bili 2-3 mjeseca starosti, mase 20-25 g. Ukupno 80 jedinki bilo je podijeljeno u 4 skupine po 20 životinja i to prema načinu obrade. Hranjeni su standardnom hranom za laboratorijske životinje (4RF 21 Mucedola S.R.L., Italija) uz stalnu dostupnost vode. Uvjeti su bili standardni i uključivali su dnevni ritam od 12 sati svjetla i 12 sati mraka te temperaturu od 24°C uz kontroliranu vlažnost zraka.

Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim principima koji su važeći u Republici Hrvatskoj (Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, Narodne Novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine br. 102/2017) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) # 86–23 1985).

2.1.2. Tumorske stanice

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) javlja se u miša kao spontani karcinom mliječne žlijezde. To je po prirodi slabo diferencirani, heterogeni, brzorastući zloćudni tumor sačinjen od populacija stanica različite osjetljivosti. U ovom istraživanju miševima je subkutano (sc) u bedro injicirano 1×10^6 stanica EAT za formiranje solidnog EAT tumora.

2.1.3. Kemijski spojevi

2.1.3.1. Resveratrol

Otopina resveratrola pripremljena je otapanjem resveratrola (Evolva SA, Švicarska) u pročišćenoj vodi uz dodatak dimetil sulfoksida (DMSO) koristeći najmanju moguću količinu DMSO (16 mg/mL) u svrhu povećanja njegove topljivosti. Otopina resveratrola davala se *per os (po)* u dozi od 50 mg/kg.

2.1.3.2. Cisplatina

Protutumorski lijek cisplatina [cis-diamindikloridoplatina (II)] (Pliva, Zagreb, Hrvatska) injicirana je višekratno intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg desetog i dvanaestog dana, te dozi od 5 mg/kg petnaestog dana.

2.1.4. Laboratorijska oprema

Centrifuga: Centrifuga 5702 (proizvođač: Eppendorf, Njemačka);

Spektrofotometar: Libra S22 (proizvođač: Biochrom, UK) i UV-160 (proizvođač: Shimadzu, Japan)

Mikrotitarski čitač Microplate reader Model 550 (proizvođač: Bio-Rad, SAD) i Ao Absorbance Microplate Reader (proizvođač: Azure Biosystems, SAD)

Vaga: ABS 220 – 4 (proizvođač: Kern & Sohn, Njemačka)

Vortex: Vortex Genius 3 (proizvođač: IKA, SAD)

Homogenizator: Sonopuls mini (proizvođač: Bandelin, Njemačka)

2.2. Metode

2.2.1. Obrada životinja

Pokusne životinje su prije injiciranja stanica EAT i nakon početnog vaganja podijeljene u četiri skupine po 20 životinja te je u njih subkutano (*sc*) u bedreni mišić injicirano 1×10^6 stanica EAT što označava 0. dan pokusa. Nakon injiciranja stanica tumora slijedi injiciranje resveratrola u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dana (kad tumor postane vidljiv i bude otprilike 500 mm³) te dozom od 5 mg/kg 15. dana, a potom 24 sata kasnije dio životinja je žrtvovan, a dio ostavljen za praćenje preživljavanja.

Kontrolna skupina obrađena je *ip* s fiziološkom otopinom (F.O.). Druga skupina primala je otopinu resveratrola *per os* u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu, treća cisplatinu u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozu od 5 mg/kg 15. dana, dok je četvrta skupina obrađena pripravkom resveratrola *per os* u dozi od 50 mg/kg 5 dana u nizu te cisplatinom u već navedenim dozama. Doza resveratrola od 50 mg/kg izabrana je prema literaturnim podacima

(Carter i sur., 2014; Alobaedi i sur., 2017; Davatgaran-Taghipour i sur., 2017). Životinje su žrtvovane 24 sata nakon zadnje obrade. Životinje su adekvatno anestezirane i analgezirane intraperitonealnom (*ip*) primjenom kombinacije Narketana® (Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska) i Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska). Nakon toga prikupljeno je tkivo tumora za daljnju analizu.

2.2.2. Praćenje promjene tjelesne mase i procjena toksičnosti

Prije početka izvođenja pokusa, kao i tijekom izvođenja pokusa, životinje su pojedinačno označene i izvagane te su na temelju toga razvrstane u skupine s približno sličnom tjelesnom masom (± 3 g). Na temelju mase životinja za pojedinu skupinu određena je količina pojedinačnih pripravka koje su davane tijekom pokusa te je praćena promjena mase tijekom izvođenja pokusa kao i procjena toksičnosti. Mjerenja tjelesnih masa su izvršena pomoću digitalne vage. Procjena toksičnosti praćena je vaganjem životinja tijekom eksperimenta i praćenjem promjene mase na nivou čitavog organizma. Pokazatelj toksičnosti je gubitak mase tijekom perioda eksperimenta, te se gubitak tjelesne mase za svaku pojedinu životinju računa prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ gubitka mase} = \left(\frac{\text{masa prvog dana} - \text{minim. masa tijekom ispitivanja}}{\text{masa prvog dana}} \right) \times 100$$

2.2.2.1. Relativni indeks mase organa

Relativna masa organa (izražena u g/100 g) izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Relativna masa organa (g/100 g)} = \frac{\text{ukupna masa organa} \times 100}{\text{konačna tjelesna masa}}$$

2.2.3. Mjerenje volumena tumora i inhibicija rasta tumora

Procjena rasta tumora i učinaka cisplatine i resveratrola na razini cjelokupnog organizma mjerena je kaliperom. Mjerenje volumena tumora provedeno je kaliperom gdje je volumen tumora izračunat prema formuli :

$$Volumen\ tumora = \frac{\text{širina tumora}^2 \times \text{dužina tumora}}{2}$$

Iz dobivenih podataka izračunat je % inhibicije rasta tumora (%TVI) prema formuli:

$$TVI = \frac{(\text{sred.vrijed.vol.tumora u kontroli} - \text{sred.vrijed.vol.tumora u pokusnoj grupi}) \times 100}{\text{sred.vrijed.vol.tumora u kontroli}}$$

2.2.4. Preživljavanje

Praćenjem spontane smrti nakon obrade miševa pratilo se preživljavanje pokusnih životinja te se bilježio dan i broj uginulih jedinki unutar svake obrađene skupine od nultog dana pokusa. Postotak povećanja životnog vijeka (% ILS, engl. *increased lifespan*) izračunao se iz dobivenih podataka prema formuli:

$$\%ILS = \frac{(T - C)}{C} * 100$$

gdje je *T* srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja, a *C* srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja.

2.2.5. Izolacija i priprema tkiva

Izolirano tkivo tumora pohranio sam na -20°C do pripreme za analizu. Tjedan dana nakon pohrane, odvagao sam između 75 - 100 mg tkiva tumora u Eppendorf epruvetu gdje sam dodao fosfatnog pufera (PBS) u omjeru 1:10. Uzorke sam potom homogenizirao ultrazvučnim homogenizatorom, te sam dobivene homogenate centrifugirao na 15000 okretaja kroz 15 min pri 4°C. Nakon centrifugiranja odvojio sam nadtalog te tako pripremljene uzorke pohranio pri -20°C do daljnjih analiza.

2.2.6. Određivanje razine krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF)

Za procjenu razine čimbenika VEGF-a u tkivu tumora koristio sam mišji VEGF ELISA kit (Mouse VEGF Immunoassay, Quantikine® ELISA, proizvođača R&D Systems Europe, Ltd. ,UK) prema uputama proizvođača. Ovaj kit, odnosno test temelji se na kvantitativnoj sendvič ELISA gdje je poliklonalno protutijelo specifično za mišji VEGF prethodno nanoseno na mikrotitarsku pločicu. Tumorsko tkivo razrijedio sam 10x s puferom iz kita "Calibrator Diluent RD5T". U mikrotitarsku pločicu dodao sam 50 μ L pufera "Assay Diluent RD1N" i 50 μ L standarda ili odgovarajućeg uzorka. Potom sam proveo inkubaciju od 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se svaki prisutan mišji VEGF vezao za imobilizirano protutijelo. Nakon toga sadržaj svake jažice isprao sam 5 puta sa po 200 μ L pufera za ispiranje kako bi se uklonile nevezane komponente te sam u svaku jažicu dodao po 100 μ L peroksidazom obilježenog poliklonalnog protutijela specifičnog za mišji VEGF. Nakon druge inkubacije od 2 sata na sobnoj temperaturi, ponovno sam isprao pločicu 5 puta kako bi uklonio nevezana enzimom-obilježena protutijela. Potom sam dodao po 100 μ L otopine supstrata i proveo inkubaciju od 30 minuta na sobnoj temperaturi zaštićenu od svjetla pri čemu je enzimska reakcija stvorila plavo obojeni produkt. Po isteku inkubacije dodao sam 100 μ L "Stop" otopine u svaku jažicu pri čemu je plavo obojeni produkt postao žuto obojen. Intenzitet nastalog žutog obojenja proporcionalan je količini mišjeg VEGF-a, a vrijednosti apsorbancije očitao sam pri 450 nm uz korekciju valne duljine pri 540 nm. Kao standard koristio sam 500 pg/mL mišjeg VEGF standarda iz kita otopljeneg sa "Calibrator Diluent RD5T" puferom u rasponu koncentracija od 0 do 250 pg/mL. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine VEGF-a odredio sam jednadžbe pravca, a koncentracije VEGF-a u ispitivanim uzorcima iskazao sam u pg/mL. Uzorke sam radio u duplikatu te sam kod konačnog izračuna koncentracije uzeo u obzir faktor razrjeđenja.

2.2.7. Određivanje aktivnosti matriks metaloproteinaza 2 (MMP-2) i 9 (MMP-9)

Za određivanje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 koristio sam komercijalni ELISA kit proizvođača Biospes inc. (Chongqing, Kina) i prethodno pripremljene uzorke tkiva tumora. Kit za određivanje razine MMP-2 i MMP-9 se bazirao na sendvič ELISA gdje su poliklonalna protutijela specifična za mišji MMP-2 i MMP-9 prethodno nanescena na mikrotitarsku pločicu. Tumorsko tkivo razrijedio sam 20x s puferom za razrjeđivanje uzoraka iz kita. U mikrotitarsku pločicu dodao sam 100 µL standarda ili odgovarajućeg uzorka i sve skupa stavio na inkubaciju od 90 minuta pri 37°C kako bi se omogućilo vezanje MMP-2 ili MMP-9 za imobilizirano protutijelo. Nakon toga, uklonio sam sadržaj svake jažice i dodao 100 µL biotinom obilježenog poliklonalnog protutijela specifičnog za mišje MMP-2 ili MMP-9 i ponovno stavio na inkubaciju pri 37°C tijekom 60 minuta. Zatim sam sadržaj svake jažice isprao 3 puta s puferom za ispiranje iz kita te u svaku dodao 100 µL avidin-biotin-peroksidaza kompleksa (ABC) i sve zajedno ostavio na inkubaciju pri 37°C tijekom 30 minuta. Sadržaj svake jažice sam opet isprao 5 puta s puferom za ispiranje kako bi se uklonili nevezani konjugati te sam u svaku jažicu dodao 100 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) supstrata radi vizualizacije HRP enzimske reakcije i stvaranja plavo obojenog produkta uz inkubaciju pri 37°C tijekom 20 minuta u mraku. Po isteku inkubacije dodao sam 100 µL "Stop" otopine u svaku jažicu budući da HRP katalizira TMB te nastaje žuto obojenje. Intenzitet nastalog žutog obojenja proporcionalan je količini mišjeg MMP-2 ili MMP-9 vezanog na početku, a vrijednosti apsorbancije očitao sam pri 450 nm. Kao standard za određivanje MMP-2 koristio sam standardnu otopinu koncentracije 40000 pg/mL koju sam otopio s puferom za razrjeđivanje uzorka iz koje sam napravio šest serijskih razrjeđenja u rasponu koncentracija od 0 pg/mL do 20000 pg/mL, dok sam kao standard za određivanje MMP-9 koristio standardnu otopinu koncentracije 10000 pg/mL otoplenu s puferom za razrjeđivanje uzorka iz koje sam napravio šest serijskih razrjeđenja u rasponu koncentracija od 0 pg/mL do 5000 pg/mL. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine MMP-2 ili MMP-9 odredio sam jednadžbu pravca, a koncentraciju MMP-2 ili MMP-9 u ispitivanim uzorcima iskazao sam u pg/mL. Uzorke sam radio u duplikatu te sam kod konačnog izračuna koncentracije uzeo u obzir faktor razrjeđenja.

2.2.8. Određivanje razine proteina toplinskog stresa HSP-70 (engl. *HSP-70 heat-shock protein*)

Za određivanje razine „heat-shock“ proteina 70 koristio sam HSP-70 ELISA kit od MyBioSource (San Diego, SAD) i prethodno pripremljene uzorke tkiva tumora. Kit za određivanje razine HSP-70 baziran je na sendvič ELISA. Razinu heat-shock proteina 70 odredio sam u tumorskom tkivu koje sam razrijedio 8 puta pomoću fosfatnog pufera (PBS pufer). Kao standard koristio sam gotove standardne otopine u rasponu koncentracija od 0 ng/mL do 250 ng/mL. U jažice sam dodao 50 µL pripremljenog standarda, uzoraka i PBS-a kao slijepu probu. Zatim sam dodao 5 µL "Balance Solution" u jažice gdje su dodani uzorci. Nakon toga dodao sam 100 µL "Conjugata" u svaku jažicu osim u jažicu sa slijepom probom, te sam sadržaj u jažicama promiješao i proveo inkubaciju tijekom sat vremena pri 37°C. Po isteku inkubacije sadržaj svake jažice isprao sam 5 puta sa po 350 µL pufera za ispiranje kako bi se uklonile nevezane komponente te sam u svaku jažicu dodao po 50 µL "Supstrata A" i 50 µL "Supstrata B". Nakon što sam proveo drugu inkubaciju od 20 minuta pri 37°C, dodao sam 50 µL "Stop" otopine u svaku jažicu i sadržaj promiješao, te sam vrijednosti apsorbancije očitao pri 450 nm. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine odredio sam jednadžbu pravca, a koncentracije HSP-70 u ispitivanim uzorcima iskazao sam u ng/mL. Uzorke sam radio u duplikatu te sam kod konačnog izračuna koncentracije uzeo u obzir faktor razrjeđenja.

2.2.9. Određivanje razine proteina toplinskog stresa HSP-90 (engl. *HSP-90 heat-shock protein*)

Za određivanje razine „heat-shock“ proteina 90 koristio sam HSP90 ELISA kit od MyBioSource (San Diego, SAD) i prethodno pripremljene uzorke tkiva tumora. Kit za određivanje razine HSP-90 baziran je na sendvič ELISA. Uzorke tumora razrijedio sam 8 puta pomoću fosfatnog pufera (PBS pufer). Kao standard koristio sam standardnu otopinu koncentracije 10000 pg/mL iz koje sam napravio šest serijskih razrjeđenja u rasponu koncentracija od 0 pg/mL do 5000 pg/mL. U jažice sam dodao 100 µL pripremljenog standarda, uzoraka i PBS-a kao slijepu probu te proveo inkubaciju od 90 minuta pri 37°C. Po isteku inkubacije, sadržaj svake jažice isprao sam 2 puta sa po 350 µL pufera za ispiranje kako bi se uklonile nevezane komponente. Zatim sam dodao 100 µL protutijela obilježenih biotinom u sve jažice i proveo inkubaciju od 60 minuta pri 37°C. Po isteku inkubacije, pločicu sam isprao tri

puta sa po 350 μL pufera za ispiranje. Nakon toga, dodao sam 100 μL HRP-Streptavidin konjugata (SABC) u svaku jažicu, te sadržaj u jažicama promiješao i proveo inkubaciju tijekom 30 minuta pri 37°C. Po isteku inkubacije sadržaj svake jažice isprao sam 5 puta sa po 350 μL pufera za ispiranje kako bi se uklonile nevezane komponente i u svaku jažicu dodao po 90 μL TMB substrata. Nakon što sam proveo inkubaciju u mraku od 20 minuta pri 37°C, dodao sam 50 μL "Stop" otopine u svaku jažicu i sadržaj promiješao, te sam vrijednosti apsorbancije očitao pri 450 nm. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine odredio sam jednadžbu pravca, a koncentraciju HSP-90 u ispitivanim uzorcima iskazao sam u ng/mL. Uzorke sam radio u duplikatu te sam kod konačnog izračuna koncentracije uzeo u obzir faktor razrjeđenja.

2.2.10. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

Ova metoda temelji se na reakciji diazotacije koju je prvi opisao Griess 1879. Poznato je da dušik oksid (NO) sintetiziraju različite stanice u različitim organizmima uključujući stanice glatkih mišića, neurone, trombocite, hepatocite, makrofage, fibroblaste i epitelne stanice te stoga kao takav ima vrlo važnu ulogu u organizmu. Sintetizira se iz L-arginina djelovanjem dušik oksid sintetaze, enzima koji postoji u tri izoforme, a u uvjetima *in vitro* brzo se metabolizira u stabilne nehlapljive produkte (nitrite: NO_2^- ili nitrate: NO_3^-) (Rosselli i sur. 1998).

Sinteza dušikovog (II) oksida može se indirektno odrediti spektrofotometrijski pomoću Griessove metode mjereći akumulirane nitrite i nitrate u različitim biološkim uzorcima. U ovom istraživanju koristio sam kit *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD) koji za analizu NO_2^- koristi 1% sulfanilamid pripremljen u 5% fosfornoj kiselini i 0,1% N-1-naftiletilen-diamin dihidroklorid (NED) otopljen u vodi. U mikrotitarsku ploču stavio sam 50 μL uzorka tumora u triplicatu, 50 μL otopine sulfanilamida te izvršio inkubaciju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon prve inkubacije dodao sam 50 μL otopine NED i ponovio inkubaciju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon druge inkubacije pojavilo se ružičasto obojenje uzorka zbog nastalog azo spoja te sam na spektrofotometru izmjerio apsorbanciju pri 540 nm. Kao standard koristio sam 0,1 M natrijevog nitrita otopljenog u vodi u koncentracijama od 0 do 100 μM . Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nitrita odredio sam nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunao sam koncentraciju NO_2^- u uzorcima koju sam izrazio kao μM .

2.2.11. Statistička obrada podataka

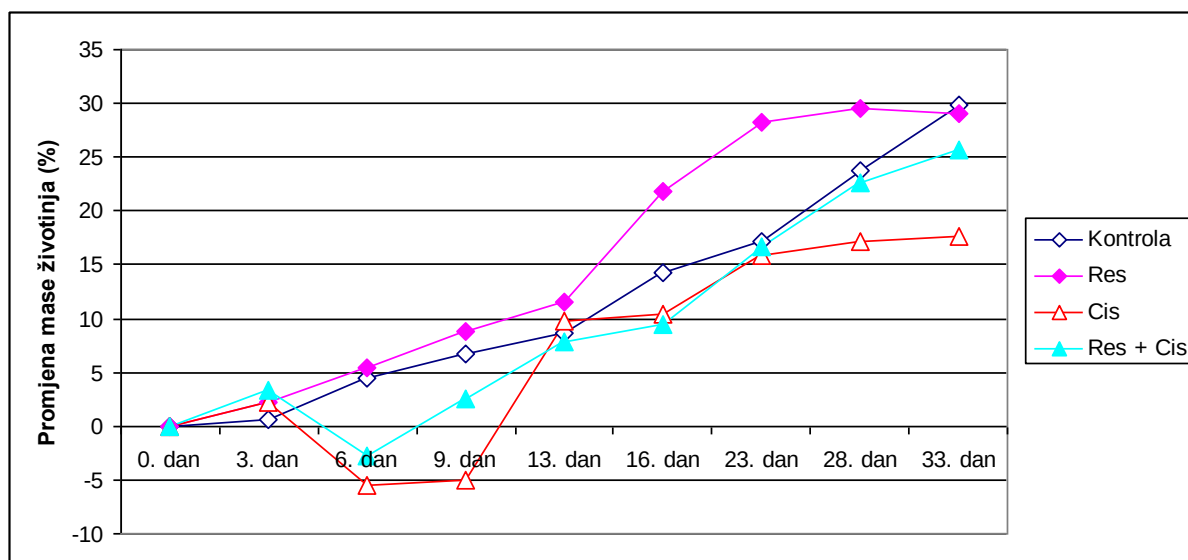
Statistička analiza je provedena pomoću STATISTICA 13 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička značajnost određena je s $P < 0,05$. Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška ($SV \pm SP$). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Prema Kaplan-Meierovoj metodi (Kaplan i Meier, 1958) napravljena je krivulja preživljavanja, a usporedba između krivulja preživljavanja određena je log-rank testom ($\alpha = 5\%$) (Mantel i Haenszel, 1959). Daljnja analiza razlika između skupina napravljena je višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina. Rezultati su prikazani tablično i grafički pomoću box-plot prikaza.

Za pripremu podataka i izračun koncentracija, koristio sam računalni program Microsoft Excel 2016.

3. Rezultati

3.1. Promjena tjelesne mase životinja

Praćenjem promjene tjelesne mase pratili smo promjenu mase tumora tijekom pokusa te dobili uvid u brzinu njegova rasta koji je izračunat kao % u odnosu na početnu masu tumora u pojedinoj skupini, a rezultati su prikazani na Slici 6. Kod kontrolne skupine je uočen najveći porast tjelesne mase, koji je gotovo linearan od 0. do 33. dana. Kod skupine obrađene resveratrolom rast tjelesne mase je linearan od 0. do 13. dana nakon kojeg dolazi do naglog porasta sve do 23. dana te slijedi stagnacija rasta i blagi pad tjelesne mase nakon 28. dana. Skupina obrađena cisplatinom pokazuje najveće odstupanje u promjeni tjelesne mase gdje je od 3. do 6. dana uočeno smanjenje tjelesne mase, a onda od 9. do 33. dana njeno povećanje koje je, sveukupno gledajući, najmanje u odnosu na ostale skupine. Skupina obrađena resveratrolom i cisplatinom također bilježi smanjenje tjelesne mase od 3. do 6. dana, nakon čega dolazi do njenog povećanja sve do 33. dana.



Slika 6. Promjene tjelesne mase životinja u miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom, i njihovom kombinacijom.

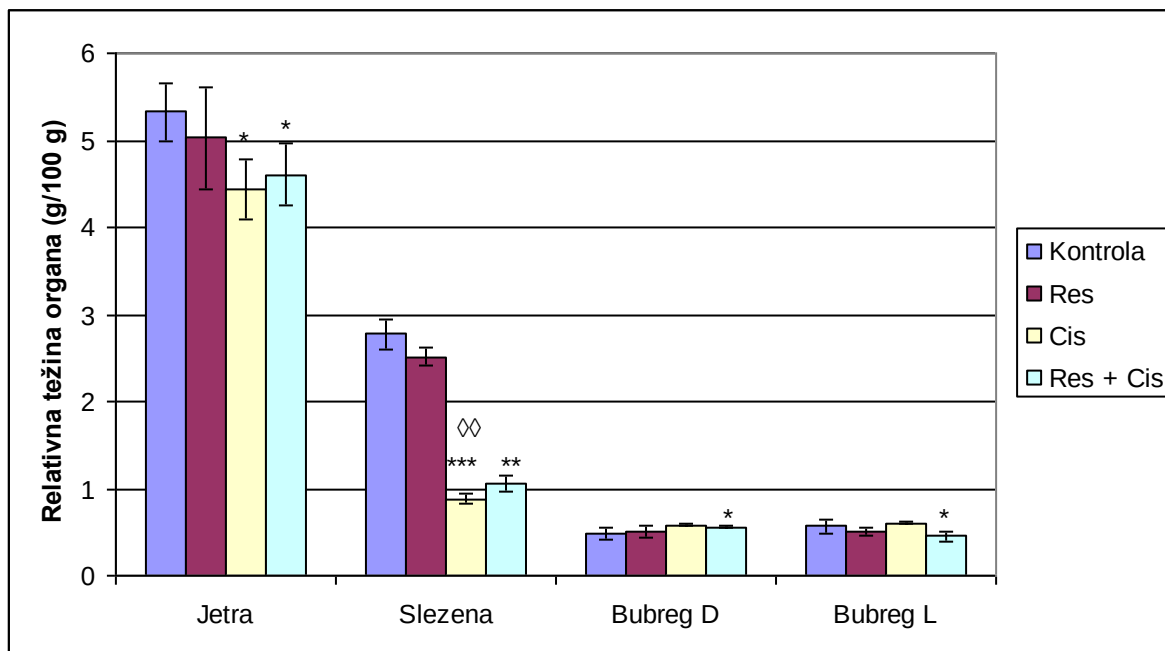
Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os* (po) u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (ip) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana. Rast mase tumora izražen je kao % u odnosu na početnu masu miševa unutar skupine prema formuli: % promjene u masi tumora = (Konačna težina životinja – Početna težina životinja) x 100/Konačna težina životinja

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg

3.2. Promjena mase unutarnjih organa

Rezultati promjene mase unutarnjih organa prikazani su na Slici 7. Rezultati promjene mase jetre pokazuju statistički značajno smanjenje u skupinama obrađenim cisplatinom ($P \leq 0,05$) i skupinom obrađenom resveratrolom i cisplatinom ($P \leq 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati promjene mase slezene pokazuju statistički značajno smanjenje u skupinama obrađenim cisplatinom ($P \leq 0,001$) i obrađenoj resveratrolom i cisplatinom ($P \leq 0,01$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Osim toga rezultati promjene mase slezene pokazuju statistički značajno smanjenje u skupini obrađenoj cisplatinom u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom

($P \leq 0,01$). Rezultati promjene mase bubrega pokazuju statistički značajno smanjenje u skupini obrađenoj resveratrolom i cisplatinom u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,05$).



Slika 7. Promjena mase unutarnjih organa (jetra, slezena i bubreg) u miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os (po)* u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (*ip*) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana. Relativna masa organa (g/100 g) izračunata je prema formuli: ukupna masa organa x 100/konačna tjelesna masa.

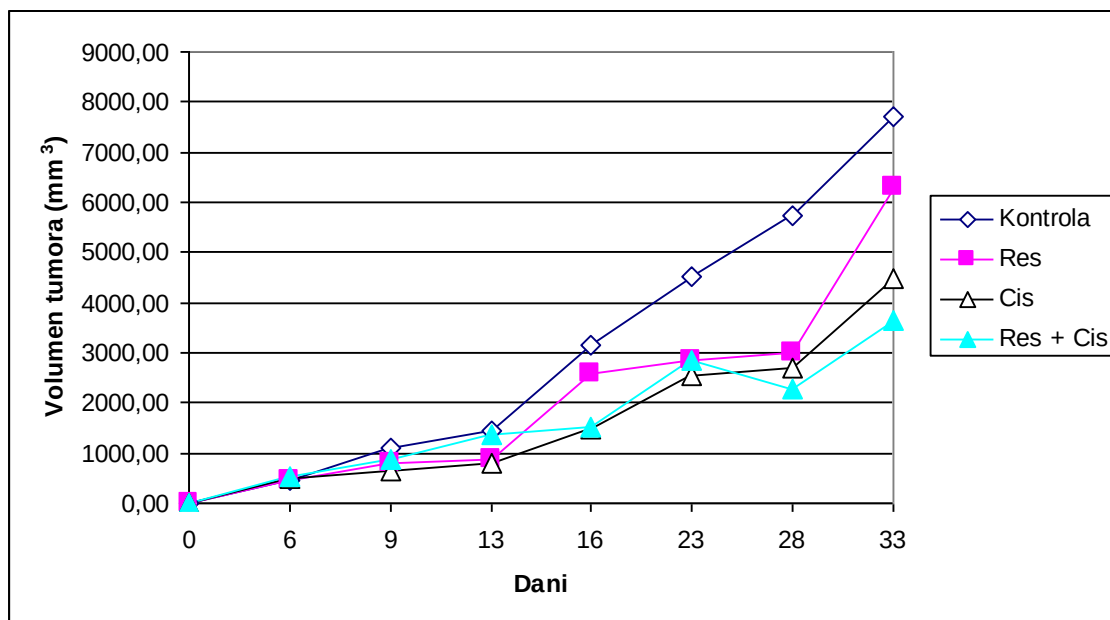
Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

◇Statistički značajno u odnosu na Res (◇ $P \leq 0,01$).

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Bubrež D- desni bubreg; Bubrež L- lijevi bubreg.

3.3. Promjena volumena tumora

Praćenjem promjene volumena tumora kod kontrole je uočen eksponencijalni porast volumena koji je posebice izražen od 13. do 33. dana (Slika 8). Kod skupine obrađene resveratrolom uočen je nagli porast od 13 do 16. dana, kojeg slijedi razdoblje laganog rasta između 16. i 28. dana te nagli porast od 28. do 33. dana. Skupina obrađena cisplatinom pokazuje linearni porast od 13. do 23. dana od kojeg je volumen u stagnaciji sve do 28. dana gdje ponovno počinje njegov nagli rast do 33. dana. Skupina obrađena resveratrolom i cisplatinom pokazuje blagi rast do 23. dana, zatim i smanjenje između 23. i 28. dana, a onda od 28. do 33. povećanje koje je, sveukupno gledajući, najmanje u odnosu na ostale obrađene skupine. Također iz rezultata je vidljivo da je volumen tumora bio smanjen kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu.



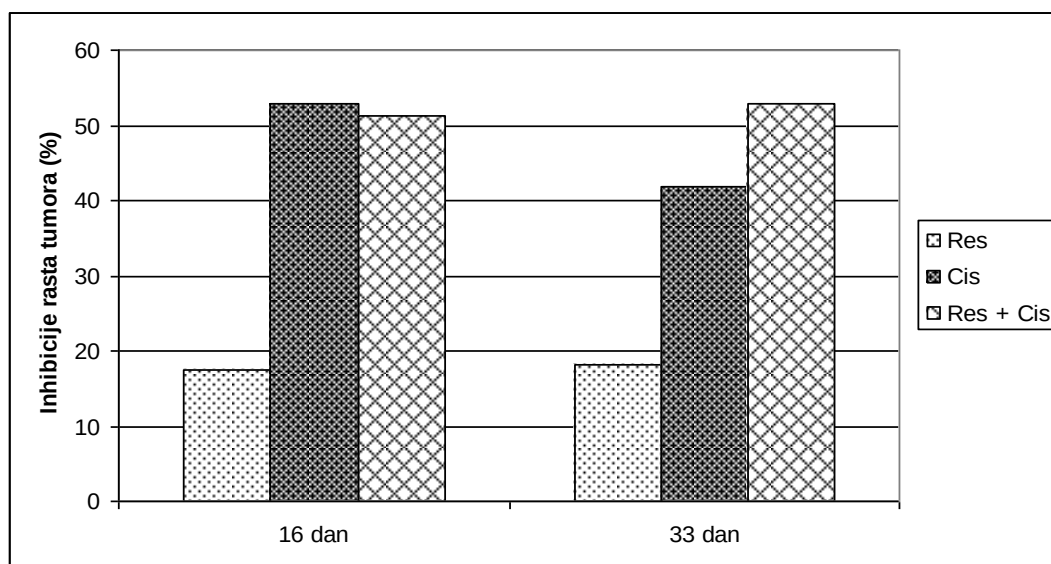
Slika 8. Promjene volumena tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os* (po) u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (ip) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg

3.4. Inhibicija rasta tumora

Rezultati mjerenja inhibicije rasta tumora prikazani su na Slici 9. Rezultati ukazuju na viši postotak inhibicije rasta tumora kod sve tri obrađene skupine u odnosu na kontrolu 16. dana. Skupina obrađena cisplatinom 16. dana pokazala je inhibiciju od 52% u odnosu na kontrolu, dok je skupina obrađena cisplatinom i resveratrolom 16. dana pokazala inhibiciju od 51% u odnosu na kontrolnu skupinu. 33. dana skupina obrađena cisplatinom pokazala je inhibiciju od 41% u odnosu na kontrolu, dok je skupina obrađena cisplatinom i resveratrolom pokazala inhibiciju od 52% u odnosu na kontrolnu skupinu. Najmanji postotak inhibicije zabilježen je u skupini obrađenoj resveratrolom gdje je 16. dana iznosio 17%, a 33. dana 19% (Slika 9).



Slika 9. Postotak inhibicije rasta tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os (po)* u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (*ip*) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana. Iz dobivenih vrijednosti volumena tumora izračunao se postotak inhibicije rasta (% TVI) prema formuli: sred. vrijed. vol. tumora (kontr.) - sred. vrijed. vol. tumora (tret. grupa) $\times 100$ / sred. vrijed. vol. tumora (kontr.).

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg.

3.5. Preživljavanje životinja

Učinak resveratrola u dozi od 50 mg/kg, cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg i njihove kombinacije na miševe nositelje EAT-a istražio se praćenjem vremenskog perioda preživljavanja životinja što je prikazano u Tablici 1 i Slici 10. Miševi obrađeni sa cisplatinom u dozi od 2,5 i 5 mg/kg i otopinom resveratrola u dozi od 50 mg/kg pokazuju najbolje rezultate povećanja životnog vijeka (% ILS) za 35,77%, dok je najmanje povećanje životnog vijeka vidljivo kod skupine obrađene cisplatinom i iznosi 27,79%. Nešto manje povećanje životnog vijeka koje je iznosilo 31,07% vidljivo je kod skupine obrađene resveratrolom.

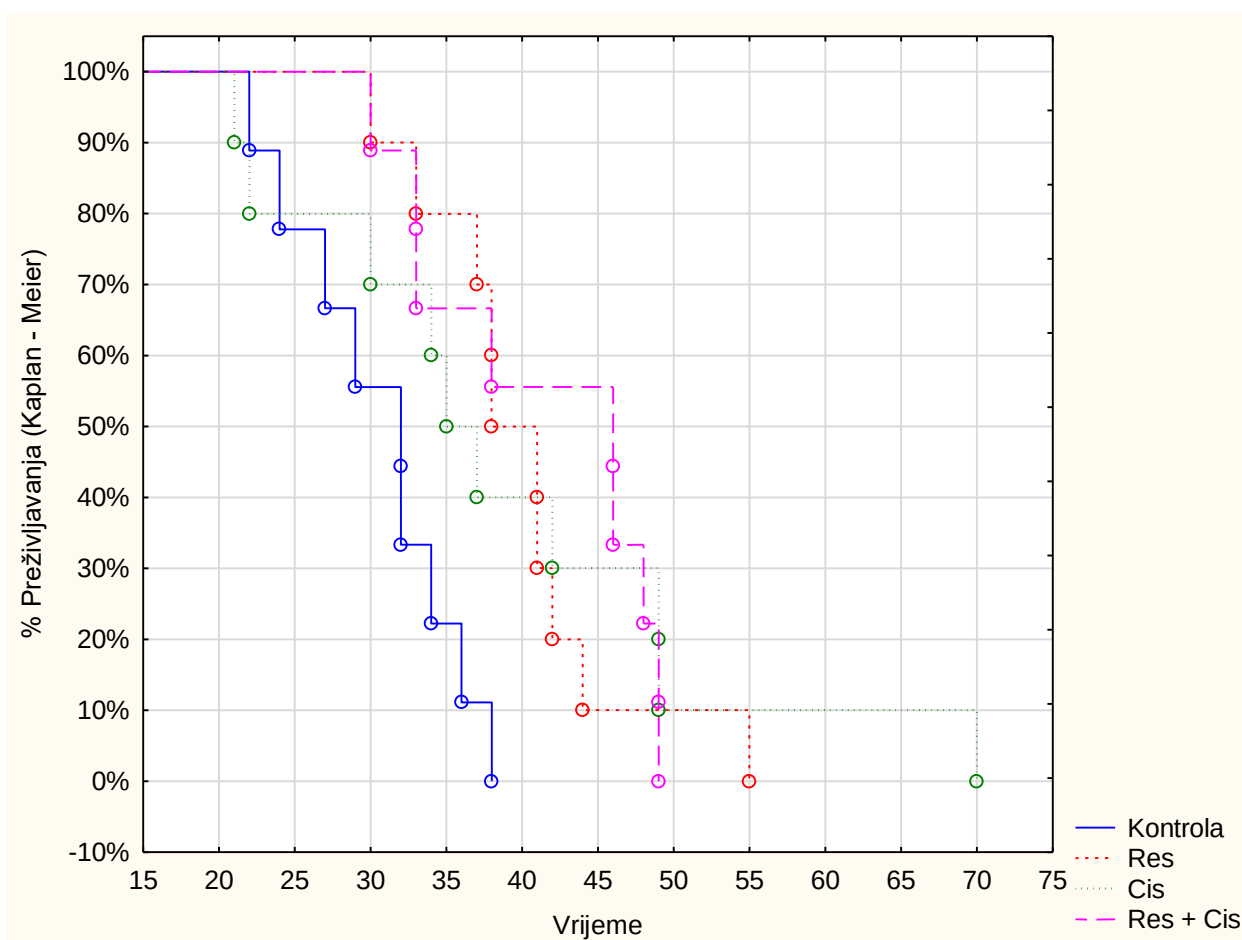
Tablica 1. Preživljavanje miševa s Ehrlichovim solidnim tumorom nakon obrade s resveratrolom i cisplatinom te njihovom kombinacijom

Skupina	Raspon preživljavanja (dani)	Srednja vrijednost preživljavanja (SV±SP dani)	Median preživljavanja (dani)	% T/C ^b	% ILS ^c	Broj preživjelih životinja
Kontrola	22 - 38	30,44 ± 1,79	32,00	/	/	0
Res	30 - 55	39,90 ± 2,14	39,50	131,07	31,07	0
Cis	21 - 70	38,90 ± 4,60	36,00	127,79	27,79	0
Res + Cis	30 - 49	41,33 ± 2,59	46,00	135,77	35,77	0

Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os* (po) u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (ip) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

^b $\% \frac{T}{C} = \left(\frac{T}{C} \right) \times 100\%$; **T** - srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; **C** - srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja.

^c $\% ILS = \left(\frac{T-C}{C} \right) \times 100\%$; postotak povećanja životnog vijeka (% ILS); **T** - srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; **C** - srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja. **Kratice:** Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg.



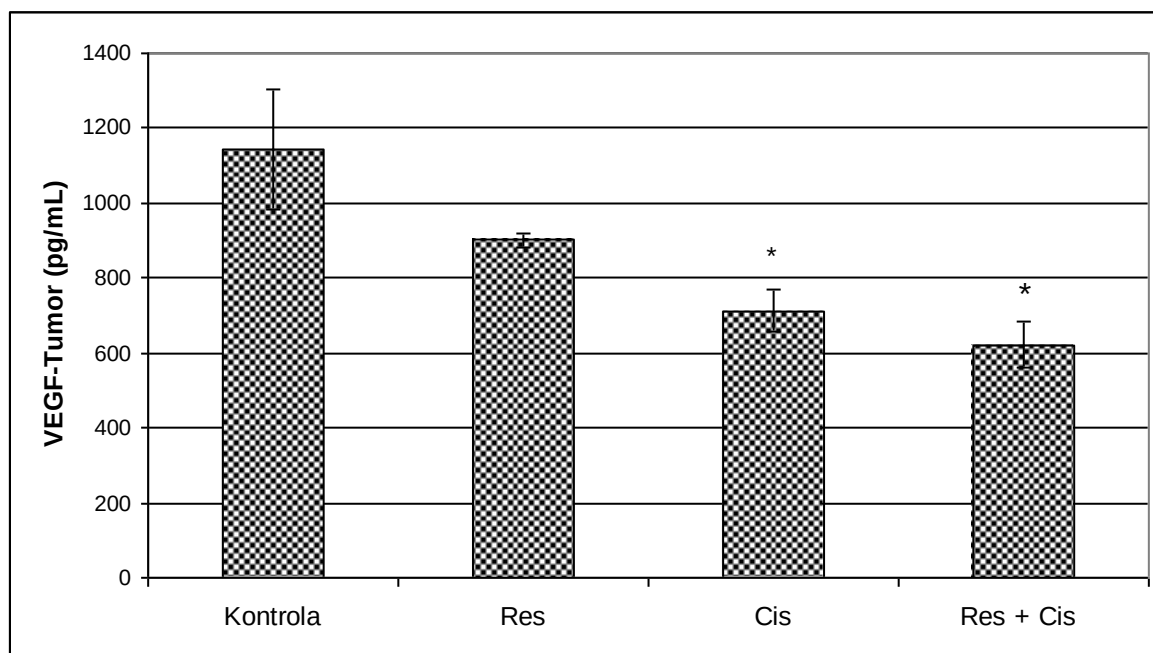
Slika 10. Kaplan-Meier krivulja preživljavanja miševa nositelja EAT-a obrađenih s resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os* (po) u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (ip) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg.

3.6. Razina krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) u tumorskim stanicama

Određivanje koncentracije VEGF-a u tumorskim stanicama na Slici 11 pokazuje značajno smanjenje koncentracije kod skupina obrađenih cisplatinom ($P \leq 0,05$) kao i kod skupine obrađene cisplatinom i otopinom resveratrola ($P \leq 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11).



Slika 11. Razina VEGF-a u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

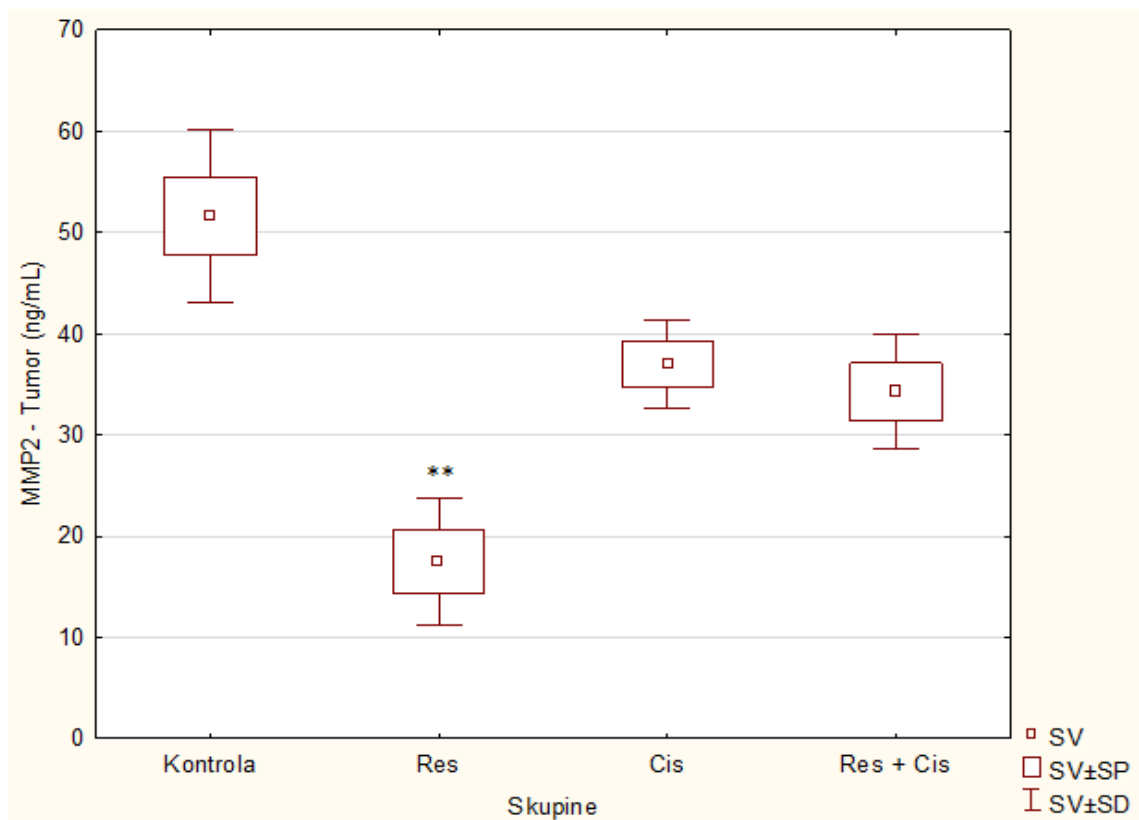
Miševi ($N=10$) su nakon subkutanog (*sc*) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os* (*po*) u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (*ip*) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($P \leq 0,05$).

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg.

3.7. Razina matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) u tumorskim stanicama

Koncentracija MMP-2 koja je određena sendvič ELISA metodom u tumorskim stanicama prikazana je na Slici 12 iz koje je vidljivo smanjenje koncentracije MMP-2 kod svih skupina u odnosu na kontrolu s time da je statistički značajno niža razina koncentracije MMP-2 vidljiva samo kod skupine obrađene resveratrolom u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,01$).



Slika 12. Koncentracija MMP-2 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

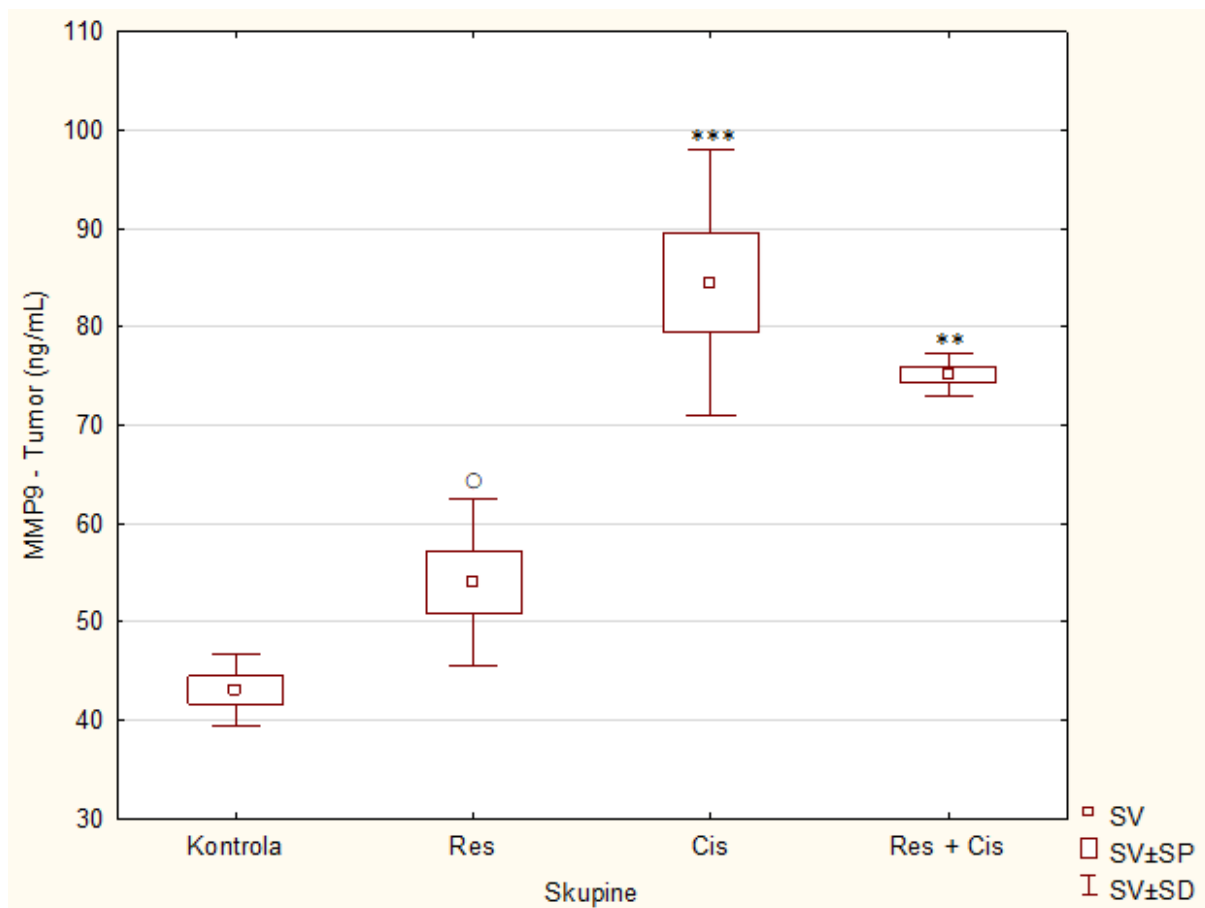
Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os (po)* u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (*ip*) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

*Statistički značajno u odnosu na kontrolu (** $P \leq 0,01$).

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

3.8. Razina matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tumorskim stanicama

Rezultati Slike 13 pokazuju statistički značajno veću koncentraciju MMP-9 u skupini obrađenoj cisplatinom ($P \leq 0,001$) kao i skupini obrađenoj resveratrolom i cisplatinom ($P \leq 0,01$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Također iz rezultata je vidljivo statistički niža koncentracija MMP-9 u skupini obrađenoj resveratrolom u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ($P \leq 0,05$).



Slika 13. Koncentracija MMP-9 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os* (po) u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (ip) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

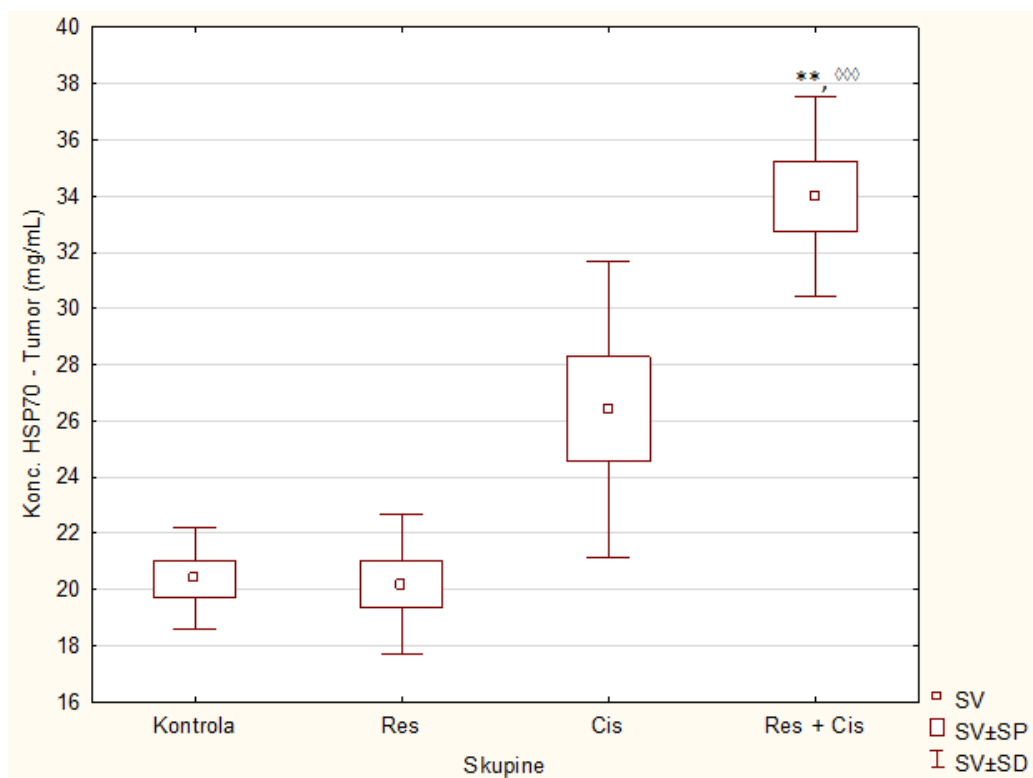
°Statistički značajno u odnosu na cisplatinu ($^{\circ}P \leq 0,05$).

*Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($^{**}P \leq 0,01$; $^{***}P \leq 0,001$).

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

3.9. Razina proteina toplinskog stresa HSP-70 (engl. HSP-70 heat-shock protein)

Rezultati mjerenja razine HSP-70 u tumorskim stanicama prikazani su na Slici 14. Rezultati pokazuju statistički značajno višu razinu HSP-70 u skupini obrađenoj resveratrolom i cisplatinom u odnosu na kontrolu ($P \leq 0,01$) kao i na skupinu obrađenu resveratrolom ($P \leq 0,001$).



Slika 14. Koncentracija HSP-70 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os* (po) u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (ip) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

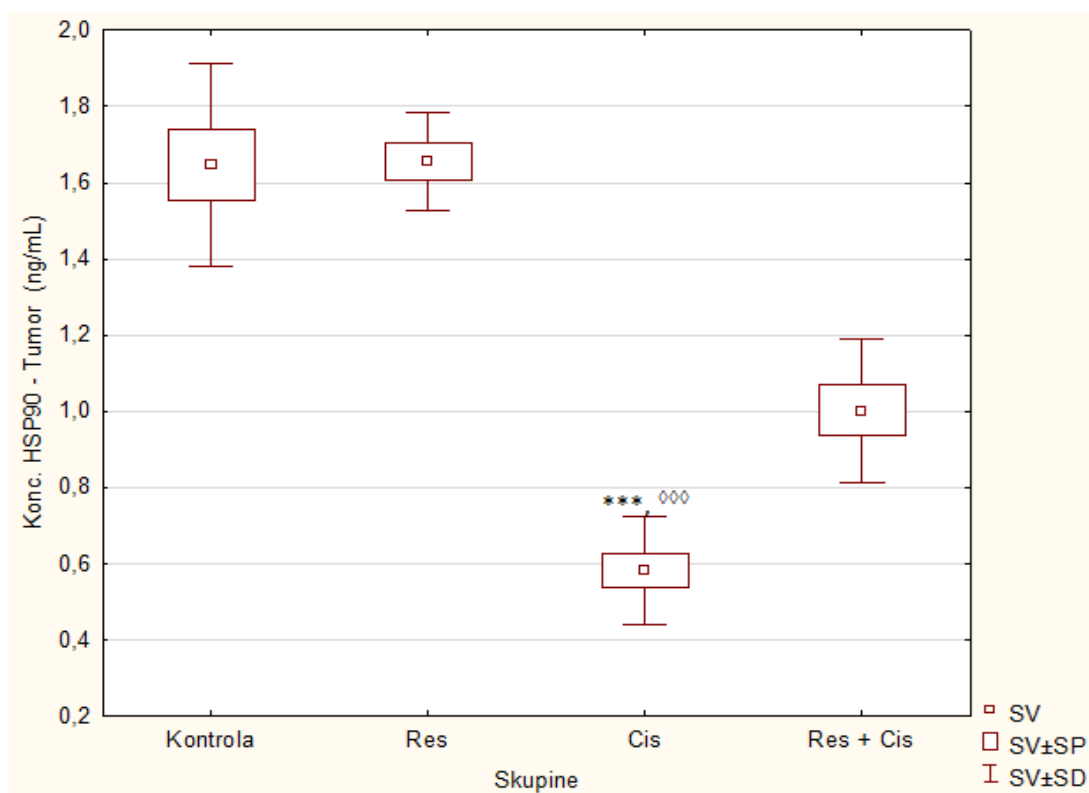
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu (** $P \leq 0,01$).

◇ Statistički značajno u odnosu na resveratrol (◇◇◇ $P \leq 0,001$).

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

3.10. Razina proteina toplinskog stresa HSP-90 (*engl. HSP-90 heat-shock protein*)

Na Slici 15 prikazani su rezultati mjerenja razine HSP-90 u tumorskim stanicama. Rezultati pokazuju statistički nižu razinu HSP-90 kod skupine obrađene cisplatinom u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,001$) i skupinu obrađenu resveratrolom ($P \leq 0,001$).



Slika 15. Koncentracija HSP-90 u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os* (po) u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (ip) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

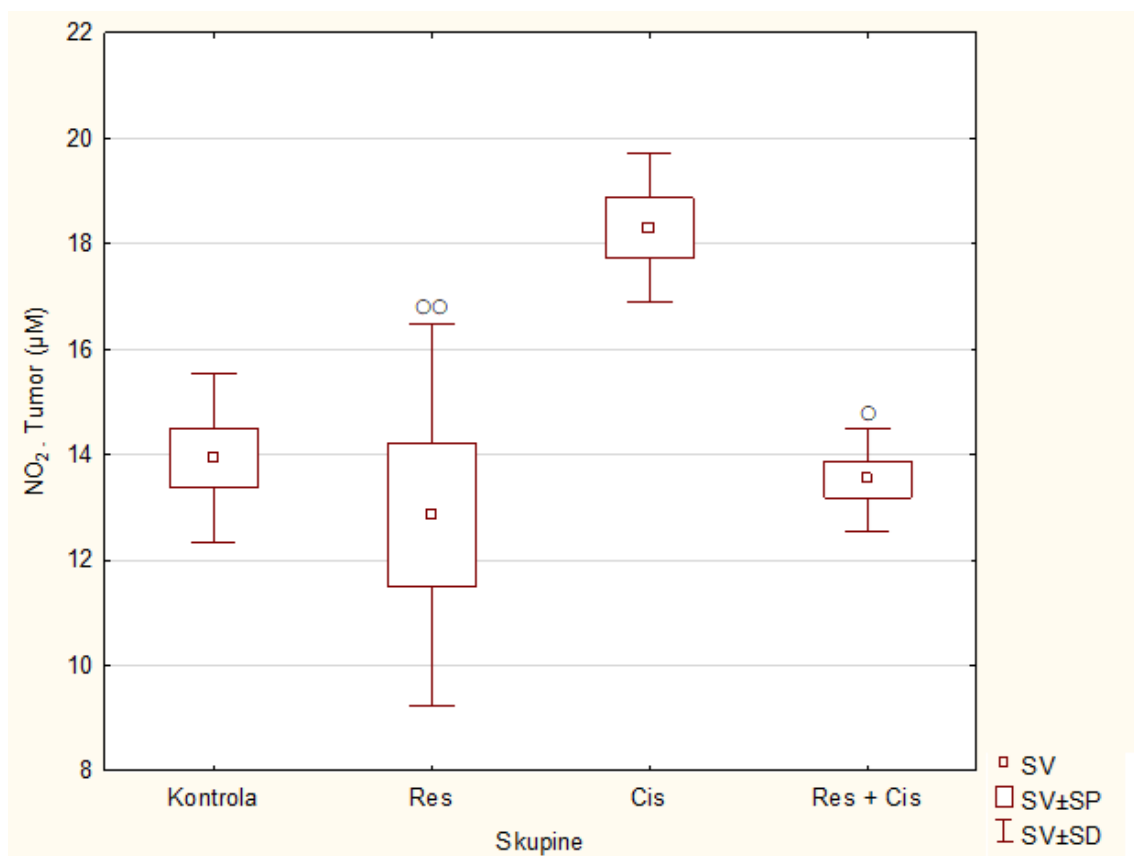
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu (** $P \leq 0,001$).

◇Statistički značajno u odnosu na Res (◇◇◇ $P \leq 0,001$).

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

3.11. Aktivnost dušikovog oksida (NO) u tumorskim stanicama

Rezultati mjerenja aktivnosti dušikovog oksida u uzorcima tkiva tumora prikazani su na Slici 16. Rezultati pokazuju statistički nižu aktivnost NO kod skupine obrađene resveratrolom u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ($P \leq 0,01$), kao i kod skupine obrađene cisplatinom i otopinom resveratrola u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ($P \leq 0,05$).



Slika 16. Aktivnost NO_2^- u tumorskim stanicama miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom

Miševi ($N=10$) su nakon subkutanog (sc) unosa stanica EAT (1×10^6) obrađeni davanjem otopine resveratrola *per os (po)* u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i intraperitonealnim injiciranjem (*ip*) cisplatine u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana.

°Statistički značajno u odnosu na cisplatinu (° $P \leq 0,05$; °° $P \leq 0,01$).

Kratice: Res- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis- otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

4. Rasprava

Svrha ovog rada bila je istražiti združeno djelovanje citostatika cisplatine i resveratrola na inhibiciju VEGF-a, MMP-2 i MMP-9, inhibiciju razvoja tumora, povećanje životnog vijeka domaćina, te istražiti aktivnost makrofaga u tkivu tumora kroz analizu inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS). Nadalje cilj nam je bio utvrditi kako višekratno djelovanje citostatika djeluje na razinu HSP-70 i HSP-90 i da li obrada resveratrolom modulira njihovu aktivnost vodeći dokidanju rezistencije tumorskih stanica na citostatik, direktnoj toksičnosti na stanice tumora, inhibiciji angiogeneze i rasta tumora, jačanju imunomodulacijskog učinka makrofaga kroz podržavanje M1 fenotipa te posljedičnom povećanju životnog vijeka miševa.

Obrada životinja podijeljenih u 4 skupine započela je subkutanom (sc) injiciranjem 1×10^6 EAT stanica te injiciranjem resveratrola u dozi od 50 mg/kg per os (po) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora; cisplatina je injicirana u dozi od 2,5 mg/kg ip 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana dok je kontrolna skupina obrađena fiziološkom otopinom. Da bismo razjasnili ulogu VEGF-a, MMP-2 i MMP-9 u rastu i angiogenezi Ehrlichovog solidnog tumora i istražili mogući utjecaj resveratrola na dokidanje rezistencije tumorskih stanica na cisplatinu, ispitali smo sljedeće: promjenu tjelesne mase, volumena i inhibicije rasta tumora, preživljavanje životinja, razinu VEGF-a, MMP-2, MMP-9, HSP-70, HSP-90 te polarizaciju i aktivnost makrofaga kroz analizu aktivnosti dušikovog oksida (NO).

Antikancerogene učinke resveratrola, cisplatine i kombinacije resveratrola i cisplatine na rast EAT u solidnom obliku utvrdili smo mjerenjem promjene volumena tumora i tjelesne mase miševa uz određivanje postotka inhibicije rasta tumora gdje je vidljivo da su primijenjeni spojevi pokazali smanjenje volumena u sve tri pokusne skupine (Slika 8) u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati promjene tjelesne mase (Slika 6) ukazuju na porast tjelesne mase u svim skupinama; najveći porast tjelesne mase zapažen je u kontrolnoj skupini dok je najmanji porast mase bio u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi od 2,5 i 5 mg/kg. Skupine obrađene cisplatinom i kombinacijom resveratrola i cisplatine pokazale su visok postotak inhibicije rasta stanica EAT (41-52 %) što potvrđuje antikancerogene učinke citostatika cisplatine i polifenola resveratrola (Slika 6, 8, 9). U pogledu praćenja preživljavanja najbolji učinak ostvarila je kombinirana primjena cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg i otopine resveratrola u dozi od 50 mg/kg (% ILS = 35,77) (Tablica 1) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Angiogeneza, proces rasta novih krvnih žila iz već postojeće krvožilne mreže, bitna je za rast solidnih tumora i njihovih metastaza i ovisi o angiogenim čimbenicima rasta (Emmett i sur., 2011; Wu i sur., 2004). Stoga se inhibicija čimbenika rasta smatra jednom od najučinkovitijih strategija za učinkovito suzbijanje rasta tumora. VEGF je jedan od najvažnijih pro-angiogenih čimbenika, koji može pospješiti progresiju tumora, metastaziranje i širenje stanica raka (Kumar i sur., 2011). U B16F10 tumorskim stanicama melanoma primjerice, inhibicija VEGF-a anti-VEGF spojevima smanjuje rast tumora i mikrožilnu gustoću (Ghosh i Maity, 2007). Naši rezultati mjerenja razine VEGF-a u tumorskim stanicama pokazali su da resveratrol smanjuje sekreciju VEGF-a u tumorskim stanicama u odnosu na kontrolnu skupinu u *in vivo* uvjetima (Slika 11), ali bez statističke značajnosti; dok je kod skupina obrađenih cisplatinom ($P \leq 0,05$) kao i kod skupine obrađene cisplatinom i otopinom resveratrola ($P \leq 0,05$) pokazano značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11). Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima Lee i sur., (2015) koji su pokazali da združena primjena resveratrola i 5-fluoruracila (kemoterapijski lijek iz skupine antimetabolita) djeluje protu-angiogeni (angiostatski) i učinkovitija je od primjene svakog spoja pojedinačno. Sinergistički učinak primjene resveratrola i 5-fluoruracila značajno je smanjio razine COX-2, VEGF, VASP, povećao razine AMPK i na taj način značajno inhibirao proliferaciju B16 stanica melanoma i spriječio metastaziranje kroz inhibiciju stanične migracije (Lee i sur., 2015).

Također i brojni drugi biljni pripravci sadrže sastavnice koje mogu biti učinkovite u kontroli rasta tumora i inhibiciji angiogeneze uključujući kurkumin i ginkgetin. Primjerice, Hu i sur., (2019) navode da se ginkgetin (biflavon izoliran iz lista giko bilobe lat. *Ginkgo biloba*) veže za VEGF (smanjuje vezanje za VEGF- receptor) i tako inhibira proliferaciju, migraciju i invaziju endotelnih stanica i VEGF- posredovanu neovaskularizaciju. Primjena ginkgetina u HUVEC stanicama inhibira VEGF-om induciranu fosforilaciju VEGFR-2 i na taj način remeti nizvodni prijenos signala, slično Avastinu koji pokazuje slične inhibitorne učinke na VEGF-om induciranu fosforilaciju ciljanih molekula (Hu i sur., 2019). Nadalje, primjena kurkumina i resveratrola samostalno ili u kombinaciji s karboplatinom značajno smanjuje razine VEGF u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu u EAT tumoru kod miševa što je također u korelaciji sa smanjenom mikrožilnom gustoćom i masom tumora (El-Azab i sur., 2011).

Invaziji malignih stanica karcinoma pogoduje razgradnja izvanstaničnog matriksa (ECM), pojačana regulacija aktivnosti proteolitičkih enzima i povećanje pokretljivosti i invazivne sposobnosti tumorskih stanica (Kleiner i Stetler-Stevenson, 1999; Westermarck i Kähäri, 1999). Literaturni podaci govore da su matriks metaloproteinaze (MMP) sposobne

promovirati invaziju tumora i metastaziranje razgradnjom izvanstaničnog matriksa (ECM-a), među kojima najviše pozornosti privlače dvije gelatinaze- MMP-2 i MMP-9 (Kessenbrock i sur., 2010). Iz toga razloga, MMP se smatraju važnim molekularnim ciljevima u protutumorskoj terapiji.

Naši rezultati analize MMP-2 pokazuju vidljivo smanjenje koncentracije MMP-2 kod svih skupina u odnosu na kontrolu s time da je statistički značajno niža razina koncentracije MMP-2 vidljiva samo kod skupine obrađene resveratrolom u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,01$) (Slika 12). Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Xiong i sur., (2016) koji su pokazali da je resveratrol potisnuo ekspresiju i sekreciju MMP-2 u stanicama glioblastoma, te da je invazivna sposobnost stanica bila izrazito oslabljena nakon utišavanja MMP-2 gena. Uz to Bai i sur., (2017) su pokazali da resveratrol smanjuje sekreciju MMP-2 i MMP-9 na način ovisan o dozi u T24 ljudskim stanicama raka mokraćnog mjehura. Rezultati su pokazali da resveratrol može djelovati kao važan regulator razgradnje ECM-a tijekom invazije tumora i metastaza na temelju njegove sposobnosti da regulira proizvodnju MMP-a. Nadalje, Bai i sur., (2017) su potvrdili hipotezu da resveratrol smanjuje fosforilaciju mitogen- aktiviranih protein kinaza (MAPK) koje su uključene u transkripcijsku regulaciju ekspresije MMP-2 i MMP-9, što rezultira smanjenom regulacijom stanične migracije i invazije. Stoga, prekid ekspresije MMP i aktivacije MAPK puta može biti potencijalni pristup korišten u antimetastatskoj terapiji. Osim toga pokazano je i da primjena resveratrola i paklitaksela može podići razine tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP-1, TIMP-2) i tako smanjiti ekspresiju MMP-2 i MMP-9 u HepG2 ljudskim stanicama raka jetre (Jiang i sur., 2017).

S druge strane naši rezultati analize MMP-9 pokazuju statistički značajno veću koncentraciju MMP-9 u skupini obrađenoj cisplatinom ($P \leq 0,001$) kao i skupini obrađenoj resveratrolom i cisplatinom ($P \leq 0,01$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Također iz rezultata je vidljivo statistički niža koncentracija MMP-9 u skupini obrađenoj resveratrolom u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ($P \leq 0,05$) (Slika 13). Dobiveni rezultati nisu u skladu s gore navedenim literaturnim podacima Bai i sur., (2017) i Jiang i sur., (2017). Međutim, iako smanjena razina MMP-2 i MMP-9 daje bolje prognostičke rezultate, te smanjenu invazivnost i metastaziranje, poznato je da su MMPs uključene u brojne procese, uključujući rast, preživljavanje, angiogenezu, invaziju i imunost, ali i da imaju dvojnu ulogu i mogu biti uključene i u kontrolu stanične smrti, upale, infekcije i angiogeneze (Folgueras i sur., 2004). Primjerice, iako MMP-9 sudjeluje u tumorskoj progresiji, njena uloga je dvojaka. Angiostatin se djelovanjem plazmina, plazmin reduktaze, te određenih MMP (MMP 12, MMP 9, MMP 7 i

MMP 3) oslobađa iz plazminogena i reducira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica (Reunanen i Kähäri, 2013). Također, dokazano je kako MMP-9 cijepajući anti-angiogenetske prekursore aktivira angiostatin i druge anti-angiogenetske čimbenike poput endostatina i tumstatina koji zatim smanjuju tumorski rast i gustoću krvožilja (Folgueras i sur. 2004). Temeljem smanjene razine VEGF-a, u skupinama obrađenim cisplatinom, te cisplatinom i resveratrolom, moguće je da je MMP-9 sudjelovala u kontroli angiogeneze stvaranjem angiostatina ili nekih drugih inhibitornih molekula poput endostatina i tumstatina. Osim dvojake uloge pojedinih MMP-a, smanjenje tumorske invazivnosti i napretka se također ostvaruje pomoću raznih inhibitornih molekula i signala. Inhibicija MMP se ostvaruje uglavnom djelovanjem tkivnih inhibitora MMP (TIMP), inhibitora serin proteaza (serpini), te djelovanjem nespecifičnih serumskih proteaza poput $\alpha 2$ makroglobulina. Serpini su glikoproteini mase 50 – 100 kDa prisutni u gotovo svim tkivima. Glavna uloga im je kontrola proteolitičke aktivnosti, a glavni predstavnici $\alpha 1$ – antitripsin, te inhibitori aktivacije plazminogena PAI 1 i PAI 2. TIMP 1,2,3 i 4 molekule su glavni endogeni inhibitori MMP. Svoje djelovanje ostvaruju nekovalentnim vezanjem za cink aktivna mjesta MMP. TIMP 1 sudjeluje u tkivnom remodeliranju tijekom embrionalnog razvoja, u gonadnoj steroidogenezi, kod poroda, te u inhibiciji migracije endotelnih stanica i stanica glatkih mišića, angiogenezi i metastaziranju. Jedini netopivi TIMP, TIMP3 je čvrsto vezan za izvanstanični matriks. Potiče vezanje transformiranih stanica iz matriksa i ubrzava morfološke promjene vezane uz staničnu transformaciju (Reunanen i Kähäri, 2013). Navedeni podaci objašnjavaju činjenicu da su se inhibitori MMP koji su razvijeni u klinici pokazali neuspješnima (Coussens i sur., 2002). Također treba istaknuti i da značajan utjecaj na učinke matriksnih metaloproteinaza ima i stadij tumora, ali postoje i podaci da nakon primjene kemoterapeutika, pojačano propadanje i smrt stanica, nazočnost reaktivnih radikala, visoka razina slobodnog Fe, oksidacijski stres, stvaranje kemijski reaktivnih ili elektrofilnih vrsta, kao i visoka razine oksidiranih lipida, nedostatak reduciranog glutationa, mogu potaknuti Nrf-2 faktor te regulaciju i ekspresiju hem-oksigenaza (HO-1) u skupini M2 tumoru-pridruženih makrofaga koje reguliraju VEGF, COX2 i MMPs. Matriksne metaloproteinaze, poput MMP-2 i MMP-9 osim degradacije većine proteina ECM-a također utječu i na aktivnost drugih proteaza, čimbenika rasta, citokina te raznih liganda i receptora sa stanične površine (Doucet i Overall, 2009). Očito, višekratno injiciranje cisplatine je prouzročilo neke od mogućih međureakcija tumorskih i mikrookolišnih stanica te brojnih drugih molekula uključujući citokine, hormone, faktore rasta i njihove ligande, fizikalni stres, kemijske tvari, pro- i antiapoptotičke molekule (Konstantinopoulos i sur., 2008), te regulatorne mehanizme kao što su transkripcija gena (c-fos/c-jun protoonkogeni), aktivacija proenzima i

endogena inhibicija koji djeluju koordinirano u ograničavanju raznih proteolitičkih aktivnosti MMP-a.

U ovakvim stresnim uvjetima, proteini toplinskog stresa (stresni proteini, engl. *heat shock proteins*, Hsp) ključni su u održavanju stanične homeostaze te za prilagodbene funkcije stanice na brojne stresore, primjerice, infekciju, slobodne radikale ili mehanički stres, pružajući stanici zaštitu od štetnih utjecaja iz okoliša. HSP igraju važnu ulogu u prijenosu signala, organizaciji staničnog skeleta, regulaciji putova stanične proliferacije, predočavanja antigena te staničnoj migraciji, adheziji, apoptozi ili transportu proteina, a kao šaperoni sudjeluju u strukturiranju staničnih proteina. U stanicama različitih vrsta tumora nađene su povišene koncentracije HSP-a s kojima se povezuje otpornost na antitumorsku terapiju i metastaziranje tumora. S obzirom da HSP-70 i HSP-90 reguliraju apoptozu, bilo da se radi o apoptozi ovisnoj o mitohondrijima ili apoptozi potaknutoj vezanjem liganda na receptore smrti, često se istražuju antitumorski učinci inhibicije HSP-70 i HSP-90.

Pojačana ekspresija HSP-70, obilježje tumorskih stanica ili stanica koje su pod stresom, povećava preživljavanje tih stanica. Nadalje, protutumorska terapija pobuđuje ekspresiju HSP-70, koja ima citoprotektivni učinak. Klinička istraživanja pokazuju da HSP-70 predviđa lošiju prognozu jer maligne stanice izražavaju više HSP-70 tijekom progresije tumora (karcinomi endometrija, osteosarkomi i tumori bubrežnih stanica) u usporedbi s normalnim stanicama (Ciocca i Calderwood, 2005). Pojačana ekspresija HSP-70 povezana je s karcinogenezom kod raka dojke, endometrija, želuca i akutne leukemije; s lošim prognozama; i s rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju (Vargas-Roig i sur., 1998; Brondani Da Rocha i sur., 2004; Garrido i sur., 2006). Nuklearna akumulacija HSP-70 dijagnostički je biljeg za epitelnu displaziju, a antitijela protiv HSP-70 prisutna su u serumima bolesnika s hepatocelularnim karcinomom (Kuramitsu i Nakamura, 2009; Patil i sur., 2015). HSP-70, koji inhibira apoptozu uzvodno i nizvodno prema mitohondrijima, obećavajući je terapijski cilj za smanjenje rezistencije na lijekove u stanicama raka (Ray i sur., 2004; Guo i sur., 2005). Međutim u našem istraživanju rezultati mjerenja razine HSP-70 u tumorskim stanicama pokazuju statistički značajno višu razinu HSP-70 u skupini obrađenoj resveratrolom i cisplatinom u odnosu na kontrolu ($P \leq 0,01$) kao i na skupinu obrađenu resveratrolom ($P \leq 0,001$) (Slika 14). Ovakvi rezultati mogu se usporediti s istraživanjem Kuo i sur., (2020) kod kojeg je također opažena prekomjerna ekspresija HSP-70 u skupini obrađenoj kurkuminom i hipertermijom. Unutarstanični i inducibilni HSP mogu postati imunogeni kada su u kompleksu s tumorskim peptidima (Srivastava, 1997), a HSP su također pronađeni izvan stanica ili smješteni na površini tumorskih

stanica. U *in vitro* istraživanju Kuo i sur., (2020), skupina obrađena kurkuminom i hipertermijom pokazala je najveću unutarstaničnu ekspresiju HSP-70 proteina i najveću stopu apoptoze. Povećan stupanj apoptoze i nekroze dovodi do stvaranja tumorskih peptida, koji se mogu združiti i postati HSP-šaperonski peptidi. Tako bi antigen predodčne stanice (APC) mogle iskoristiti prihvatanje HSP-šaperonskih peptida za punjenje molekula MHC klase I i tako stimulirati specifičan odgovor T-stanica (Suto i Srivastava, 1995; Tsan i Gao, 2009). Njihovi podaci možda podržavaju HSP-posredovanu aktivaciju i novačenje APC stanica budući da je u skupini obrađenoj kurkuminom i hipertermijom pronađena znatno veća infiltracija T-limfocita i makrofaga (Kuo i sur., 2020). Naši podaci ukazuju da je razina dušik oksida povećana kod obrade tumorom što potvrđuje pojačanu aktivaciju i novačenje makrofaga kao APC. Međutim, moguće je i da je došlo do kompenzacijske ekspresije HSP-70 zbog inhibicije HSP-90 što je prilično dobro dokumentirano (Dimant i sur., 2012). Ekspresija HSP-90 je pojačana u tumorima u usporedbi s normalnim tkivom, a tumorske stanice su posebno osjetljive na HSP-90 inhibiciju (Kamal i sur., 2003). Destabilizacija proteina HSP-90, multi-molekularnih kompleksa, vjerojatno uzrokuje brzu degradaciju nekoliko važnih signalnih proteina preko ubikvitin-proteasom sustava (Den i Lu, 2012). HSP-90 je uključen u staničnu signalizaciju, proliferaciju i preživljavanje te je HSP-90 potencijalna meta za protutumorsku terapiju. Osim toga HSP-90 proteini sudjeluju i u zaštiti stanica od apoptoze inhibirajući djelotvornost kalcij-ovisnih proteaza: kalpaina. Naši rezultati potvrđuju inhibiciju HSP-90 (Slika 15) što možemo povezati s povećanom indukcijom stanične smrti, smanjenim volumenom tumora te povećanim preživljavanjem skupina obrađenih s cisplatinom i kombinacijom cisplatine i resveratrola. Povećanoj razini preživljavanja zasigurno doprinosi i smanjenje posljedica toksičnosti cisplatine primjenom resveratrola (Slika7).

Sažimajući dobivene podatke jasno je da postoji složena međureakcija između tumorskih i mikrookolišnih stanica te njihovih posrednika i da primjena kemoterapije može povećati učinkovitost imunoterapije, točnije može poboljšati anti-tumorske učinke imunoterapije dokidanjem imunosupresije izazvane Treg stanicama i mijeloidnim supresorskim stanicama-MDSC, ali i pojačavajući sazrijevanje dendritičkih stanica i njihove funkcije kroz predodčavanje tumorskih antigena te jačanje aktivnosti citotoksičnih stanica T te uspješnijeg prodora imunosnih stanica u tumorsku jezgru, ali i kroz smanjenje posljedica toksičnosti kemoterapije.

5. Zaključak

Rezultati dobiveni provedenim istraživanjem ukazuju na sljedeće:

1. Združena obrada miševa s resveratrolom i cisplatinom polučila je najbolji rezultat u inhibiciji rasta tumora (52%), potom cisplatina (41%) te resveratrol (19%) u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjeni volumen solidnog tumora i inhibicija rasta tumora potvrđuju protutumorsko djelovanje cisplatine i resveratrola na rast solidnog oblika Ehrlichovog ascitesnog tumora.
2. Inhibiciju rasta tumora prati povećano preživljavanje životinja; %ILS miševa obrađenih s resveratrolom i cisplatinom je veći za 35,77%, cisplatine za 27,79 i resveratrola za 31,07 u odnosu na kontrolu.
3. Rezultati relativne težine tkiva i organa ukazuju na pojačanu toksičnost cisplatine te zaštitni učinak resveratrola na jetru, bubrege i slezenu što se podudara s ukupnim povećanim životnim vijekom životinja s tumorom.
4. Smanjena razina VEGF-a i MMP-2 potvrđuje anti-angiogeni potencijal cisplatine i resveratrola.
5. Povećana razina MMP-9 potvrđuje dvostruku ulogu MMP-9 kao anti- i/li pro-angiogenog čimbenika.
6. Povišena razina HSP-70 stimulira specifičan odgovor T-stanica čime se utvrđuje imunomodulatorna uloga resveratrola u kombinaciji s cisplatinom.
7. Inhibicija HSP-90 s cisplatinom i/ili cisplatinom i resveratrolom vodi povećanju smrti tumorskih stanica te povećanom preživljavanju životinja kroz dokidanje mehanizma rezistencije i smanjene toksičnosti citostatika primjenom resveratrola.
8. Povećana razina NO nakon primjene cisplatine ukazuje da višekratno injiciranje malih doza cisplatine smanjuje populaciju supresorskih regulatornih stanica T te mijeloidnih supresorskih dendritičkih stanica i vodi aktivaciji i novačenju M1 makrofaga ključnih za protutumorsku učinkovitost.

6. Literatura

- Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. (2004): Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* 24: 2783–2840.
- Alaseem A., Alhazzani K., Dondapati P., Alobid S., Bishayee A., Rathinavelu A. (2019): Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. *Seminars in Cancer Biology* 56: 100–115.
- Alobaedi O.H., Talib W.H., Basheti I.A. (2017): Antitumor effect of thymoquinone combined with resveratrol on mice transplanted with breast cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10: 400–408.
- Amable L. (2016): Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research* 106: 27–36.
- Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. (2019): VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176: 1248–1264.
- Azzi S., Hebda J.K., Gavard J. (2013): Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Frontiers in Oncology* 15: 3-221
- Bai Y., Yang H., Zhang G., Hu L., Lei Y., Qin Y., Yang Y., Wang Q., Li R., Mao Q. (2017): Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 15: 885–889.
- Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V. V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P.J., Poosala S., Becker K.G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K.W., Spencer R.G., Lakatta E.G., Couteur D. Le, Shaw R.J., Navas P., Puigserver P., Ingram D.K., Cabo R. De, Sinclair D.A. (2006): Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337–342.
- Benitez D.A., Hermoso M.A., Pozo-Guisado E., Fernández-Salguero P.M., Castellón E.A. (2009): Regulation of cell survival by resveratrol involves inhibition of NFκB-regulated gene expression in prostate cancer cells. *Prostate* 69: 1045–1054.
- Boyd S., Tolvanen K., Virolainen S., Kuivanen T., Kyllönen L., Saarialho-Kere U. (2008):

- Differential expression of stromal MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 in basal cell carcinomas of immunosuppressed patients and controls. *Virchows Archiv* 452: 83–90.
- Brabec V., Kasparkova J. (2005): Modifications of DNA by platinum complexes: Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resistance Updates* 8: 131–146.
- Bradamante S., Barengi L., Villa A. (2004): Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews* 22: 169–188.
- Brâkenhielm E., Cao R., Cao Y. (2001): Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *The FASEB Journal* 15: 1798–1800.
- Brondani Da Rocha A., Regner A., Grivicich I., Pretto Schunemann D., Diel C., Kovaleski G., Brunetto De Farias C., Mondadori E., Almeida L., Braga Filho A., Schwartzmann G. (2004): Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines. *International journal of oncology* 25: 777–785.
- Brozovic A., Ambriović-Ristov A., Osmak M. (2010): The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology* 40: 347–359.
- Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M.E.J., Crozier A. (2002): Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3337–3340.
- Cao Z., Fang J., Xia C., Shi X., Jiang B.H. (2004): trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Clinical Cancer Research* 10: 5253–5263.
- Carmeliet P., Jain R.K. (2011): Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473: 298–307.
- Carter L.G., D'Orazio J.A., Pearson K.J. (2014): Resveratrol and cancer: Focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer* 21: 209–225
- Chaffer C.L., Weinberg R.A. (2011): A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331: 1559–1564.
- Chuang H.C., Su C.Y., Huang H.Y., Huang C.C., Chien C.Y., Du Y.Y., Chuang J.H. (2008): Active matrix metalloproteinase-7 is associated with invasion in buccal squamous cell

- carcinoma. *Modern Pathology* 21: 1444–1450.
- Ciocca D.R., Calderwood S.K. (2005): Heat shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress and Chaperones* 10: 86–103.
- Claesson-Welsh L., Welsh M. (2013): VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of Internal Medicine* 273: 114–127.
- Claesson-Welsh L., Welsh M., Ito N., Anand-Apte B., Soker S., Zetter B., O'Reilly M., Folkman J. (1998): Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5579–5583.
- Cooper G.M. (2000): The Development and Causes of Cancer. at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.
- Coussens L.M., Fingleton B., Matrisian L.M. (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* 295: 2387–2392.
- Dai G., Yu L., Yang J., Xia K., Zhang Z., Liu G., Gao T., Guo W. (2017): The synergistic antitumor effect of cinobufagin and cisplatin in human osteosarcoma cell line in vitro and in vivo. *Oncotarget* 8: 85150–85168.
- Dasari S., Bernard Tchounwou P. (2014): Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740: 364–378.
- Davatgaran-Taghipour Y., Masoomzadeh S., Farzaei M.H., Bahramsoltani R., Karimi-Soureh Z., Rahimi R., Abdollahi M. (2017): Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: Experimental evidence and clinical perspective. *International Journal of Nanomedicine* 12: 2689–2702.
- Dejana E., Orsenigo F., Molendini C., Baluk P., McDonald D.M. (2009): Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell and Tissue Research* 335: 17–25.
- Den R.B., Lu B. (2012): Heat shock protein 90 inhibition: Rationale and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 4: 211–218.
- Deryugina E.I., Quigley J.P. (2015): Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biology* 44–46: 94–112.

- Desoize B., Madoulet C. (2002): Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42: 317–325.
- Dhanabal M., Ramchandran R., Volk R., Stillman I.E., Lombardo M., Iruela-Arispe M.L., Simons M., Sukhatme V.P. (1999): Endostatin: Yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Research* 59: 189–197.
- Dimant H., Ebrahimi-Fakhari D., McLean P.J. (2012): Molecular chaperones and co-chaperones in parkinson disease. *Neuroscientist* 18: 589–601.
- Doucet A., Overall C.M. (2009): Protease proteomics: Revealing protease in vivo functions using systems biology approaches. *Molecular Aspects of Medicine* 29: 339–358.
- El-Azab M., Hishe H., Moustafa Y., El-Awady E.S. (2011): Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *European Journal of Pharmacology* 652: 7–14.
- Elshamy W.M., Sinha A., Said N. (2016): Aggressiveness niche: Can it be the foster ground for cancer metastasis precursors? *Stem Cells International* 5: 1-7
- Emmett M.S., Dewing D., Pritchard-Jones R.O. (2011): Angiogenesis and melanoma - from basic science to clinical trials. *American journal of cancer research* 1: 852–68.
- Ferrara N. (2004): Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 25: 581–611.
- Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9: 669–676.
- Florea A.M., Büsselberg D. (2006): Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals* 19: 419–427.
- Florea A.M., Büsselberg D. (2011): Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 3: 1351–1371.
- Folgueras A.R., Pendás A.M., Sánchez L.M., López-Otín C. (2004): Matrix metalloproteinases in cancer: From new functions to improved inhibition. *International Journal of Developmental Biology* 48: 411–424.
- Folkman J. (2002): Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology* 29: 15–18.

- Folkman J., Hanahan D. (1991): Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu symposia* 22: 339–347.
- Franco O.E., Shaw A.K., Strand D.W., Hayward S.W. (2010): Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 21: 33–39.
- Fuertes M.A., Alonso C., Pérez J.M. (2003): Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews* 103: 645–662.
- Garrido C., Brunet M., Didelot C., Zermati Y., Schmitt E., Kroemer G. (2006): Heat shock proteins 27 and 70: Anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 5: 2592–2601.
- Garvin S., Öllinger K., Dabrosin C. (2006): Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Letters* 231: 113–122.
- Gelao L., Criscitiello C., Fumagalli L., Locatelli M., Manunta S., Esposito A., Minchella I., Goldhirsch A., Curigliano G. (2013): Tumour dormancy and clinical implications in breast cancer. *ecancermedicalscience* 21: 7-320
- Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M., Ruhrberg C., Lundkvist A., Abramsson A., Jeltsch M., Mitchell C., Alitalo K., Shima D., Betsholtz C. (2003): VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology* 161: 1163–1177.
- Ghosh S. (2019): Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* 88: 102925.
- Ghosh S., Maity P. (2007): Augmented antitumor effects of combination therapy with VEGF antibody and cisplatin on murine B16F10 melanoma cells. *International Immunopharmacology* 7: 1598–1608.
- Gonda T.A., Varro A., Wang T.C., Tycko B. (2010): Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: Can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Seminars in Cell and Developmental Biology* 21: 2–10.
- Gonzalez-Avila G., Sommer B., Mendoza-Posada D.A., Ramos C., Garcia-Hernandez A.A., Falfan-Valencia R. (2019): Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 137: 57–83.

- Grunewald M., Avraham I., Dor Y., Bachar-Lustig E., Itin A., Yung S., Chimenti S., Landsman L., Abramovitch R., Keshet E. (2006): VEGF-induced adult neovascularization: Recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124: 175–189.
- Guo F., Sigua C., Bali P., George P., Fiskus W., Scuto A., Annavarapu S., Mouttaki A., Sondarva G., Wei S., Wu J., Djeu J., Bhalla K. (2005): Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* 105: 1246–1255.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646–674.
- Hartmann-Petersen S., Tammi R.H., Tammi M.I., Kosma V.M. (2009): Depletion of cell surface CD44 in nonmelanoma skin tumours is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 7. *British Journal of Dermatology* 160: 1251–1257.
- Hong W.K., Sporn M.B. (1997): Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 278: 1073–1077.
- Hu W.H., Chan G.K.L., Duan R., Wang H.Y., Kong X.P., Dong T.T.X., Tsim K.W.K. (2019): Synergy of ginkgetin and resveratrol in suppressing vegf-induced angiogenesis: A therapy in treating colorectal cancer. *Cancers* 11: 1828.
- Jain R.K. (2003): Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine* 9: 685–693.
- Jiang Q., Yang M., Qu Z., Zhou J., Zhang Q. (2017): Resveratrol enhances anticancer effects of paclitaxel in HepG2 human liver cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17: 1-477.
- John A., Tuszynski G. (2001): The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathology and Oncology Research* 7: 14–23.
- Jukić S, Jukić D, Nola M, (2008) Neoplazme (novotvorine). U: Jukić S, Damjanov I, ur. Opća patologija, Zagreb: Medicinska naklada, 129–161
- Jung D.-B., Lee H.-J., Jeong S.-J., Lee H.-J., Lee E.-O., Kim Y.C., Ahn K.S., Chen C.-Y., Kim S.-H. (2011): Rhapontigenin Inhibited Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Accumulation and Angiogenesis in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 34: 850–855.

- Kamal A., Thao L., Sensintaffar J., Zhang L., Boehm M.F., Fritz L.C., Burrows F.J. (2003): A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425: 407–410.
- Kartalou M., Essigmann J.M. (2001): Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 478: 23–43.
- Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. (2010): Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141: 52–67.
- Kimura Y., Sumiyoshi M., Baba K. (2008): Antitumor activities of synthetic and natural stilbenes through antiangiogenic action. *Cancer Science* 99: 2083–2096.
- Kirsch M., Strasser J., Allende R., Bello L., Zhang J., McL Black P. *Angiostatin Suppresses Malignant Glioma Growth in Vivo*. *ICANCER RESEARCH* 58: 4654-4659.
- Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. (1999): Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology, Supplement* 43: S42–S51.
- Ko J.H., Sethi G., Um J.Y., Shanmugam M.K., Arfuso F., Kumar A.P., Bishayee A., Ahn K.S. (2017): The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 12-2589.
- Konstantinopoulos P.A., Karamouzis M. V., Papatsoris A.G., Papavassiliou A.G. (2008): Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40: 1156–1168.
- Kumar B., Chile S.A., Ray K.B., Vidyadhar Reddy G.E.C., Addepalli M.K., Manoj Kumar A.S., Ramana V., Rajagopal V. (2011): VEGF-C differentially regulates VEGF-A expression in ocular and cancer cells; Promotes angiogenesis via RhoA mediated pathway. *Angiogenesis* 14: 371–380.
- Kundu J.K., Surh Y.J. (2008): Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters* 269: 243–261.
- Kuo I.M., Lee J.J., Wang Y.S., Chiang H.C., Huang C.C., Hsieh P.J., Han W., Ke C.H., Liao A.T.C., Lin C.S. (2020): Potential enhancement of host immunity and anti-tumor efficacy of nanoscale curcumin and resveratrol in colorectal cancers by modulated electro-hyperthermia. *BMC Cancer* 20: 1-603.

- Kuramitsu Y., Nakamura K. (2009): Hepatitis C Virus-Related Human Hepatocellular Carcinoma: Predictive Markers Using Proteomic Analysis (Methodology). *Liver Cancer* 5: 343–350.
- Langcake P., Pryce R.J. (1976): The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* 9: 77–86.
- Lee J.W., Bae S.H., Jeong J.W., Kim S.H., Kim K.W. (2004): Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : Its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine* 36: 1–12.
- Lee S.H. w., Koo B.S. eon., Park S.Y. i., Kim Y.M. i. (2015): Anti-angiogenic effects of resveratrol in combination with 5-fluorouracil on B16 murine melanoma cells. *Molecular medicine reports* 12: 2777–2783.
- Liotta L.A., Kohn E.C. (2001): The microenvironment of the tumour - Host interface. *Nature* 411: 375–379.
- Liu Z., Li Y., Yang R. (2012): Effects of resveratrol on vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma cells and cell proliferation. *Oncology Letters* 4: 837–839.
- Liu Z., Peng Q., Li Y., Gao Y. (2018): Resveratrol enhances cisplatin-induced apoptosis in human hepatoma cells via glutamine metabolism inhibition. *BMB Reports* 51: 474–479.
- Lugano R., Ramachandran M., Dimberg A. (2020): Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences* 77: 1745–1770.
- Lv X., Li J., Zhang C., Hu T., Li S., He S., Yan H., Tan Y., Lei M., Wen M., Zuo J. (2017): The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes and Diseases* 4: 19–24.
- Maccarrone M., Lorenzon T., Guerrieri P., Finazzi Agrò A. (1999): Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *European Journal of Biochemistry* 265: 27–34.
- Mishra S., Tamta A.K., Sarikhani M., Desingu P.A., Kizkekra S.M., Pandit A.S., Kumar S., Khan D., Raghavan S.C., Sundaresan N.R. (2018): Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. *Scientific Reports* 8: 5599.

- Mittal K., Ebos J., Rini B. (2014): Angiogenesis and the tumor microenvironment: Vascular endothelial growth factor and beyond. *Seminars in Oncology* 41: 235–251.
- Muggia F.M., Bonetti A., Hoeschele J.D., Rozencweig M., Howell S.B. (2015): Platinum antitumor complexes: 50 Years since Barnett Rosenberg's discovery. *Journal of Clinical Oncology* 33: 4219–4226.
- Muggia F.M., Los G. (1993): Platinum resistance: Laboratory findings and clinical implications. *STEM CELLS* 11: 182–193.
- Murakami A., Matsumoto K., Koshimizu K., Ohigashi H. (2003): Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide- and interferon- γ -induced I κ B degradation in RAW264.7 macrophages. *Cancer Letters* 195: 17–25.
- Muz B., la Puente P. de, Azab F., Azab A.K. (2015): The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* 3: 83.
- Nakagawa H., Kiyozuka Y., Uemura Y., Senzaki H., Shikata N., Hioki K., Tsubura A. (2001): Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Supplement* 127: 258–264.
- Newman D.J., Cragg G.M. (2016): Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* 79: 629–661.
- Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., Kojiro M. (2006): Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* 2: 213–219.
- O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R., Folkman J. (1997): Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277–285.
- Olsson A.K., Johansson I., Åkerud H., Einarsson B., Christofferson R., Sasaki T., Timpl R., Claesson-Welsh L. (2004): The minimal active domain of endostatin is a heparin-binding motif that mediates inhibition of tumor vascularization. *Cancer Research* 64: 9012–9017.
- Oršolić N., Car N. (2014): Quercetin and hyperthermia modulate cisplatin-induced DNA damage in tumor and normal tissues in vivo. *Tumor Biology* 35: 6445–6454.
- Oršolić N., Car N., Lisičić D., Benković V., Knežević A.H., Đikić D., Petrik J. (2013):

- Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on Ehrlich ascites tumor in mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102: 4395–4405.
- Patil P., Nandimath K., Prabhu S., Naikmasur V. (2015): Heat shock protein (HSP70) as a marker of epithelial dysplasia in oral dysplastic lesions: A clinicopathological study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 19: 53–57.
- Poswar F.D.O., Fraga C.A.D.C., Gomes E.S.B., Farias L.C., Souza L.W.F., Santos S.H.S., Gomez R.S., Batista De-Paula A.M., Guimarães A.L.S. (2015): Protein expression of MMP-2 and MT1-MMP in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. *International Journal of Surgical Pathology* 23: 20–25.
- Ramadori G., Gautron L., Fujikawa T., Vianna C.R., Elmquist J.K., Coppari R. (2009): Central administration of resveratrol improves diet-induced diabetes. *Endocrinology* 150: 5326–5333.
- Ramer R., Schmied T., Wagner C., Haustein M., Hinz B. (2018): The antiangiogenic action of cisplatin on endothelial cells is mediated through the release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Oncotarget* 9: 34048–34055.
- Ray S., Lu Y., Kaufmann S.H., Gustafson W.C., Karp J.E., Boldogh I., Fields A.P., Brasier A.R. (2004): Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: Induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279: 35604–35615.
- Rehn M. (2001): Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 1024–1029.
- Reunanen N., Kähäri V. (2013): Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. at <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>>.
- Roy P., Kalra N., Nigam N., George J., Ray R.S., Hans R.K., Prasad S., Shukla Y. (2009): Resveratrol enhances ultraviolet B-induced cell death through nuclear factor- κ B pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384: 215–220.
- Ruhrberg C., Palma M. De (2010): A double agent in cancer: Deciphering macrophage roles in human tumors. *Nature Medicine* 16: 861–862.

- Saad S.Y., Najjar T.A., Alashari M. (2004): Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31: 862–867.
- Sbardella D., Fasciglione G.F., Gioia M., Ciaccio C., Tundo G.R., Marini S., Coletta M. (2012): Human matrix metalloproteinases: An ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular Aspects of Medicine* 33: 119–208.
- Schmid M.C., Avraamides C.J., Dippold H.C., Franco I., Foubert P., Ellies L.G., Acevedo L.M., Manglicmot J.R.E., Song X., Wrasidlo W., Blair S.L., Ginsberg M.H., Cheresch D.A., Hirsch E., Field S.J., Varner J.A. (2011): Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs Unexpectedly activate myeloid cell PI3K γ , A single convergent point promoting tumor inflammation and progression. *Cancer Cell* 19: 715–727.
- Sedletska Y., Giraud-Panis M.-J., Malinge J.-M. (2005): Cisplatin Is a DNA-Damaging Antitumour Compound Triggering Multifactorial Biochemical Responses in Cancer Cells: Importance of Apoptotic Pathways. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 5: 251–265.
- Seyfried T.N., Huysentruyt L.C. (2013): On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis* 18: 43–73.
- Shah N., Dizon D.S. (2009): New-generation platinum agents for solid tumors. *Future Oncology* 5: 33–42.
- Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. (1997): Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry* 30: 91–113.
- Srivastava P.K. (1997): Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 12: 165–171.
- Stack M.S., Gately S., Bafetti L.M., Enghild J.J., Soff G.A. (1999): Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochemical Journal* 340: 77–84.
- Stancato L.F., Silverstein A.M., Owens-Grillo J.K., Chow Y.H., Jove R., Pratt W.B. (1997): The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the

- specific enzymatic activity of Raf kinase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 4013–4020.
- Steidl C., Lee T., Shah S.P., Farinha P., Han G., Nayar T., Delaney A., Jones S.J., Iqbal J., Weisenburger D.D., Bast M.A., Rosenwald A., Muller-Hermelink H.-K., Rimsza L.M., Campo E., Delabie J., Braziel R.M., Cook J.R., Tubbs R.R., Jaffe E.S., Lenz G., Connors J.M., Staudt L.M., Chan W.C., Gascoyne R.D. (2010): Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 362: 875–885.
- Sund M., Hamano Y., Sugimoto H., Sudhakar A., Soubasakos M., Yerramalla U., Benjamin L.E., Lawler J., Kieran M., Shah A., Kalluri R. (2005): Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 2934–2939.
- Suto R., Srivastava P.K. (1995): A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269: 1585–1588.
- Šamija M., Vrdoljak E., Krajina Z. (2006): *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada
- Teleanu R.I., Chircov C., Grumezescu A.M., Teleanu D.M. (2019): Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment. *Journal of Clinical Medicine* 9: 84.
- Tjiu J.W., Chen J.S., Shun C.T., Lin S.J., Liao Y.H., Chu C.Y., Tsai T.F., Chiu H.C., Dai Y.S., Inoue H., Yang P.C., Kuo M.L., Jee S.H. (2009): Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *Journal of Investigative Dermatology* 129: 1016–1025.
- Tomé-Carneiro J., Larrosa M., González-Sarriás A., Tomás-Barberán F., García-Conesa M., Espín J. (2013): Resveratrol and Clinical Trials: The Crossroad from In Vitro Studies to Human Evidence. *Current Pharmaceutical Design* 19: 6064–6093.
- Tsan M.-F., Gao B. (2009): Heat shock proteins and immune system. *Journal of Leukocyte Biology* 85: 905–910.
- Tsang R.Y., Al-Fayea T., Au H.J. (2009): Cisplatin overdose: Toxicities and management. *Drug Safety* 32: 1109–1122.
- Valastyan S., Weinberg R.A. (2011): Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147: 275–292.

- Vandekeere S., Dewerchin M., Carmeliet P. (2015): Angiogenesis Revisited: An Overlooked Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Microcirculation* 22: 509–517.
- Vargas-Roig L.M., Gago F.E., Tello O., Aznar J.C., Ciocca D.R. (1998): Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International Journal of Cancer* 79: 468–475.
- Vayalil P.K., Mittal A., Hara Y., Elmets C.A., Katiyar S.K. (2004): Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *Journal of Investigative Dermatology* 122: 1480–1487.
- Wang X., Khalil R.A. (2018): Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Advances in Pharmacology* 81: 241–330.
- Weis S., Cui J., Barnes L., Cheresh D. (2004): Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *Journal of Cell Biology* 167: 223–229.
- Weis S.M., Cheresh D.A. (2005): Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437: 497–504.
- Weis S.M., Cheresh D.A. (2011): Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine* 17: 1359–1370.
- Wen K.C., Fan P.C., Tsai S.Y., Shih I.C., Chiang H.M. (2012): *Ixora parviflora* protects against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs, MAP kinases, and COX-2 and by promoting type I procollagen synthesis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012: .
- Westermarck J., Kähäri V. (1999): Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal* 13: 781–792.
- Wickström S.A., Alitalo K., Keski-Oja J. (2002): Endostatin Associates with Integrin $\alpha_5\beta_1$ and Caveolin-1, and Activates Src via a Tyrosyl Phosphatase-dependent Pathway in Human Endothelial Cells. *Cancer Research* 62: 5580 – 5589.
- Wu S.L., Sun Z.J., Yu L., Meng K.W., Qin X.L., Pan C.E. (2004): Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer. *World Journal of Gastroenterology* 10: 3048–3052.

- Xiong W., Yin A., Mao X., Zhang W., Huang H., Zhang X. (2016): Resveratrol suppresses human glioblastoma cell migration and invasion via activation of RhoA/Rock signaling pathway. *Oncology Letters* 11: 484–490.
- Yang Y., Sun M., Wang L., Jiao B. (2013): HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 114: 967–974.
- Yao C., Lee D.H., Oh J.H., Kim M.K., Kim K.H., Park C.H., Chung J.H. (2015): Poly(I : C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* 80: 54–60.
- Zuazo-Gaztelu I., Casanovas O. (2018): Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Frontiers in Oncology* 8: 248.

Životopis

Ime i prezime: **Dominik Pinjuh**

Datum rođenja: **05.09.1996.**

Obrazovanje:

2018.- 2021. **Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija;** modul Fiziologija i imunobiologija Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb (Republika Hrvatska)

2015.- 2018. **Preddiplomski studij Biologije Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku,** Odjel za biologiju, Osijek (Republika Hrvatska)

2011.- 2015. Opća gimnazija Vukovar, Vukovar

Radno iskustvo: **Laboratorijska stručna praksa**

2019. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb (Republika Hrvatska), Zavod za animalnu fiziologiju

Dodatno:

2018.- 2019. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama: LabAnim A kategorija (Laboratory Animal Science Course: FELASA equivalent (60 sati)