

# Učinkovitost 5-fluorouracila i biološki aktivnih tvari iz pripravka gljiva "Agarikon plus" na rast tumora i angiogenezu u miša

---

Jagečić, Denis

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:840757>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

**Denis Jagečić**

**Učinkovitost 5-fluorouracila i biološki aktivnih  
tvari iz pripravka gljiva „Agarikon plus“ na  
rast tumora i angiogenezu u miša**

**Diplomski rad**

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom Prof. dr. sc. Nade Oršolić. 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

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### UČINKOVITOST 5- FLUOROURACILA I BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI IZ PRIPRAVKA GLJIVA „AGARIKON PLUS“ NA RAST TUMORA I ANGIOGENEZU U MIŠA

Denis Jagečić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Različite mutacije, genetske i epigenetske promjene uzrokuju nastanak tumora. Povećana aktivnost faktora rasta VEGF, matriks metaloproteinaza (MMP), dušičnog oksida (NO), te oslabljeni imunski nadzor ostvaren inhibicijom M1 makrofaga i aktivacijom M2 makrofaga doprinose rastu, razvoju i napredku tumora. Produkti medicinskih gljiva imaju razvijene imunomodulacijske, hepatoprotektivne, antidijabetske, antibakterijske, antivirusne i antioksidativne mehanizme kojima usporavaju i zaustavljaju tumorski rast i progresiju. U ovom radu istražen je pojedinačan učinak komercijalnog pripravka Agarikon plus, sastavljenog od ekstrakta medicinskih gljiva, te njegov kombinirani učinak s kemoterapeutikom 5- Fluorouracilom (5-FU) na smanjenje tumorskog rasta, progresiju, metastaziranje, te stimulaciju protutumorske imunosti. U pokusu su korištene maligne stanice CT26.WT karcinoma kolona koje su bile unesene u miševu soju BALB/c. Sedmog dana od injiciranja CT26.WT stanica, miševi su pomoću gastrične kanile dobivali Agarikon plus tijekom četrnaest dana, sa ili bez 5-FU. Životinje su žrtvovane 36. dana. Dobiveni rezultati ukazuju da Agarikon plus sam i/ili u kombinaciji s 5-FU smanjuje volumen tumora, angiogenezu i mikrožilnu gustoću, potvrđujući anti-angiogeni potencijal pripravka Agarikon plus *in vivo*. Kombinacija pripravka Agarikon plus i 5-FU te sam 5-FU pokazuju povećanu razinu NO u makrofazima što dovodi do aktivacije makrofaga, aktivacije Th1 imunskog odgovora te povećanja citotoksičnog učinka na stanice tumora, inhibicije angiogeneze i rasta tumora.

(53 stranica, 20 slika, 1 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Karcinom kolona, Agarikon plus, 5-Fluorouracil, Polarizacija makrofaga

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

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

dr.sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

dr.sc. Jasna Lajtner, izv. prof.

Rad prihvaćen: 14.9.2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### THE EFFICACY OF 5-FLUOROURACIL AND BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS FROM THE MUSHROOM PREPARATIONS "AGARIKON PLUS" ON TUMOR GROWTH AND ANGIOGENESIS IN MOUSE

Denis Jagečić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Various mutations, genetic and epigenetic changes are the cause of tumor formation. Increased activity of the VEGF factor, matrix metalloproteinase (MMP), nitric oxide (NO), and the impaired immune monitoring by inhibition of M1 macrophage and activation of M2 macrophages contribute to growth, development and progression of tumors. Medicinal fungi products have developed immunomodulatory, hepatoprotective, anti-diabetic, antibacterial, antiviral and antioxidant mechanisms that slow down and stop tumor growth and progression. This paper explored the singular effect of the commercially available Agarikon plus medicament extract, and its combined effect with 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapeutic on decreasing tumor growth, progression, metastasis, and stimulation of anti-inflammatory immunity. In the experiment, CT26.WT colon cancer cells were injected into the BALB/c mice. On the seventh day of inoculation of CT26.WT cells, mice were given Agarikon plus by gastric cannula for fourteen days, with or without 5-FU. Animals are sacrificed on the 36th day. The obtained results indicate that Agarikon plus alone and/or in combination with 5-FU reduces tumor volume, angiogenesis and microarray density, confirming the anti-angiogenic potency of Agarikon plus in vivo. The combination of Agarikon plus and 5-FU and 5-FU alone show increased levels of NO in macrophages, leading to macrophage activation, activation of Th1 immune response and increased cytotoxic effect on tumor cells, inhibition of angiogenesis, and tumor growth.

(53 pages, 20 figures, 1 table, 85 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Colon cancer, Agarikon Plus, 5-Fluorouracil, Macrophage polarization Supervisor:

Dr.sc. Nada Oršolić, Prof

Reviewers: dr.sc. Nada Oršolić, Prof

dr.sc. Sandra Radić Brkanac, Prof

dr.sc. Jasna Lajtner, Prof

Thesis accepted: 14.9.2017.

## SADRŽAJ:

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. ANGIOGENEZA</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1.2. MATRIKS METALOPROTEINAZE</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>1.3. DUŠIČNI OKSID</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1.4. PROTUTUMORSKA TERAPIJA</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>1.5. MEDICINSKE GLJIVE</b> .....   | <b>7</b>  |
| 1.5.1 Imunomodulacijski učinak medicinskih gljiva .....   | 7         |
| <b>1.6. TUMORU PRIDRUŽENI MAKROFAZI</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>1.7. GLAVNI CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>2.1. MATERIJALI</b> .....  | <b>12</b> |
| 2.1.1. Tumorske stanice CT26.WT (ATCC® CRL-2638™) i uvjeti kultiviranja stanica.....                    | 12        |
| 2.1.2. Pokusne životinje .....  | 13        |
| 2.1.3. Agarikon plus.....   | 13        |
| 2.1.4. 5-Fluorouracil (5-FU).....   | 13        |
| <b>2.2. METODE</b> .....  | <b>14</b> |
| 2.2.1. Plan pokusa i način obrade u skupinama.....  | 14        |
| 2.2.2. Proizvodnja tumora u mišićnom tkivu desne stražnje noge i praćenje promjene volumena tumora..... | 15        |
| 2.2.3. Određivanje razine faktora VEGF .....  | 15        |
| 2.2.3.1. Postupak izvođenja ELISA testa za određivanje faktora VEGF .....                               | 15        |
| 2.2.4. Određivanje razine MMP2 .....  | 16        |
| 2.2.4.1. Postupak izvođenja ELISA testa za određivanje razine MMP2 .....                                | 17        |
| 2.2.5. Određivanje razine MMP9 .....  | 17        |
| 2.2.5.1. Postupak izvođenja ELISA testa za određivanje razine MMP9 .....                                | 18        |
| 2.2.6. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u .....                               | 19        |
| 2.2.6.1. Radni postupak određivanja razine dušikovog oksida .....                                       | 20        |
| 2.2.7. Procjena aktivnosti arginaze .....   | 20        |
| 2.2.7.1. Radni postupak ELISA testa za određivanje razine arginaze.....                                 | 21        |
| 2.2.8. Određivanje razine citokina .....  | 21        |
| 2.2.8.1. Radni postupak ELISA testa za određivanje razine citokina .....                                | 22        |
| <b>3. REZULTATI</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>3.1. HISTOLOŠKA ANALIZA KRVNIH ŽILA</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>3.2. VOLUMEN TUMORA</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>3.3. RAZINA ČIMBENIKA RASTA KRVOŽILJA (VEGF)</b> .....   | <b>28</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.4. RAZINA DUŠIK OKSIDA (NO) .....</b> | <b>29</b> |
| <b>3.5. RAZINA ARGINAZE 1.....</b>         | <b>32</b> |
| <b>3.6. RAZINA MMP 2 i 9 .....</b>         | <b>35</b> |
| <b>3.7. RAZINA CITOKINA.....</b>           | <b>37</b> |
| <b>4. RASPRAVA.....</b>                    | <b>39</b> |
| <b>5. ZAKLJUČAK.....</b>                   | <b>48</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                 | <b>49</b> |
| <b>7. ŽIVOTOPIS.....</b>                   | <b>52</b> |

## **1. UVOD**

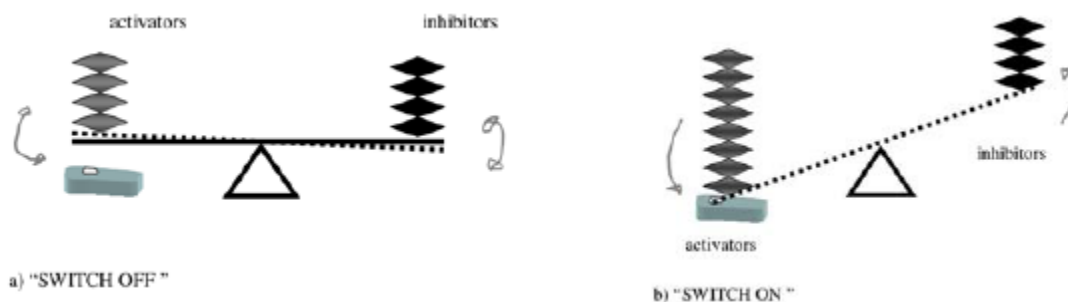
Višestanični organizmi predstavljaju visoko uređenu organizaciju stanica u kojoj se održava normalna fiziološka ravnoteža između umiranja stanica i njihovog stvaranja. Ponekad se pojave stanice koje izgube normalne mehanizme regulacije rasta, počinju se nezavisno, nesvrhovito i autonomno dijeliti, te stvaraju besmrtnu potomku. Takve se stanice nazivaju tumorske stanice, a imaju sposobnost umnažanja u klon čime tvore tumore ili neoplazije. Tumorski čvor nastaje dugotrajnim procesom kojeg karakteriziraju razne genetske i epigenetske promjene porijeklom iz jedne stanice. Nastali tumorski čvor može rasti strogo ograničen od okolnog zdravog tkiva (benigni tumor) ili se može, razarajući bazalnu membranu ili šireći se krvlju i limfom proširiti u zdrava tkiva i udaljene dijelove tijela (maligni tumor). Molekularni mehanizmi koji pretvaraju normalne stanice u tumorske uglavnom se baziraju na akumulaciji mutacija gena odgovornih za rast ili reprodukciju stanica (Andreis i sur., 2010). Tri skupine gena imaju ključnu ulogu u neoplastičnoj transformaciji: tumor supresor geni, onkogeni i geni za udvostručenje i popravak molekule DNA. Tumor supresor geni koji zaustavljaju abnormalan stanični rast, inaktivirani su točkastom mutacijom, delecijom te epigenetskim čimbenicima. Epigenetski čimbenici poput hipermetilacije mogu utišati tumor supresor gene. Onkogeni su skupina gena nastala brojnim mutacijama gena, amplifikacijom, translokacijama i hipometilacijom gena iz protoonkogeni i potiču prekomjerno stanično dijeljenje. Treću skupinu gena predstavljaju geni zaduženi za udvostručenje i popravak molekule DNA. Za razvoj tumora potrebne su mutacije u najmanje šest gena koji kontroliraju staničan rast i diobu (Andreis i sur., 2010).

### **1.1. ANGIOGENEZA**

Zloćudne tumorske stanice imaju sposobnost cirkulacije i proliferacije unutar krvnih i limfnih žila čime nastaju metastaze. Za brzinu širenja i razvoja metastaza ključan je proces angiogeneze (Nishida i sur., 2006). Krvne se žile mogu razviti vaskulogenezom iz endotelnih prekursora ili angiogenezom i arteriogenezom gdje dolazi do pupanja krvnih žila iz već postojećih čime nastaje most arterijske mreže (Chen i sur., 2009). Procesom angiogeneze i limfogeneze tumor osigurava novi dotok kisika i hranjivih tvari neophodnih za njegov rast (Chen i sur., 2009). Naglim se tumorskim rastom, uslijed prevelike potrošnje kisika razvija hipoksija tkiva, koja sukladno djelovanju može biti akutna, kronična i hipoksija sa reperfuzijom (Chen i sur., 2009). Razvojem akutne hipoksije i hipoksije sa reperfuzijom dolazi do privremenog zastoja cirkulacije i povrata žilnog sadržaja unutar tumorskih žila što rezultira razvojem re-



oksigenacijske ozljede. Takva „ozljeda“ dovodi do povećanog tkivnog oštećenja, aktivacije skupine gena odgovorne za razvoj staničnog stresa, te do povećanja razine koncentracije slobodnih radikala. Zbog dužeg trajanja, kronična hipoksija uzrokuje smrt normalnih stanica, ali ne i tumorskih stanica (Chen i sur., 2009). Tumorske su stanice, zbog svojih genetskih promjena postale otporne na hipoksiju, te u takvim uvjetima nastavljaju svoju nekontroliranu proliferaciju (Chen i sur., 2009). Otkriveno je mnogo endogenih i egzogenih faktora ključnih za razvoj neoplastične i normalne vaskularizacije među kojima su najvažniji VEGF (engl. *Vascular endothelial growth factor*) i njegov receptor VEGFR, te HIF (engl. *Hypoxia-inducible factor*) (Tablica 1.) (Nishida i sur., 2006). Vezanjem za VEGFR endotelnih stanica, VEGF stimulira lučenje MMP koje uzrokuju razaranje izvanstaničnog matriksa (Nishida i sur., 2006). HIF pripada transkripcijskom kompleksu sastavljenom od heterodimera HIF- $\alpha$  i HIF- $\beta$  (Chen i sur., 2009). HIF- $\alpha$  djeluje kao glavna senzorna molekula hipoksije, a regulirana je proteinskom razgradnjom (Chen i sur., 2009). U hipoksiji se HIF- $\alpha$  veže za HIF-1 $\beta$  čime tvore aktivacijski transkripcijski kompleks. Aktivnost HIF-1 $\beta$  je konstitutivna, pa stoga ne ovisi o razini kisika (Chen i sur., 2009). Otkrivene su tri izoforme HIF- $\alpha$ , među kojima su HIF- $\alpha$ 1 i HIF- $\alpha$ 2 homologne i pokazuju hipoksija odgovorni element (engl. *Hypoxia-responsive elements-HIF-e*) (Chen i sur., 2009). Angiogeneza je kontrolirana stimulatornim i inhibitornim molekulama i signalima (Nishida i sur., 2006). Kada su tumorskoj stanici potrebni kisik i hranjive tvari dolazi do stimulacije angiogeneze (Nishida i sur., 2006). Za poticanje angiogeneze nije dostatna samo aktivacija stimulatornih molekula, već je nužno i dodatno utišavanje inhibitornih signala i molekula (Slika 1.) (Nishida i sur., 2006).



**Slika 1.** Angiogeneza je određena stimulatornim i inhibitornim molekulama i signalima. Kada su tumorskoj stanici potrebni kisik i hranjive tvari potiče se proces angiogeneze. Za pokretanje angiogeneze nije dostatna samo aktivacija stimulatornih molekula, već je nužno i popratno utišavanje inhibitornih signala i molekula. (Preuzeto i prilagođeno od: Nishida i sur. 2006)

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

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

(Preuzeto i prilagođeno od Dedić Plavetić i sur. 2003)

## 1.2. MATRIKS METALOPROTEINAZE

Remodeliranje izvanstaničnog matriksa je ključno za razvoj, invazivnost i metastaziranje malignih tumora. Matriks metaloproteinaze (MMP) predstavljaju skupinu cink ovisnih endopeptidaza koje imaju sposobnost razaranja svih komponenti izvanstaničnog matriksa. Imaju ključnu fiziološku ulogu u razaranju matriksa tijekom razvoja tkivne morfologije, u održavanju normalne funkcije maternice, zacjeljivanju rana, te angiogenezi. Osim važne fiziološke uloge u razvoju organizma, proteinaze također utječu na razvoj raznih patoloških oboljenja kao što su reumatoidni artritis, osteoartritis, aneurizme, periodontitis, neke autoimune bolesti, te metastaze i tumorsku progresiju. Danas je otkrivena 21 matriks metaloproteinaza koje su ovisno o strukturi i specifičnosti vezanja za supstrat podijeljene u skupine. Sukladno specifičnosti za supstrat, proteinaze se svrstavaju u skupinu kolagenaza, stromelizine, matrilizine, gelatinaze, membranske tipove MMP, te ostale (Reunanen i Kahari, 2013). Strukturno se sastoje od nekoliko domena. Katalitička domena koja se sastoji od tri histidina formira cink vezano mjesto. Sve MMP sadrže predomenu koja se sastoji od N-terminalnog hidrofobnog signalnog slijeda koji potiče njihovu sintezu u endoplazmatskom retikulumu, te njihovo izlučivanje u izvanstanični prostor. Aktivnost se postiže potpunim katalitičkim cijepanjem, nakon kojeg se aktivacijsko mjesto zatim specifično veže za komplementarni supstrat (Slika 2.) (Mannello i Meda, 2012).



(iNOS) čine konstitutivnu skupinu NOS-a (cNOS), ovisnu o koncentraciji kalcijevih iona koja sintetizira kratkoživući NO manje koncentracije (koncentracija u nanomolima) (Vahora i sur., 2016). Inducibilna NOS, neovisna o kalcijevim ionima sintetizira NO koji traje danima u mikromolarnoj koncentraciji (Vahora i sur., 2016). Dokazano je kako NO, ovisno o uvjetima, razini, te vrsti stanice na koju djeluje može inhibirati ili poticati razvoj i rast tumora (Fukumura i sur., 2006). Genetska indukcija iNOS-a u tumorskom tkivu rezultira njegovim rastom (Fukumura i sur. 2006). NOS, gvanilat ciklazom i mitogen aktiviranom protein kinazom (MAPK) utječe na pokretljivost i invazivnost tumorskih stanica, na proliferativnu sposobnost limfocita u limfomima, te na smanjen imunološki odgovor usmjeren protiv tumora (Fukumura i sur. 2006). I dalje je kontroverzna povezanost između visoke razine VEGF faktora i povišene razine NO-a u angiogenezi (Fukumura i sur., 2006). Visoka razina NO-a proizvedenog iz NOS potiče apoptozu, te inhibira tumorski rast i metastaziranje (Fukumura i sur., 2006). U tumorskoj liniji mutanata p53, u odnosu na divlji tip, iNOS indukcija dovodi do povećane ekspresije VEGF-a, angiogeneze i tumorskog rasta (Fukumura i sur., 2006). Povećana razina iNOS-a rezultira sintezom toksičnog NO-a koji ima citotoksičan tumorski učinak (Fukumura i sur., 2006). Egzogeni iNOS prijenos, u odnosu na endogeni potiče protutumorsku aktivnost i djelovanje (Fukumura i sur., 2006).

#### **1.4. PROTUTUMORSKA TERAPIJA**

Ključna značajka u zaustavljanju tumorskog rasta i progresije se temelji na ranom otkrivanju vlastitih, promijenjenih stanica (Sudhakar, 2009). Otkrićem anestezije, tumori su se uglavnom uklanjali operativnim zahvatima (Sudhakar, 2009). Novim otkrićima i većim razumijevanjem patofiziologije tumorskog razvoja i metastaza, dokazano je da operativni zahvati često zbog oštećenja tkiva i rasapa stanica doprinose bržoj progresiji i metastaziranju (Sudhakar, 2009). Razvojem kemoterapije omogućen je multidisciplinarni pristup liječenja, koji se temelji na kombinaciji operativnih zahvata i/ili kemoterapije, radioterapije i novijih metoda poput krioterapije i imunoterapije (Baba i Catoi, 2007). Kemoterapija se temelji na primjeni kemijski aktivnih tvari koje djeluju na tumorske stanice (Baba i Catoi, 2007). Klinički dokazi ukazuju da učinkovitost kemoterapije ovisi o mnogim čimbenicima tumorskih stanica poput transmembranskog prijenosa kemijskih tvari u stanicu, katalitičkih ograničenja (dekarboksilacije, hidrolize, fosforilacije, redukcije, oksidacije, esterifikacije...), promjene afiniteta ciljnih molekula, imunosnoj inaktivaciji, distribuciji, enzimskoj aktivnosti (Baba i Catoi, 2007). Nuspojave koje se javljaju tijekom korištenja kemoterapeutskih pripravaka

najviše ovisi o tipu stanice, te sposobnosti dijeljenja određene stanice; stanice s najvećom diobenom sposobnosti, poput limfocita, stanica koštane srži i stanice probavnog sustava su najosjetljivije na djelovanje kemijskih spojeva i trpe najveća oštećenja (Baba i Catoi, 2007). Najmanje osjetljive stanice su stanice jetre i bubrega, stanice bazalnog epitela, te stanice živčanog sustava (Baba i Catoi, 2007). Nuspojave nastale kemoterapijom uključuju trombocitopeniju, retikulopeniju, neutropeniju, anemije, proljeve, povraćanja, anoreksiju, gubitak kose (Baba i Catoi, 2007). Mehanizmi djelovanja antitumorskih pripravaka se uglavnom temelje na prekidanju stanične diobe, DNA sinteze, kromosomske migracije, te blokiranju sinteze proteina. Istraživanja pokazuju kako terapija 5 – Fluorouracilom (5-FU) smanjuje tumorsku progresiju u velikom broju tumora, posebice kolorektalnih tumora. 5-FU djelujući na metabolički put sinteze folata, sprečava sintezu DNA i RNA molekule. Mehanizam učinkovitosti 5-FU temelji se na djelovanju enzima metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) koja ireverzibilno reducira 5,10 metilentetrahidrofolat ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) u 5 metiltetrahidrofolat, te o prisutnosti MTHFR gena (Pardini i sur., 2011).

## **1.5. MEDICINSKE GLJIVE**

U cilju smanjenja posljedica kemoterapije te poboljšanja učinkovitosti kemoterapeutika često se primjenjuju iscjedci medicinskih gljiva koje imaju imunomodulacijska, hepatoprotektivna, antidijabetska, antibakterijska, antivirusna i antioksidativna svojstva. Taksonomski, medicinske gljive se dijele na bazidiomicete i askomicete. U gljive sa dokazanim medicinskim učinkom se ubrajaju gljive iz roda *Lentinus*, *Auricularia*, *Heridium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus*, *Tramella*, *Glanoderma*, *Trametes*... Medicinske gljive predstavljaju neograničen izvor polisaharida, proteina, masti, ulja, glikozida, alkaloida, tokoferola, flavonoida, karotenoida, folata i organskih kiselina koji posjeduju snažna antitumorska i imunomodulacijska svojstva. Organski spojevi sa dokazanim protutumorskim svojstvima su lentinani, krestini, hispoloni, lektini, iludini... Takvi organski spojevi, ne napadaju izravno tumorske stanice, već aktiviraju različite protektivne mehanizme imunološkog sustava (Ganeshpurkar i sur., 2010).

### **1.5.1 Imunomodulacijski učinak medicinskih gljiva**

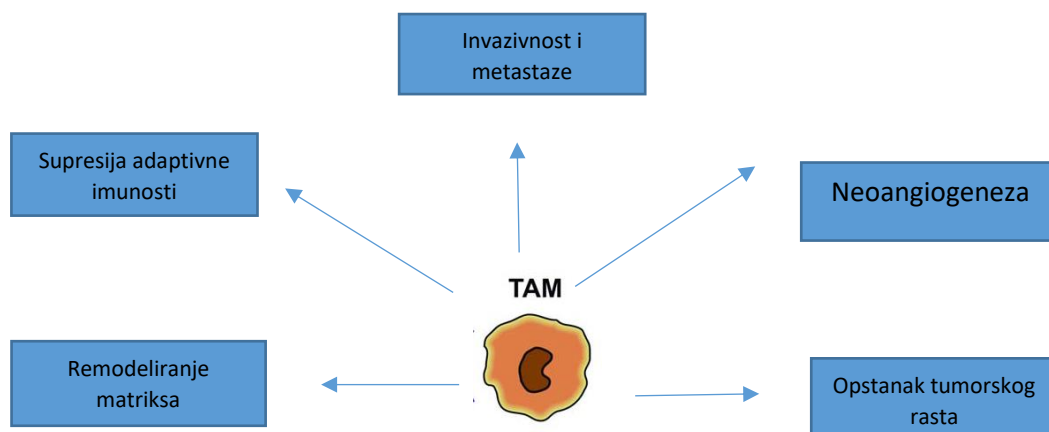
Imunomodulacijski učinak se bazira na suradnji između urođene, nespecifične, te stečene, specifične imunosti. Glavne stanice nespecifične imunosti su makrofazi, neutrofili, NK stanice i dendritične stanice čija je uloga strogo regulirana citokinima i proteinima akutne faze. Aktivni

polisaharidi iz gljiva se mogu vezati za proteine, te mijenjati njihovu strukturu i raznolikost čime imaju ključno imunomodulacijsko djelovanje. Predstavljaju snažne aktivatore NK stanica koje svoju imunomodulacijsku ulogu ostvaruju djelovanjem na CD4<sup>+</sup> pomoćničke limfocite T. Protutumorska učinkovitost ostvaruju i aktivacijom citotoksičnih makrofaga, te promocijom diferencijacije T limfocita. Aktivirani makrofazi lučenjem citokina IL-6 (IL- interleukin), IL-12 i TNF- $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor*) potiču proupalni, stanični imunološki odgovor usmjeren protiv tumorskih stanica.  $\beta$ -D glukani i proteinska polisaharidna frakcija (GLB) iz gljive *Ganoderma lucidum* lučenjem IFN- $\gamma$  (interferon) stimuliraju aktivnost makrofaga, potiču izražaj MHC II (engl. *Major histocompatibility complex*) molekula antigen predočnih stanica čime se znatno olakšava antigensko prepoznavanje i imunološko zaštitno djelovanje, te konačno aktiviraju klasični i alternativni put aktivacije komplementa što omogućuje uništenje tumorskih stanica (Ganeshpurkar i sur., 2010).

## 1.6. TUMORU PRIDRUŽENI MAKROFAZI

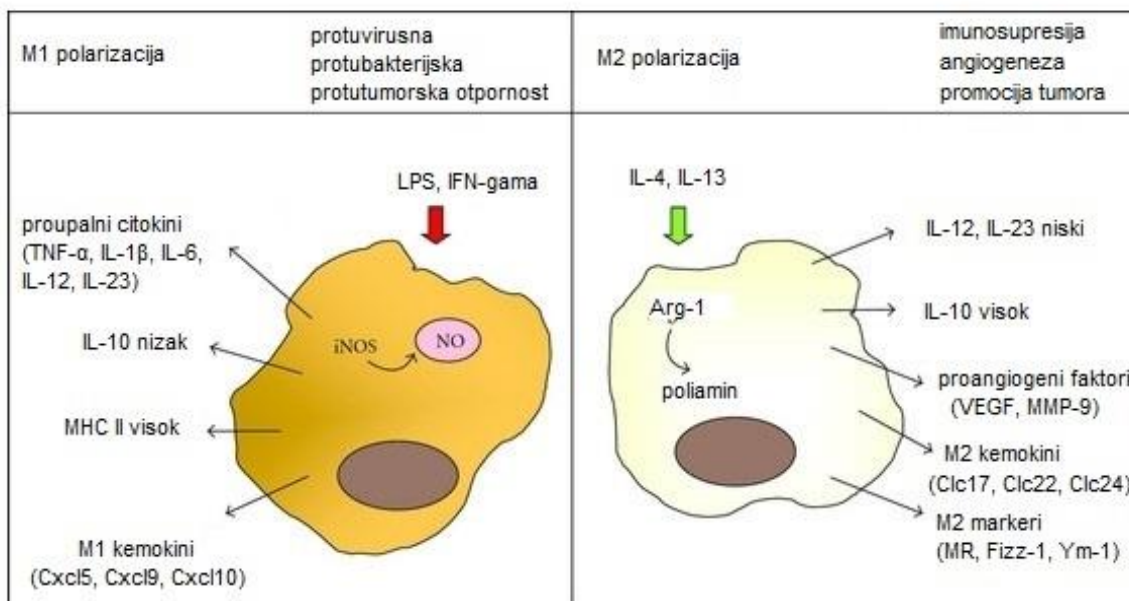
U patološkim se stanjima (uključujući i tumore) nakupljaju različite vrste stanica i subpopulacija leukocita. Tumorski se mikrookoliš (engl. *Tumor microenvironment – TM*) osim od tumorskih stanica, sastoji i od fibroblasta i endotelnih stanica, te različitih imunoloških stanica poput makrofaga i limfocita. Monociti se djelovanjem GM-CSF-a (engl. *Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor*), M-CSF-a (engl. *Macrophage colony stimulating factor*), kortikosteroida, te IL-4, IL-13 i IL-10 diferenciraju u makrofage. Uloga makrofaga unutar tumora nazvanih tumoru pridruženi makrofagi (TAMs, od engl. *Tumor-associated macrophages*) je iznimno složena, te ovisno o stimulaciji (npr. lipopolisaharidom i IFN- $\gamma$ ) može biti citotoksična za tumorske stanice ili zaštitna kada potpomaže tumorskom rastu i razvoju (Slika 3). Ovisno o ulozi i stimulaciji makrofazi mogu biti M1 ili M2 polarizacije (Slika 4.). Unutarstanični patogeni i IFN- $\gamma$  potiču aktivnost M1 makrofaga i neutrofila, te na taj način pokreću razvoj upale koja ima važnu ulogu u nastanku i razvoju tumora. Aktivnost M1 makrofaga je vidljiva povećanim izražajem MHC II molekula, lučenjem proupalnih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 i TNF- $\alpha$ , te proizvodnjom slobodnih dušikovih radikala čime mogu ubijati patogene i tumorske stanice. Suprotno M1 makrofazima koji reguliraju upalni i Th1 odgovor, M2 makrofazi reguliraju protu-upalni i Th2 stanični odgovor, te potiču angiogenezu, remodeliranje matriksa i popravak nastalog oštećenja. Polarizacija M2 makrofaga prvenstveno je ovisna o citokinima IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$  (engl. *Transforming growth factor- beta*), te

o glukokortikoidima. Identificirani su M2a, M2b i M2c makrofazi koji se razlikuju prema lučenju specifičnih citokina i molekula poput arginaze. M2a makrofazi luče imunoregulacijske IL-4 i IL-13 citokine. M2b i M2c luče imunosupresivni IL-10 i potiču Th2 humoralni odgovor temeljen na proizvodnji protutijela. IL-10 potiče diferencijaciju monocita u makrofage, te blokira njihovu diferencijaciju u dendritične stanice. Angiogeneza je proces povezan uz djelovanje M2 makrofaga. Akumulacija TAM-a je povezana sa angiogenezom i aktivacijom angiogenetskih čimbenika poput VEGF-a, HIF-a (engl. *Hypoxia-inducible factor*), FGF-a, TGF-a... Faktor VEGF-C iz TAM-a je ključan za razvoj limfoangiogeneze i rasap tumorskih stanica unutar limfnih žila. TAM luči kemokine i molekule poput timidin fosforilaze koje potiču migraciju endotelnih stanica i razvoj metastaza, te faktore rasta poput EGF-a (engl. *Epidermal growth factor*), FGF-a (engl. *Fibroblast growth factor*), VEGF-a, PDGF-a (engl. *Platelet derived growth factor*) čime se osigurava proliferacija i angiogeneza. M2 makrofazi, također luče enzime koji imaju sposobnost razaranja izvanstaničnog matriksa poput MMP, plazmina i urokinaznog tipa aktivacije plazminogena (Slika 3.) (Sica i sur., 2006).



**Slika 3.** TAM pokazuje nekoliko pro-tumorskih obilježja. Kemokini, citokini i enzimi potiču neoangiogenezu (VEGF, FGF, TNF, ELR kemokin), opstanak tumorskog rasta (faktori rasta, CXCL8, CXCL12), invazivnost (MMP, TNF, kemokini), supresiju imunosti (IL-10, TGF- $\beta$ , CCL17, CCL18, CCL22) i remodeliranje matriksa (kemokini, MMP, TGF- $\beta$ ) čime se ispunjavaju uvjeti za neometan rast i razvoj (Preuzeto i prilagođeno od Sica i sur., 2006).





**Slika 4.** Različita uloga M1 i M2 makrofaga. M1 makrofazi luče proupalne citokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 i TNF- $\alpha$ , izražavaju visoku razinu MHC II molekula i imaju važnu protutumorsku, protuvirusnu i protubakterijsku ulogu. M2 makrofazi luče imunosupresivne citokine IL-4, IL-10, IL-13, te proangiogenetske i metastatske čimbenike poput VEGF faktora i MMP-a kojima potiču angiogenezu i razvoj tumora. (Preuzeto od Través i sur., 2012)

## **1.7. GLAVNI CILJ ISTRAŽIVANJA**

Glavni cilj istraživanja jest istražiti protutumorsku učinkovitost komercijalnog pripravka Agarikon plus (registrirani proizvod tvrtke Dr. Myko San – zdravlje iz gljiva) samog i/ili združenog s 5-FU na rast tumora, angiogenezu i polarizaciju makrofaga na modelu miša nositelja stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC® CRL-2638™).

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. MATERIJALI

Istraživanje se temeljilo na primjeni *in vivo* i *in vitro* metoda. Jedan od glavnih ciljeva *in vivo* metoda je bilo odrediti protutumorsku učinkovitost komercijalnog pripravka Agarikon plus na modelu miša (BALB/ c) nositelju karcinoma kolona, te učinkovitost u kombinaciji sa 5-FU koji se koristi u kemoterapiji karcinoma kolona. Upotrebom *in vivo* i *in vitro* metoda istraživala se protutumorska učinkovitost pripravaka iz gljiva na: a) rast tumora; b) angiogenezu i invazivnost; c) imunosne parametre u životinjama (funkcionalnu sposobnost makrofaga).

#### 2.1.1. Tumorske stanice CT26.WT (ATCC® CRL-2638™) i uvjeti kultiviranja stanica

Kolorektalni tumor je treći najučestaliji tip tumora u svijetu. Klinički i histološki, tumor može gradirati od najblažeg 1. stupnja pa do najtežeg 4. stupnja koji je često karakteriziran najvećim oštećenjima i prisutnošću metastaza. Kolorektalni karcinom uzrokuje promjene u Wnt- $\beta$ -katenin signalnom putu, mitogen aktiviranoj protein kinazi (MAPK), fosfatidilinozitol-3 (PI3K) signalnom putu, signalnom putu NF $\kappa$ B, te signalnom putu aktivacije proteina AP-1. Mišji modeli inficirani kolorektalnim tumorom se koriste zbog boljeg razumijevanja patogenog mehanizma razvoja tumora, zbog razvoja novih zaštitnih strategija, te zbog procjene terapijskog učinka kemoterapeutika (Cheruku i sur., 2015). U pokusu sam koristio maligne stanice CT26.WT (ATCC® CRL-2638™) karcinoma kolona. Stanična linija CT26 je N-nitrozo-N-metiluretan inducirani nediferencirani adenokarcinom debelog crijeva, singeničan za BALB/c miševima (Šaban i sur., 2013). Stanična linija CT26.WT je uzgojena u staničnoj kulturi kao jednosloj u RPMI-1640 mediju s 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka) uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma (FCS, Gold, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Njemačka), 100 U/mL penicilina i 100  $\mu$ g/mL streptomocina (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Njemačka). Stanice su inkubirane na 37 °C u vlažnoj atmosferi koja je sadržavala 5% CO<sub>2</sub>. Za *in vivo* pokus korištene su samo stanice CT26.WT prve 3 serijske pasaže nakon odmrzavanja stanica. Na dan injiciranja tumorskih stanica, stanice su sakupljene iz subkonfluentnih kultura (70% -85%) tripsinizacijom (0,05% tripsina i 0,02% etilen diamin tetraoctene kiseline (EDTA), PAA Laboratories GmbH) i isprane dvaput u fosfatno puferiranoj otopini (PBS ) te injicirane subkutano u BALB/c miševima. Vijabilnost stanica određena je u hemocitometru (Burker-Tiirkovoj komorici) praćenjem sposobnosti intaktnih stanica da nakon bojenja s tripanskim modrilom isključe „Trypan blue“ boju pomoću fazno-kontrastnog mikroskopa. Broj živih stanica je bio veći od 95%.

### 2.1.2. Pokusne životinje

Istraživanje sam provodio na miševima soja BALB/c, starosti 2-3 mjeseca, mase 20-25 g iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Zagrebu. Prije početka i tijekom izvođenja pokusa životinje sam pojedinačno vagao, temeljem čega sam određivao količinu injiciranih pojedinačnih pripravaka. Nakon vaganja, miševe sam podijelio u četiri skupine (n=10 životinja po skupini) i kako slijedi:

1. KONTROLA
2. AGARIKON PLUS (AP)
3. AP + 5FU
4. 5FU

Životinje sam držao u kavezima (najviše do deset životinja po kavezu) i hranio standardnom hranom za laboratorijske životinje (4RF 21 Mucedola S.R.L. Italija), uz stalnu dostupnost vode. Miševima sam injicirao  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638) subkutano. Istraživanje sam provodio sukladno etičkim principima Republike Hrvatske prema Pravilniku o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne Novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine br. 135/06) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) # 86-23 1985).

### 2.1.3. Agarikon plus

U pokusu sam koristio AGARIKON PLUS (tekući proizvod Dr Myko San – Zdravlje iz gljiva, Zagreb, Hrvatska), otopljen u fiziološkoj otopini, pripremljen u dozi od 10 400 mg/kg. Komercijani pripravak Agarikon plus sadrži tekuće ekstrakte iz jestivih i ljekovitih gljiva *Lentinus edodes* (shiitaki), *Grifola frondosa* (maitake), *Ganoderma lucidum* (reishi), *Pleurotus ostreatus* (bukovača), *Agaricus blazei* (=brasiliensis), *Tricholoma matsuake* (= caligatum, subrufescens).

### 2.1.4. 5-Fluorouracil (5-FU)

U istraživanju sam također koristio i FLUOROURACILUM (5-Fluorouracil, proizvod Plive, Zagreb, Hrvatska) pripremljen u dozi od 30 i 15 mg/kg te injicirao miševima intraperitonealno (*ip*) po sljedećoj shemi: 1.-4. dana 30 mg/kg, te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana.

## 2.2. METODE

### 2.2.1. Plan pokusa i način obrade u skupinama

Četiri skupine su sedmog dana od injiciranja stanicama CT26.WT dobivale pomoću gastrične kanile Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg (260 mg/dan za miša od 25g) tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila u dozi od 30 ili 15 mg/kg *ip* prema slijedećoj shemi : 1.-4. dan 30 mg/kg, te 15 mg/kg 6, 8, 10 i 12 dana, dok su kontrole bile obrađene samo fiziološkom otopinom. Nakon 36. dana, životinje sam žrtvovao. Tijekom tog postupka životinje su bile anestezirane i analgezirane *ip* primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin) u dozi od 25 mg/kg. Prije žrtvovanja sam svim životinjama odredio tjelesnu težinu. Nakon žrtvovanja, životinjama sam izolirao organe (bubreg, jetra, slezena), te im uzorkovao krv. *In vivo* procjenu angiogeneze vršio sam brojenjem krvnih žila i kapilara u području intenzivnog formiranja krvožilja u solidnom tumoru na histološkom preparatu. Pripremu tumorskih stanica sam radio izolacijom iz tumorske nakupine, ispiranjem fiziološkom otopinom, te fiksacijom 10% neutralnim formalaldehidom. Nakon fiksacije i ispiranja, uzorke sam podvrgnuo procesu dehidracije koji sam provodio uranjanjem u rastuću koncentraciju etanola (70%, 80%, 96%, 100%) i procesu prosvjetljivanja kloroformom tijekom 24 sata. Uzorke sam kasnije utapao u paraplant, rezao mikrotomom na debljinu 7-8  $\mu\text{m}$  i bojao hematoksilinom i eozinom (HE). Uzorke krvi, seruma, makrofage slezene, te stanice tumora koristio sam za analizu VEGF faktora, MMP2, MMP9, arginaze i razine dušikovog oksida (NO) pomoću ELISA metode. Glavni ciljevi su bili:

- a) praćenje rasta tumora (mjerenjem tumorskog volumena i mase)
- b) angiogeneza (mjerenjem razine faktora VEGF)
- c) sposobnost metastaziranja (mjerenjem razine enzima MMP2 i MMP 9)
- d) funkcionalna sposobnost stanica imunskog sustava i upala (mjerenjem razine upalnih citokina, aktivnosti i polarizacije makrofaga mjerenjem razine induciranih dušik oksida i arginaze 1).

### **2.2.2. Proizvodnja tumora u mišićnom tkivu desne stražnje noge i praćenje promjene volumena tumora**

Tumor u mišićnom tkivu desne stražnje noge sam izazvao injiciranjem  $1 \times 10^6$  stanica CT26.WT subkutano u bedreni mišić. Tumor sam mjerio kaliperom svakih šesti dan nakon pojavnosti tumora u svim skupinama. Rast tumora sam pratio mjerenjem širine i duljine kaliperom, te volumen tumora ( $\text{mm}^3$ ) preračunao formulom: volumen tumora ( $\text{mm}^3$ ) =  $(a \times b^2)/2$ , gdje a i b su duljina tumora i širina (mm).

### **2.2.3. Određivanje razine faktora VEGF**

U ovom sam istraživanju, za procjenu razine faktora VEGF koristio mišji VEGF kit (VEGF immunoassay, R&D Systems Quantikine ELISA Kit). Za analizu sam koristio mišje uzorke seruma, a sama metoda se bazirala na ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) sendvič tehnici kod koje sam specifična mišja poliklonalna protutijela prethodno nanio na mikrotitarske pločice. Faktor VEGF iz standarda, uzoraka ili kontrole se vezao za imobilizirana protutijela na dnu mikrotitarske pločice. Za izradu standardne krivulje, koristio sam standard koji sam pripremio u različitim koncentracijama. Koncentrirani mišji VEGF standard (500 pg/mL) sam koristio kao visoki standard. Otopinu RD5T sam koristio kao nulti standard (0 pg/mL).

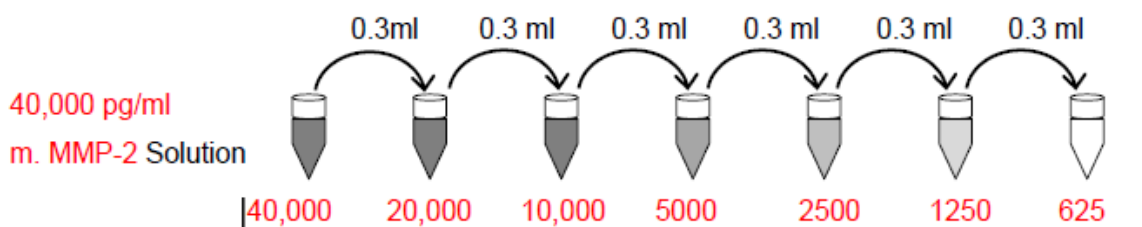
#### **2.2.3.1. Postupak izvođenja ELISA testa za određivanje faktora VEGF**

1. Pripremio sam sve otopine, uzorke i standard sukladno dobivenim uputama.
2. U svaku jažicu sam dodao 50  $\mu\text{L}$  standarda, kontrole ili uzorka i 50  $\mu\text{L}$  otopine RD1N.
3. Nevezani dio sam ispirao 5 puta sa 400  $\mu\text{L}$  pufera. Nakon zadnjeg sam ispiranja uklonio preostali pufer pomoću aspiriranja ili dekantiranja.
4. Za ispravno provođenje sendvič reakcije, vezanom VEGF faktoru sam dodao 100  $\mu\text{L}$  VEGF konjugata i inkubirao 2 sata.

5. Kako bi reakcija bila vidljiva, na kraju sam dodao 100  $\mu\text{L}$  substrata koji je uzrokovao promjenu boje u plavu.
6. Pokus sam završio dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  Stop otopine u svaku jažicu nakon koje se iz plavog razvilo žuto obojenje. Na kraju sam koristeći mikrotitarski čitač postavljen na 450 nm, unutar 30 minuta od završetka odredio optičku gustoću svake jažice.
7. Rezultate sam dobio iz krivulje standarda, nelinearnom regresijom u četiri točke.

#### 2.2.4. Određivanje razine MMP2

Za određivanje razine MMP2 sam koristio komercijalni ELISA kit proizvođača Biospes inc. i prethodno pripremljene uzorke seruma. Test za određivanje razine MMP2 se bazirao na metodi sendvič ELISE. Prije početka testiranja, poliklonalna protutijela sam nanio na jažice mikrotitarske pločice. Standard, uzorke i biotinom konjugirana protutijela sam pripremao i dodavao naknadno, sukladno protokolu. Za vizualizaciju HRP (hren peroksidazne) enzimatske reakcije sam koristio kromogeni TMB supstrat. Intenzitet obojenja koji sam mjerio je bio proporcionalan razini MMP 2. Kako bi razina razrijeđenog ciljnog proteina bila detektibilna, prije početka provođenja pokusa sam morao odrediti koncentraciju ciljnog proteina i odabrati poželjan faktor razrjeđenja. Uzorke sam razrjeđivao pomoću za to predviđenog pufera. Odabrao sam srednju koncentraciju ciljnog proteina koja je iznosila 40-400 ng/mL, a dobio sam ju razrjeđivanjem 1:10 na način da sam dodao 10  $\mu\text{L}$  uzoraka i 90  $\mu\text{L}$  standardnog dilucijskog pufera. Kao standard sam koristio standardnu otopinu koncentracije 40000 pg/mL iz koje sam napravio šest serijskih razrjeđenja koncentracije od 20000 pg/mL do 625 pg/mL (Slika 5.). Kao kontrolu sam koristio 0,1 mL standardnog pufera.



**Slika 5.** Priprema MMP 2 proteinskog standarda. Razrjeđenja sam radio iz šest posebno označenih ependorf tubica vrijednosti od 20000 pg/mL do 625 pg/mL u koje sam dodao 0,3 mL standardnog pufera za ispiranje. U prvu tubu sam dodao 0,3mL iz tube od 40 000 pg/mL i zatim sam temeljito promiješao. Nakon toga sam prenio 0,3 mL iz prve tube u drugu, ponovno promiješao i nastavljao ponavljati postupak. (Preuzeto i prilagođeno od Biospes inc.)

#### **2.2.4.1. Postupak izvođenja ELISA testa za određivanje razine MMP2**

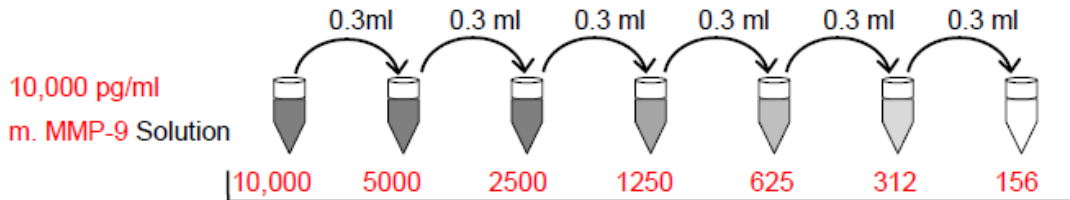
1. Na početku sam odredio i označio jažice za uzorke, kontrolu i supstrat, nakon čega sam dodao 0,1 mL standardne otopine od 20000 pg/mL, 10000 pg/mL, 5000 pg/mL, 2500 pg/mL, 1250 pg/mL i 625 pg/mL u označene jažice za standard i 0,1 mL uzoraka u označene jažice za uzorke, te inkubirao 90 minuta.
2. Po završetku inkubacije, uklonio sam sadržaj pločice i pažljivo, bez dodirivanja stijenke jažica dodao 0,1 mL radne otopine biotin konjugiranih protu mišjih MMP2 protutijela u sve jažice, nakon čega je ponovno slijedila inkubacija prekrivene mikrotitarske pločice 60 minuta na sobnoj temperaturi.
3. Nevezana protu mišja MMP2 protutijela sam dodavanjem pufera tri puta ispirao. Puffer sam pripremio otapanjem 30 mL koncentriranog pufera u 720 mL destilirane vode.
4. Dodao sam 0,1 mL ABC otopine (Avidin-Biotin-Peroksidni kompleks) u svaku jažicu i inkubirao 30 minuta nakon čega sam ponovno ispirao pločicu.
5. Nakon ispiranja sam u svaku jažicu dodao 0,1 mL TMB supstrata. Sadržaj mikrotitarske pločice sam inkubirao u mraku 30 minuta. Prve označene jažice, one sa najvećom koncentracijom MMP2, lagano su se obojile prvo u plavo, a kasnije dodavanjem Stop otopine u žuto.
6. Koristeći mikrotitarski čitač postavljen na 450 nm, unutar 30 minuta od završetka pokusa, odredio sam optičku gustoću svake jažice.

#### **2.2.5. Određivanje razine MMP9**

Za određivanje razine MMP9 sam također koristio komercijalni ELISA kit proizvođača Biospes inc. i uzorke seruma. Test za određivanje razine MMP9 se bazirao na metodi sendvič ELISE, istim principom kao i kod određivanja MMP2. Kako bi razina razrijeđenog ciljnog proteina bila detektibilna, prije početka provođenja pokusa sam morao odrediti koncentraciju ciljnog proteina i odabrati poželjan faktor razrjeđenja. Uzorke sam razrjeđivao pomoću za to predviđenog pufera. Odabrao sam srednju koncentraciju ciljnog proteina koja je iznosila 10-100 ng/mL, a dobio sam ju razrjeđivanjem 1:10 na način da sam dodao 10  $\mu$ L uzoraka u 90  $\mu$ L standardnog dilucijskog pufera. Očitavanja sam provodio mjerenjem apsorbance optičke



gustoće pri 450 nm. Kao standard sam koristio standardnu otopinu koncentracije 10000 pg/mL iz koje sam napravio šest serijskih razrjeđenja koncentracije od 5000 pg/mL do 165 pg/mL (Slika 6.). Kao kontrolu sam koristio 0,1 mL standardnog pufera.



**Slika 6.** Priprema MMP 9 proteinskog standarda. Standard se je pripremao serijskim razrjeđenjem od 5000 pg/mL do 156 pg/mL na način da se je u prvu tubicu dodalo 0,3 mL standardnog pufera za ispiranje iz kojeg se zatim nakon miješana prebacilo 0,3 mL u drugu tubicu nakon koje se nastavio niz. (Preuzeto i prilagođeno od Biospes inc. )

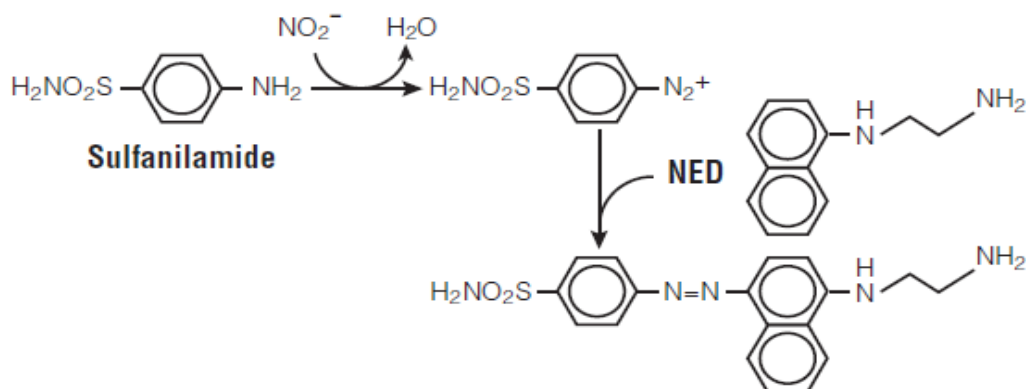
#### 2.2.5.1. Postupak izvođenja ELISA testa za određivanje razine MMP9

1. Na početku sam odredio i označio jažice za uzorke, kontrolu i supstrat, nakon čega sam dodao 0,1 mL standardne otopine od 5000 pg/mL, 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312 pg/mL i 156 pg/mL u označene jažice za standard i 0,1 mL uzoraka u označene jažice za uzorke, te inkubirao 90 minuta.
2. Po završetku inkubacije, uklonio sam sadržaj pločice i pažljivo, bez dodirivanja stijenke jažica dodao 0,1 mL radne otopine biotin konjugiranih protu mišjih MMP9 protutijela u sve jažice, nakon čega je ponovno slijedila inkubacija prekrivene mikrotitarske pločice 60 minuta na sobnoj temperaturi.
3. Nevezana protu mišja MMP9 protutijela sam dodavanjem pufera tri puta ispirao. Pufer sam pripremio otapanjem 30 mL koncentriranog pufera u 720 mL destilirane vode.
4. Dodao sam 0,1mL ABC otopine u svaku jažicu i inkubirao 30 minuta nakon čega sam ponovno ispirao pločicu.
5. Nakon ispiranja sam u svaku jažicu dodao 0,1mL TMB supstrata. Sadržaj mikrotitarske pločice sam inkubirao u mraku 30 minuta. Prve označene jažice, one sa najvećom koncentracijom MMP9, lagano su se obojile prvo u plavo, a kasnije dodavanjem Stop otopine u žuto.

6. Koristeći mikrotitarski čitač postavljen na 450 nm, unutar 30 minuta od završetka pokusa, odredio sam optičku gustoću svake jažice.

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

Griess reakcija se bazira na kemijskoj međureakciji spojeva u kojoj sudjeluju sulfanilamid i N-1-naftiletildiamin dihidroklorin (NED) u kiseloj sredini (Slika 7.). Osmislio ju je Johann Peter Griess 1879. godine. U Griess reakciji, u kiselom mediju, nitrit reagira sa sulfonilnom kiselinom i stvara diazo kation koji se spaja u aromatski amin koji uzrokuje ružičasto obojenje. Razinu  $\text{NO}_2^-$  sam očitavao iz uzoraka nadtaloga makrofaga. Razina detekcije je bila  $2,5 \mu\text{M}$ .



**Slika 7.** Reakcija sulfanilamida i NED-a u kiselom mediju.

Kako bi osigurao točnu kvantifikaciju razine  $\text{NO}_2^-$  bilo je potrebno napraviti standardnu krivulju u kojoj se nitrit koristio kao standard, koristeći isti pufer kao i u samoj eksperimentalnoj radnji. Za nitritnu standardu referentnu krivulju sam označio tri stupca (24 jažice) u mikrotitarskoj pločici veličine 96 jažica u koje sam dodavao  $50 \mu\text{L}$  pufera (u redove od B-H) i  $100 \mu\text{L}$   $100 \text{ mM}$  nitritne otopine u preostale tri jažice pod slovom A. Kako bi osigurao pravilnu konstrukciju nitritne referentne standardne krivulje koncentracije  $100 \mu\text{M}$ ;  $50 \mu\text{M}$ ;  $25 \mu\text{M}$ ;  $12,5 \mu\text{M}$ ;  $6,25 \mu\text{M}$ ;  $3,12 \mu\text{M}$  i  $1,56 \mu\text{M}$  bilo je potrebno napraviti šest serijskih dvostrukih razrjeđenja ( $50 \mu\text{L}$  po jažici) u triplikatima. Nitritnu otopinu nisam dodao u zadnju jažicu pod slovom H ( $0 \mu\text{M}$ ). Krajnji volumen u jažicama je bio  $50 \mu\text{L}$ , a konačna množinska koncentracija tvari je varirala ovisno o razrjeđenju u rasponu od  $0$ - $100 \mu\text{M}$  (Slika 8.)



Jedna jedinica arginaze je predstavljala količinu enzima dovoljnu za konverziju 1,0  $\mu\text{mola}$  L-arginina do ornitina i uree u minuti pri pH od 9,5 i temperaturi od 37 °C. Set je imao detekcijski limit od 0,3 jedinice/L za dvosatnu aktivnost arginaze u mikrotitarskoj pločici. Potrebni stanični lizat sam dobio ispiranjem  $1 \times 10^6$  stanica sa PBS puferom i liziranjem u 100  $\mu\text{L}$  10 mM Tris-HCl otopine 7,4 pH koja se sastojala od 1  $\mu\text{M}$  pepstatina A, 1  $\mu\text{M}$  leupeptina i 0,4 % tritona<sup>®</sup> X-100. Standard uree sam pripremao dodavanjem 50  $\mu\text{L}$  1 mM standardne radne otopine i 50  $\mu\text{L}$  vode u zasebne jažice.

### 2.2.7.1. Radni postupak ELISA testa za određivanje razine arginaze

1. U svaku jažicu uzorka i praznu jažicu sam dodao 10  $\mu\text{L}$  peterostruko razrijeđenog supstratnog pufera kojeg sam dobio miješanjem 8  $\mu\text{L}$  pufera arginina sa 2  $\mu\text{L}$  otopine Mn, nakon čega sam sve inkubirao 2 sata na sobnoj temperaturi.
2. Reagens uree sam pripremio dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  otopine „A“ i otopine „B“ već pripremljene u kitu. Bilo je potrebno 200  $\mu\text{L}$  reagensa za svaku jažicu (jažicu sa standardom uree, vodom, uzorkom i prazne jažice).
3. Za zaustavljanje reakcije prvo sam dodao 200  $\mu\text{L}$  reagensa uree u svaku jažicu, te zatim još 10  $\mu\text{L}$  5 x supstratnog pufera u prazne jažice. Mikrotitarsku pločicu sam zatim inkubirao na sobnoj temperaturi 60 minuta. Aktivnost arginaze sam odredio pomoću sljedeće formule:

$$\text{Aktivnost arginaze} = \frac{A \text{ uzorka} - A \text{ prazne jažice}}{A \text{ standarda} - A \text{ vode}} \times \frac{(1 \text{ mM} \times 50 \times 10^3)}{(V \times T)}$$

T – reakcijsko vrijeme u minutama

V – volumen uzorka u jažici ( $\mu\text{L}$ )

1 mM – koncentracija standarda uree

50 – reakcijski volumen

$10^3$  – konvertijski faktor pretvorbe mM do  $\mu\text{M}$

### 2.2.8. Određivanje razine citokina

Određivanjem razine citokina dobio sam uvid u aktivnost pojedine subpopulacije limfocita, koje svojim djelovanjem usmjeravaju razvoj imunološke reakcije. Razinu sam određivao pomoću Multy-Analyte ELISArray kita za određivanje mišjih Th1, Th2 i Th17 citokina. Koristeći propisani ELISA protokol analizirao sam razinu 12 citokina uključenih u biologiju pomoćničkih CD4+ limfocita. Citokini zastupljeni u ovom testu su sljedeći: Th1 (IL-2, IL-10,

IL-12, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13) i Th17 (IL-6, IL-17a, IL-23, TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ ).

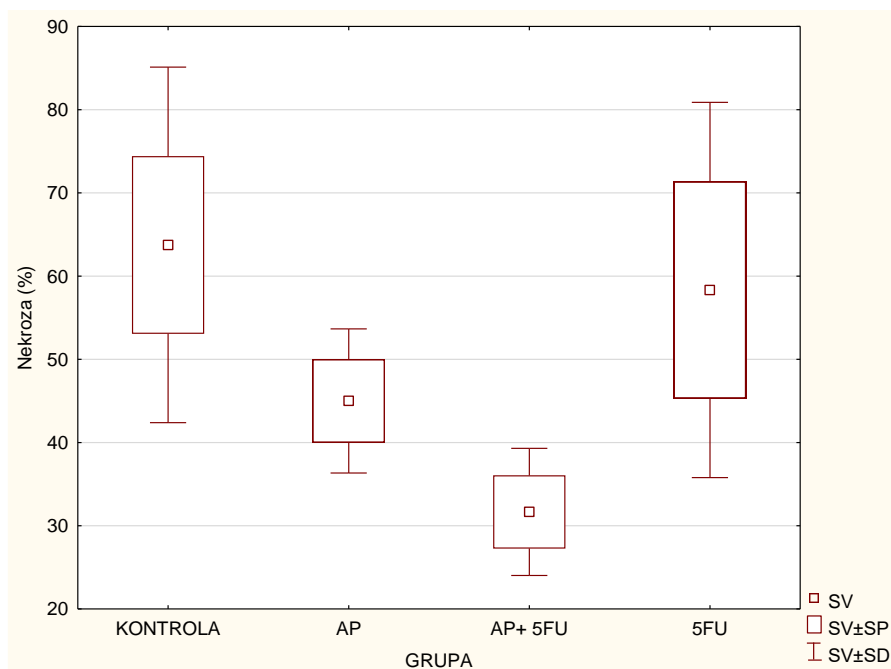
### **2.2.8.1. Radni postupak ELISA testa za određivanje razine citokina**

1. Pipetirao sam 50  $\mu$ L pufera i 50  $\mu$ L uzorka seruma i/ili standarda u svaku jažicu koju sam potom inkubirao 2 sata na sobnoj temperaturi.
2. Nakon inkubacije, dva puta sam ispirao jažice dodavanjem 350  $\mu$ L pufera za ispiranje, nakon čega sam sadržaj jažice dekantirao na filtracijski papir.
3. Pipetirao sam prvo 50  $\mu$ L pufera u svaku jažicu, a zatim dva puta po 50  $\mu$ L detekcijskih protutijela. Sadržaj mikrotitarske pločice inkubirao sam jedan sat na sobnoj temperaturi, nakon čega sam ponovio ispiranje opisano u 2. koraku.
4. Nakon ispiranja sam dodao 100  $\mu$ L otopine Avidin-HRP-a i zatim ponovno inkubirao 30 minuta na sobnoj temperaturi.
5. Dodao sam 100  $\mu$ L razvojne (development) otopine u svaku jažicu. Mikrotitarska pločica se nakon dodavanja otopine inkubirala 15 minuta u mraku nakon čega je uslijedilo dodavanje 100  $\mu$ L stop otopine i pojava žutog obojenja.
6. Očitavanje razine sam provodio unutar 30 minuta od završetka analize, a baziralo se na mjerenju apsorbancije pri 450 nm.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. HISTOLOŠKA ANALIZA KRVNIH ŽILA

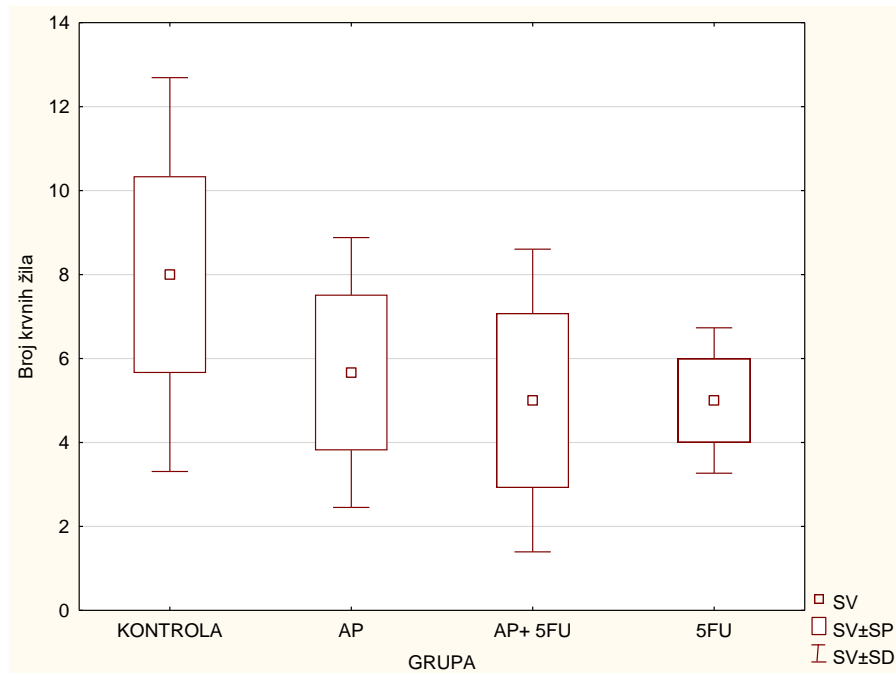
*In vivo* dio istraživanja se temeljio na histološkoj analizi tumora. Analiza je uključivala procjenu postotka nekroze (Slika 9.), brojanje krvnih žila (Slika 10.) i brojenje mitozna (Slika 11.) u svakoj od četiri ispitane grupe. Dobiveni rezultati pokazali su najveći % nekroze u neobrađenoj kontrolnoj skupini, te u skupini obrađenoj 5-FU. Srednja vrijednost nekroze u kontrolnoj skupini je bila 65%, dok je srednja vrijednost nekroze u skupini obrađenoj sa 5-FU bila < 60%. Skupina obrađena pripravkom gljive Agarikon plus pokazala je 45% nekroze. Najbolji rezultati su bili vidljivi u skupini obrađenoj kombinacijom Agarikon plus-a i 5-FU u kojoj je postotak nekroze bio > 30% (Slika 9.); rezultati su statistički značajni u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ ). Najveći broj krvnih žila je bio izbrojen kod skupina sa najvećim postotkom nekroze, pa je tako srednja vrijednost izbrojenih žila kontrolne skupine bila osam. Ostale su skupine pokazivale sličan broj izbrojenih krvnih žila.



**Slika 9.** Postotak tumorske nekroze u svakoj od četiri ispitane grupe kod miša BALB/c miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola *vs* AP+5FU ( $P < 0,05$ )

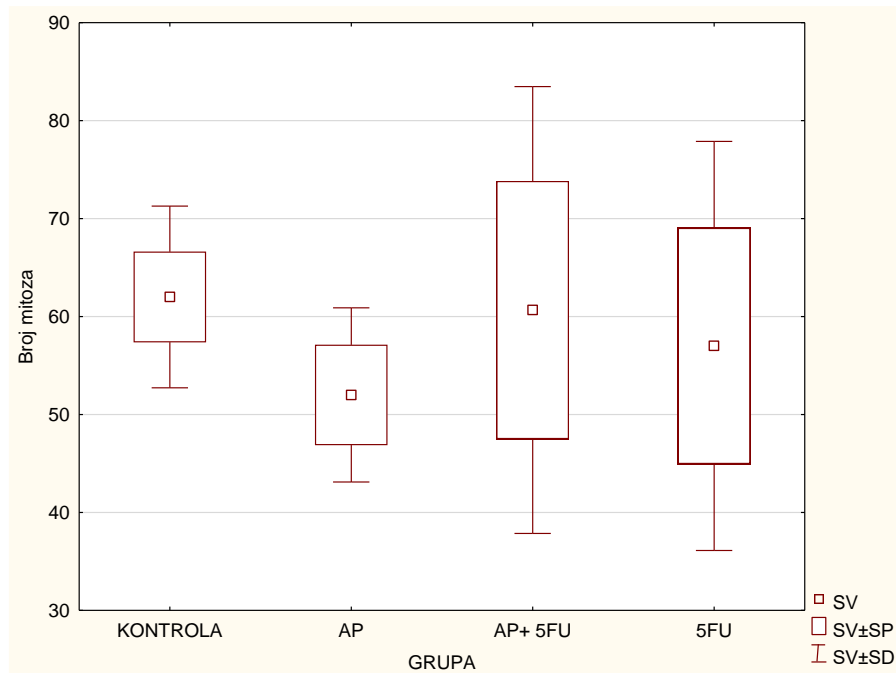
Kratice: CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.



**Slika 10.** Broj krvnih žila u svakoj od četiri ispitane grupe kod miša BALB/c miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Kratice: CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.





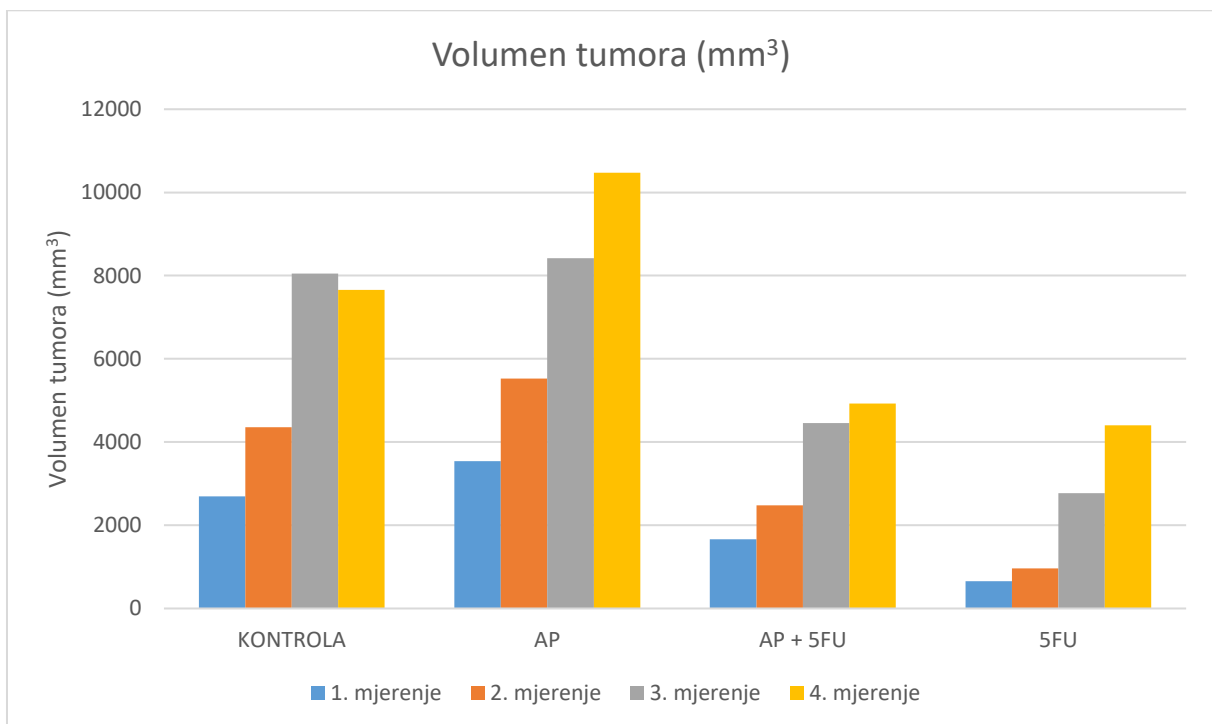
**Slika 11.** Broj mitozna u svakoj od četiri ispitane grupe kod miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Kratice: CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.

### 3.2. VOLUMEN TUMORA

Volumen tumora je praćen nakon injiciranja  $1 \times 10^6$  stanica CT26.WT subkutano u bedreni mišić, te je mjereno kaliperom svakih šest dana nakon pojavnosti tumora u svim skupinama. Rast tumora je praćen mjerenjem širine i duljine kaliperom, a volumen tumora ( $\text{mm}^3$ ) je bio preračunat formulom:  $\text{volumen tumora (mm}^3) = (a \times b^2)/2$ , gdje su a i b predstavljali duljinu i širinu tumora (mm).

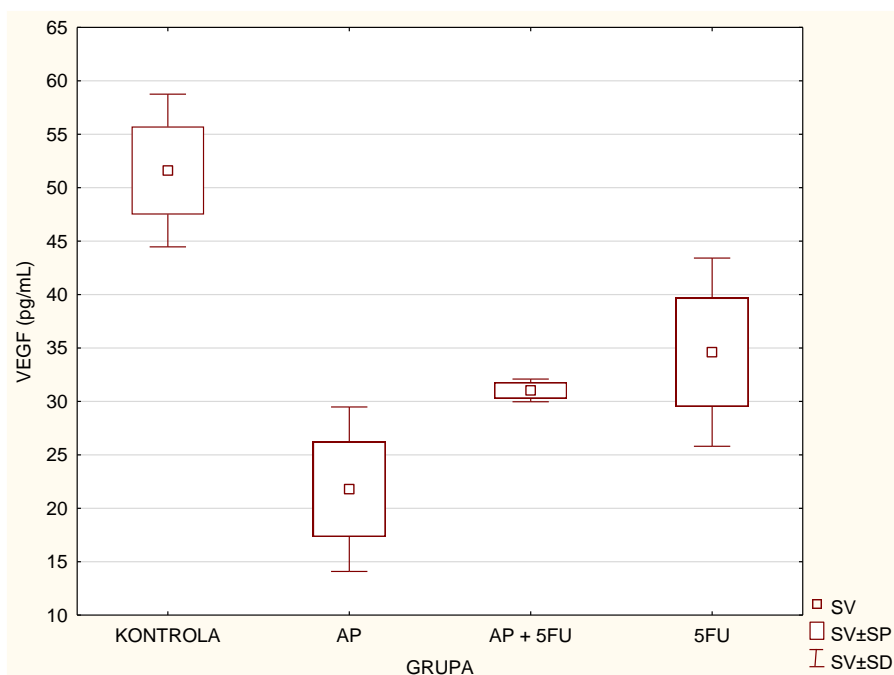
Rezultati (Slika 12.) pokazuju da 5FU ima snažan citotoksični učinak na tumorske stanice; volumen tumora je 2x manji u odnosu na kontrolu i u odnosu na obradu miševa s Agarikon plus. Nešto slabiji učinak u redukciji volumena tumora pokazala je obrada miševa s Agarikon plus + 5FU.



**Slika 12.** Praćenje volumena tumora u miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  CT26.WT (ATCC © CRL – 2638) stanica karcinoma kolona te nakon sedmog dana od unosa CT26.WT stanica obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV.

### 3.3. RAZINA ČIMBENIKA RASTA KRVOŽILJA (VEGF)

VEGF i ostali brojni endogeni i egzogeni faktori imaju ključnu ulogu u angiogenezi i metastaziranju. Iz dobivenih rezultati razine VEGF faktora (Slika 13.) je vidljivo da je najmanja razina dobivena u skupini obrađenoj komercijalnim pripravkom Agarikon plus gdje je iznosila  $> 20$  pg/mL i statistički je značajna u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ ), te u skupini obrađenoj kombinacijom Agarikona i 5-FU gdje je iznosila  $\geq 30$  pg/mL. Daleko najviša razina bila je zabilježena u kontrolnoj skupini gdje je dobivena razina  $> 50$  pg/mL.



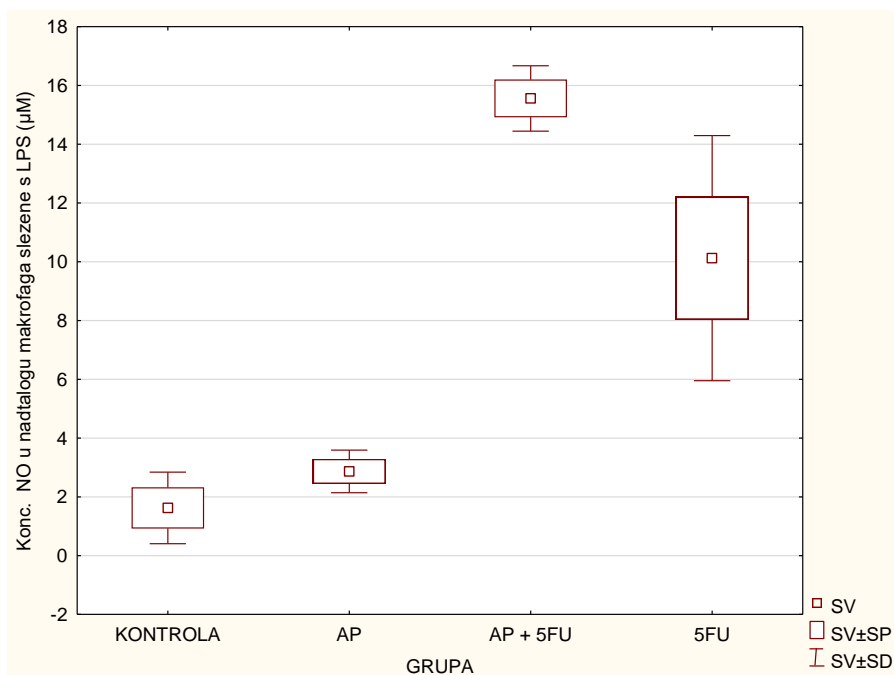
**Slika 13.** Razina VEGF čimbenika u miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola *vs* AP ( $P < 0,05$ )

Kratice: VEGF - čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*), CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.

### 3.4. RAZINA DUŠIK OKSIDA (NO)

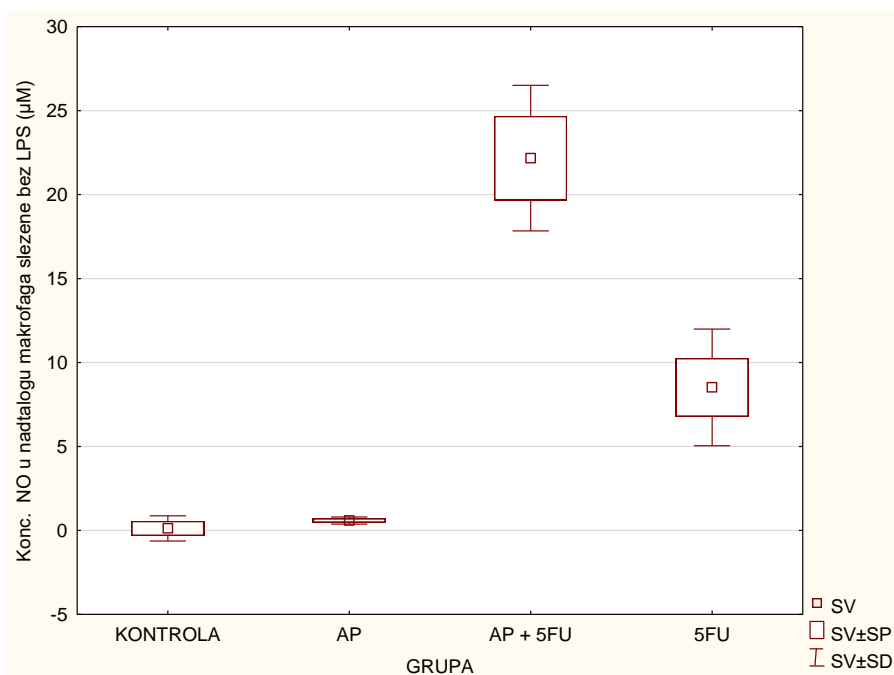
Učinak NO-a, ovisno o koncentraciji može biti višestruk. Dobivena razina NO-a iz nadtaloga makrofaga slezene uz prisutnost lipopolisaharida (LPS) je pokazala najmanju koncentraciju od 2  $\mu\text{M}$  u kontrolnoj skupini (Slika 14.). Koncentracija NO-a u skupini obrađenoj pripravkom Agarikon plus je bila  $\geq 3 \mu\text{M}$ . Najveća razina NO-a je izmjerena u nadtalogu makrofaga slezene u skupini obrađenoj kombinacijom pripravka Agarikon plus i 5-FU u odnosu na kontrolu ( $P < 0,001$ ); koncentracija je bila znatno viša od  $> 15 \mu\text{M}$  (Slika 14.) Obrada miševa s 5FU je također statistički značajno ( $P < 0,001$ ) povećala razinu NO-a u makrofagima slezene u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija NO-a iz nadtaloga makrofaga bez LPS-a se najviše razlikovala u skupini obrađenoj kombinacijom Agarikona i 5-FU gdje je bila statistički značajno ( $P < 0,001$ ) viša u odnosu na kontrolu i iznosila je  $> 20 \mu\text{M}$ . U kontrolnoj skupini, razina NO-a nije bila dobivena, a skupini obrađenoj Agarikon plusom je bila manja od iste skupine sa dodatkom LPS-a, te je iznosila  $> 0 \mu\text{M}$  (Slika 15.). Skupina obrađena 5-FU sa ili bez LPS-a je pokazivala slične koncentracije, oko  $10 \mu\text{M}$  sa statičkom značajnošću ( $P < 0,001$ ) u odnosu na kontrolu.



**Slika 14.** Koncentracija NO-a u nadtalogu stimuliranih makrofaga slezene (s LPS-om) u miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs AP + 5FU ( $P < 0,001$ ); Kontrola vs 5FU ( $P < 0,001$ ); AP vs AP + 5FU ( $P < 0,05$ )

Kratice: NO - dušikov oksid, LPS – lipopolisaharid, CT26.WT- stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.



**Slika 15.** Koncentracija NO-a u nadtalogu nestimuliranih makrofaga slezene (bez LPS-a) u miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV ± SD (SP).

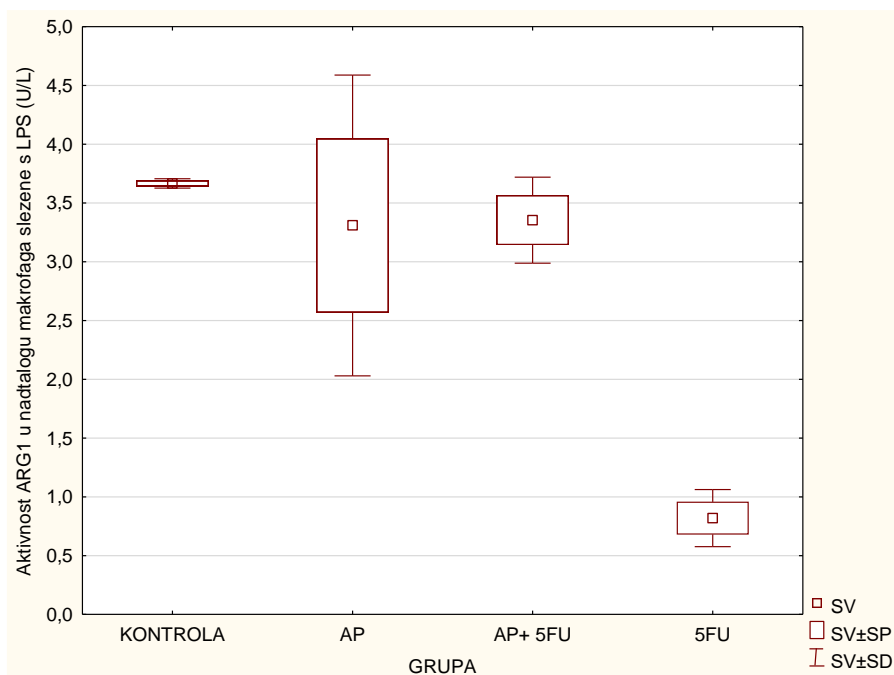
Statistički značajno različito: Kontrola *vs* AP + 5FU ( $P < 0,001$ ); Kontrola *vs* 5FU ( $P < 0,001$ ); AP *vs* AP + 5FU ( $P < 0,001$ ); AP *vs* 5FU ( $P < 0,001$ )

Kratice: NO - dušikov oksid, LPS – lipopolisaharid, CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.

### 3.5. RAZINA ARGINAZE 1

Arginaza 1 (engl. *L-arginine amidinohydrolase*, L-arginin amidinohidrolaza) je enzim koji sudjeluje u posljednjoj reakciji metaboličkog ciklusa uree gdje katalizira pretvorbu aminokiseline L-arginina u L-ornitin i ureu ( $L\text{-arginin} + H_2O \rightleftharpoons L\text{-ornitin} + \text{urea}$ ). Proizvodnja arginaze 1 pomoću zrelih mijeloidnih stanica u tumorskom mikrookolišu može biti centralni mehanizam za invaziju i rast tumora i može predstavljati cilj za nove terapije. Točnije, M2 makrofagi su karakteristični po visokoj ekspresiji arginaze-1 (Arg-1), citosolnog enzima koji katalizira alternativni metabolički put L-arginina u ornitin i poliamine, koji su prekursori u sintezi kolagena i stanične proliferacije.

Arginaza se poput NO-a također mjerila iz nadtaloga makrofaga uz ili bez dodatak LPS-a. Rezultati pokazuju kako je razina arginaze 1 uz dodatak LPS-a bila gotovo jednaka u kontrolnoj skupini, u skupini obrađenoj Agarikon plusom, te u skupini sa primjenom kombinacije Agarikona i 5-FU, a iznosila je oko 3,5 U/L. Razina arginaze 1 u skupini obrađenoj sa 5-FU je bila znatno manja, a iznosila je < 1 U/L (Slika 16.). Statistički značajna razlika u razini arginaze 1 u nadtalogu makrofaga slezene s LPS-om postoji između kontrolne skupine i 5FU ( $P < 0,05$ ) te između AP i 5FU ( $P < 0,05$ ). Razina arginaze 1 bez dodavanja LPS-a je proporcionalno padala na način da je bila najviša u kontrolnoj skupini, gdje je bila veća od arginaze mjerene uz dodatak LPS-a i iznosila je 5 U/L, a najmanja u skupini obrađenoj 5-FU gdje je iznosila 2,5 U/L. Razina u skupini obrađenoj Agarikon plusom je bila < 4 U/L, a u skupini obrađenoj kombinacijom Agarikon plusa i 5-FU  $\geq 3$  U/L (Slika 17.). Iz dobivenih rezultata je vidljivo da postoji statistički značajna razlika u razini arginaze 1 u nadtalogu makrofaga slezene bez LPS-a između kontrolne skupine i skupine AP + 5FU ( $P < 0,01$ ) te između kontrolne skupine i 5FU ( $P < 0,01$ ).

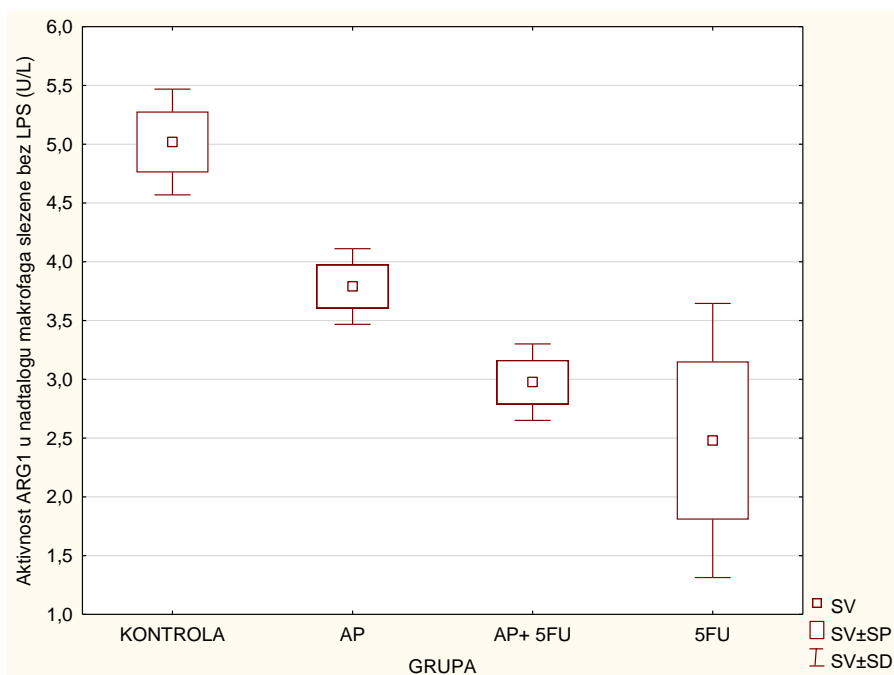


**Slika 16.** Aktivnost arginaze 1 u nadtalogu stimuliranih makrofaga slezene (s LPS-om) u miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs 5FU ( $P < 0,05$ ); AP vs 5FU ( $P < 0,05$ )

Kratice: ARG1 – arginaza 1, LPS – lipopolisaharid, CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.



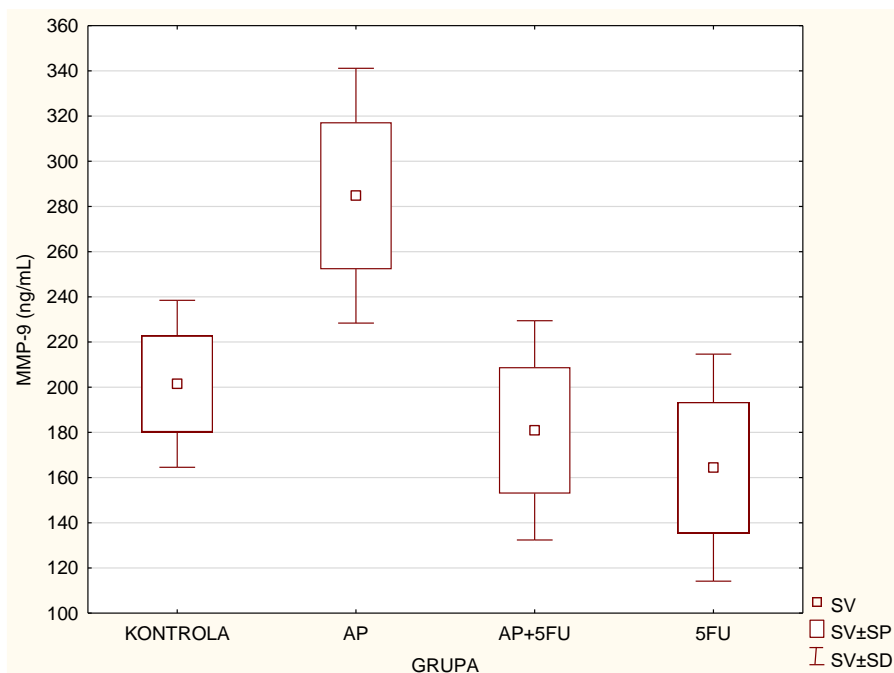


**Slika 17.** Aktivnost arginaze 1 u nadtalogu nestimuliranih makrofaga slezene (bez LPS-a) u miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs AP + 5FU ( $P < 0,01$ ); Kontrola vs 5FU ( $P < 0,01$ ) Kratice: ARG1 – arginaza 1, LPS – lipopolisaharid, CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.

### 3.6. RAZINA MMP 2 i 9

Dobiveni rezultati pokazuju najveću razinu MMP9 u skupini obrađenoj s pripravkom Agarikon plus gdje iznosi > 280 ng/mL. U ostalim ispitanim grupama, razina MMP9 nije varirala previše, te je dosegla najveću razinu u kontrolnoj skupini gdje je iznosila  $\geq 200$  ng/mL. Najmanja izmjerena razina je bila u skupini obrađenoj sa 5-FU gdje je iznosila > 160 ng/mL (Slika 18.). Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u razini MMP9 između skupine obrađene s AP i 5FU ( $P < 0,05$ ).

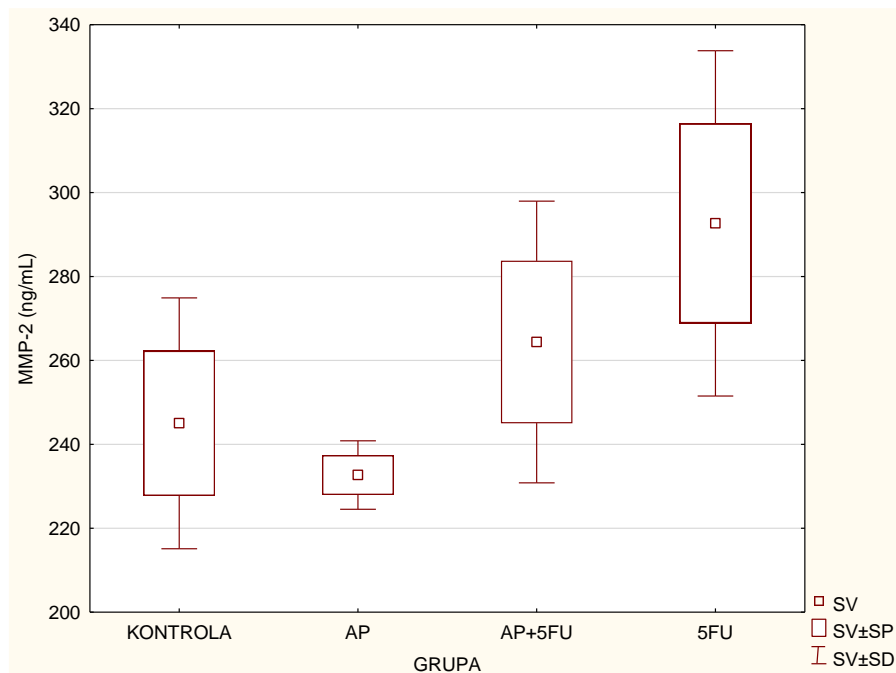


**Slika 18.** Razina MMP 9 u serumu miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Statistički značajno različito: AP vs 5FU ( $P < 0,05$ )

Kratice: MMP 9 - matriksmetaloproteinaza 9, CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.

Razina MMP2 je bila suprotna od razine MMP9 što je ukazivalo na drugačiju aktivnost i specifičnost djelovanja. Najveća izmjerena razina je bila u skupini obrađenoj sa 5-FU gdje je iznosila  $> 290$  ng/mL. Najmanja dobivena razina je bila u skupini obrađenoj Agarikon plusom, a iznosila je  $\geq 230$  ng/mL. Razina MMP2 se nije previše razlikovala u kontrolnoj skupini gdje je iznosila  $> 240$  ng/mL i u skupini obrađenoj s kombinacijom Agarikon plus i 5-FU  $> 260$  ng/mL (Slika 19.). Između pojedinih skupina nije bilo statistički značajnih razlika.

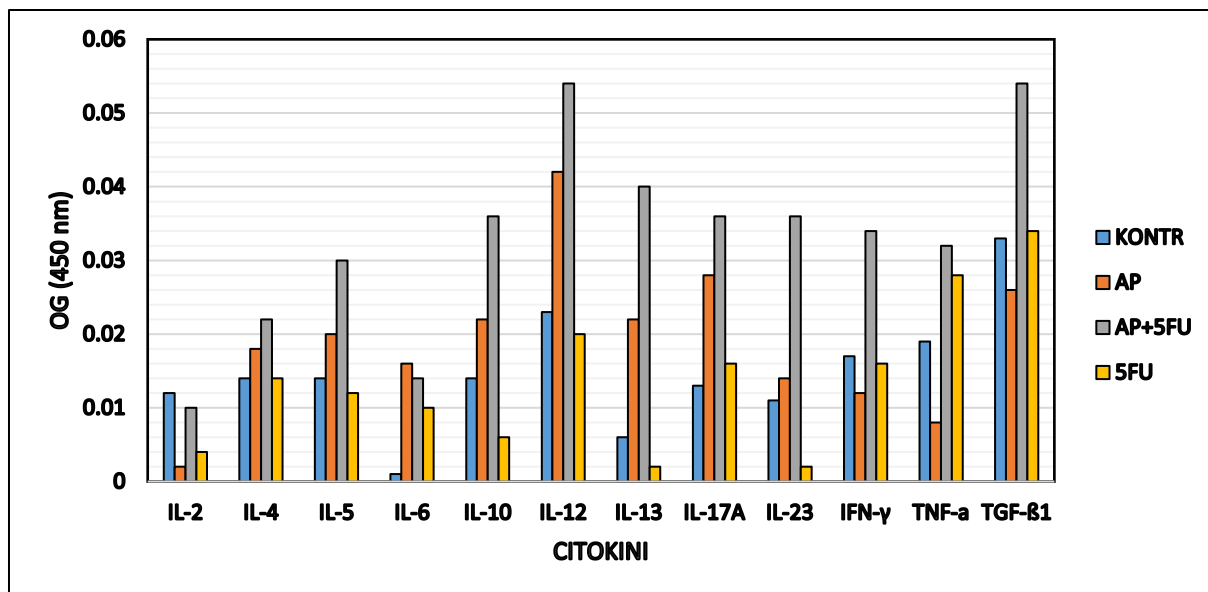


**Slika 19.** Razina MMP 2 u serumu miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Kratice: MMP 2 - matriksmetaloproteinaza 2, Kratice: CT26.WT- stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.

### 3.7. RAZINA CITOKINA

Analizirajući rezultate dobili smo uvid u vrstu imunološkog odgovora, te u aktivnosti pojedine subpopulacije pomoćničkih limfocita koji su jasno povezani s polarizacijom makrofaga. Rezultati sugeriraju kako je serumska razina IL-2 bila najmanja i iznosila je ovisno o skupini između 0,004 i 0,12 (Slika 20.). Najveća izmjerena razina je bila razina IL-12 i TGF- $\beta$  koji imaju važnu ulogu u razvoju upale i stanične imunosti. U skupini obrađenoj komercijalnim pripravkom Agarikon plusa došlo je do najveće produkcije citokina IL-12, TGF- $\beta$  i IL-17 $\alpha$ . Skupina obrađena kemoterapeutikom 5-FU je imala najviše razine citokin TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  i IL-12. Skupina obrađena kombinacijom Agarikon plusa i 5-FU je pokazala najveći citokinski odgovor, te najveću razinu gotovo svih citokina, među kojima su se najviše isticali IL-12, TGF- $\beta$  i IL-13 (Slika 20.).



**Slika 20.** Razina citokina u serumu miša BALB/c nositelja karcinoma kolona. Miševi (N=10 po skupini) su injicirani subkutano s  $1 \times 10^6$  stanica karcinoma kolona CT26.WT (ATCC © CRL – 2638), te nakon sedmog dana od unosa stanica CT26.WT obrađeni *ig* s Agarikon plus u dozi od 10 400 mg/kg tijekom četrnaest dana, sa ili bez kemoterapeutika 5-Fluorouracila *ip* u dozi od 30 mg/kg 1.-4. dana te 15 mg/kg 6., 8., 10. i 12. dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $SV \pm SD$  (SP).

Kratice: CT26.WT - stanična linija karcinoma kolona, AP - Agarikon plus, AP + 5-FU - Agarikon plus + 5-Fluorouracil, 5-FU - 5-Fluorouracil, IL-2 - interleukin 2, IL-4 - interleukin 4, IL-5 - interleukin 5, IL-6 - interleukin 6, IL-10 - interleukin 10, IL-12 - interleukin 12, IL-13 - interleukin 13, IL-17A - interleukin 17A, IL-23 - interleukin 23, IFN- $\gamma$  - interferon gama, TGF- $\beta$ 1 - transformacijski čimbenik rasta  $\beta$ 1 (engl. *Transforming growth factor  $\beta$ 1*), SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija.

#### 4. RASPRAVA

Pomoćnički CD4<sup>+</sup> limfociti su glavne imunološke stanice koje reguliraju imunološki odgovor. Nakon aktivacije, imaju sposobnost proliferacije u jednu od tri subpopulacije limfocita (Th1, Th2 i Th17). Prepoznavanje tih limfocita ovisi o aktivnosti transkripcijskih faktora, te o lučenju citokina. Kako bi se osigurao usmjereni imunosni odgovor, aktivnost jedne skupine citokina inhibira djelovanje druge skupine. Limfociti Th1 prvenstveno luče IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$  čime aktiviraju makrofage, NK stanice, te citotoksične CD8<sup>+</sup> limfocite i potiču stanični imunosni odgovor. Glavni diferencijacijski citokini koji potiču Th1 imunosni odgovor su IL-12, IL-18, IL-27. Th2 limfociti izlučuju IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13 čime stimuliraju diferencijaciju B-limfocita i lučenje protutijela. IL-4 je ključni citokin koji potiče usmjeravanje Th0 u Th2 imunosni odgovor. Limfociti Th-17 su glavne regulacijske stanice koje izlučuju citokine IL-17, IL-6, IL-8 IL-22 i IL26 čime potiču aktivnost granulocita i razvoj upale. Diferencijacijski citokini koji dovode do preusmjeravanja i nastanka Th17 imunosnog odgovora su TGF- $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23 (Andreis i sur., 2010).

Makrofazi predstavljaju najvažnije stanice nespecifične, urođene imunosti koje imaju ključnu ulogu u mehanizmima popravka, remodeliranja tkiva i fagocitozi (Panni i sur., 2013). Mehanizam fagocitoze ispunjavaju pomoću svojih receptora kojima prepoznaju strane patogene ili vlastite promijenjene stanice. Makrofagni *Toll-like* receptori (TLR) su glavni receptori nespecifične imunosti koji ovisno o vrsti prepoznaju različite organske molekule patogena. TLR-2 prepoznaju lipoglikane, TLR-4 lipopolisaharide, TLR-5 flagelin, dok TLR-9 prepoznaje nemetilirane bakterijske CpG otočiće (Lull i sur., 2004). Glavna značajka koja krasi makrofage je njihova velika heterogenost i plastičnost mijenjanja fenotipa i funkcije ovisno o različitim okolišnim signalima. Tumorski se mikrookoliš sastoji od različite populacije malignih i nemalignih stanica u koje se ubrajaju stromalne stanice i infiltrirani makrofazi. Glavna značajka TAM-a je uspostaviti normalnu funkciju oštećenih stanica. Tumorske stanice, lučenjem citokina i kemokina (CSF1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 VEGF, SDF...) privlače monocite i makrofage. U tumorskom mikrookolišu, svojstvo TAM-a se mijenja što rezultira povećanom tumorskom progresijom, imunosupresijom i rezistencijom. Makrofagna heterogenost se najbolje opisuje polarizacijom prema kojoj postoje protutumorski makrofazi M1 (u tumoru prisutni u manjem broju), te protumorski makrofazi M2. Makrofazi M1 najčešće luče proupalne IL-1, IL-2, IL-6 i IL-12, iNOS, citokine i molekule čime se potiče citotoksični T CD8<sup>+</sup> stanični odgovor. Protumorski makrofazi M2 luče veliki broj tumor-stimulacijskih citokina i molekula poput IL-4, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-13, VEGF-a, arginaze, MMP i katepsina čime doprinose razvoju

hipoksije i rastu tumora. Makrofazi M2 pokazuju veću ekspresiju manoznih i galaktoznih receptora, a manju razinu kostimulacijskih CD80 i CD86 molekula, te imaju promijenjen metabolizam koji je se bazira na ornitinu i poliaminima (Panni i sur., 2013).

Analizom rezultata razine citokina (Slika 20.) vidljivo je da je najveći citokinski odgovor postignut u skupinama obrađenim pripravkom Agarikon plus, te kombinacijom Agarikon plus i 5-FU, te su u istim skupinama potvrđena značajna protutumorska svojstva makrofaga (Slika 12.); točnije spriječena je polarizacija makrofaga iz M1 u M2 (Slike 14, 15, 16, i 17) . Citokini imaju svojstva pleotropizma i redundancije što im omogućuje djelovanje na više vrsta stanica. Najveća izmjerena razina je bila razina IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ . IL-12 djeluje kao glavni medijator i aktivator stanica urođene imunosti. Djeluje na NK stanice čime potiče proizvodnju IFN- $\gamma$  koji ima snažnu antiproliferativnu i aktivacijsku ulogu (stimulira NK stanice i makrofage). TNF- $\alpha$  ima snažno proupalno djelovanje. Uzrokuje povećanje adhezijskih i MHC-II molekula na endotelu krvnih žila čime se omogućuje snažnije prijanjanje i ekstravazacija neutrofila i monocita, te uspješnu regresiju zloćudnih tumora (Andreis i sur., 2010). TGF- $\beta$  ima dvojaku ulogu u razvoju tumora. Signalizacijom se preko transmembranskog receptora aktivacijom serin-treonin kinaze može potaknuti supresorski ili onkogeni signalni put. Tumorske stanice, mutacijom i inaktivacijom pojedinih sastavnica signalnog puta mogu potisnuti snažna antiproliferativna svojstva spomenutog citokina. Pošto je određena razina bila visoka u skupini obrađenoj kombinacijom Agarikon plusa i 5-FU može se zaključiti kako je TGF- $\beta$  imao antiproliferativna svojstva (de Caestecker i sur., 2000). IL-10 predstavlja ključan citokin za protutumorsku obranu. Naime, Dennis i sur. (2013) su dokazali kako je IL-10 važan za normalnu funkciju pomoćničkih CD4+ limfocita, za nadzor imunosti reakcije posredovane CD4+ limfocitima, te za supresiju tumorom posredovane upale. Međureakcijom makrofaga M2 i tumorskih stanica dolazi do razvoja epitelno-mezenhimalne tranzicije, čime se epitelnim stanicama omogućuje odvajanje i migracija (Panni i sur., 2013). Razvojem i napretkom tumora, epitelne stanice se transformiraju u mezenhimalne. Nakon ulaska, spomenute transformirane stanice u cirkulaciji, djelovanjem NO-a, izražavaju nove adhezijske molekule (E-kadherin) pomoću kojih zahvaćaju nova, udaljena mjesta (Vahora i sur., 2016).

Remodeliranje izvanstaničnog matriksa je ključno za razvoj, invazivnost i metastaziranje malignih tumora. Matriks metaloproteinaze (MMP) predstavljaju skupinu cink ovisnih endopeptidaza koje imaju sposobnost razaranja svih komponenti izvanstaničnog matriksa. Gelatinaza A veličine 72kDa (MMP2), te Gelatinaza B veličine 92 kDa (MMP9), sadrže u katalitičkoj domeni tri ponavljanja 58 aminokiselinskih ostataka poput fibronektin tipa II i

predstavljaju kolagenaze tipa IV. Glavna uloga gelatinaza je razaranje bazalne membrane čime se uzrokuje razaranje membranskih komponenti i dovodi do tumorske invazivnosti i tkivne infiltracije T – limfocita (Mannello i sur., 2012).

Smanjena razina MMP 2 i MMP 9 daje bolje prognostičke rezultate, te smanjenu invazivnost i metastaziranje. Iako MMP9 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 Kahari, 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). Dobiveni rezultati razine MMP 9 (Slika 18.) sugeriraju kako je najveći rast aktivnosti bio u skupini obrađenoj s pripravkom Agarikon plus gdje je izmjerena razina bila > 280 ng/mL, što odgovara i pojačanom rastu tumora (Slika 12.). Međutim, ista skupina pokazuje smanjen broj mitozna, krvožilja, te VEGF čimbenika što možemo objasniti i povećanom produkcijom anti-angiogenetskih faktora koji doprinose smanjenju tumorske agresivnosti i metastaza.

Osim dvojake uloge pojedinih MMP, 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 Kahari, 2013).

Pojava hipoksije je jedna od najvažnijih značajki zloćudnih tumora. Nekroza predstavlja morfološki biljeg hipoksije, a uzrokuje povećanu proliferaciju, vaskularnu aktivaciju, smanjenu vaskularnu maturaciju i metastaziranje tumorskog čvora. Također, utječe na gustoću novonastalog krvožilja i infiltraciju makrofaga (Brethold i sur., 2015). Analizirajući spomenute rezultate o postotku nekroze dobivao se uvid u agresivnost tumora, sposobnost metastaziranja,



te prognostičku sliku. Iz rezultata je bilo vidljivo kako aktivni spojevi iz komercijalnog pripravka Agarikon plus poput lektina,  $\beta$ -glukana, ergosterola, arginina i ostalih spojeva imaju protutumorska, imunomodulacijska i antiangiogenetska svojstva. Skupine koje su bile obrađene pripravkom Agarikon plus i kombinacijom Agarikon plus i 5-FU u odnosu na kontrolnu skupinu pokazuju 20%, tj. 30% redukciju u stupnju nekroze (Slika 9). Patel i sur. (2012) potvrđuju kako  $\beta$ -glikan iz ljekovitih gljiva stimulira aktivnost glutathion S-transferaze čime smanjuje mutageni potencijal i potiče aktivnost kaspaze, a samim time i apoptozu. Mitotske abnormalnosti su normalno prisutne i ključne su za nastanak i napredak tumora. Aktivnost brojnih gena uzrokuje narušavanje normalnog mitotskog ciklusa u kojem dolazi do prolongacije pojedinih faza ciklusa. Dobiveni rezultati su sugerirali kako je skupina obrađena pripravkom Agarikon plus pokazivala najveće smanjenje u broju mitozna (Slika 11). Protein vezajući polisaharidi iz medicinskih gljiva uzrokuje narušavanje G2/M faze staničnog ciklusa, te potiču stimulaciju apoptoze (Patel i sur., 2012).

Rast tumora i razvoj metastaza ovisi o angiogenezi i limfangiogenezi posredovanoj različitim kemijskim signalima iz tumorskih stanica. Dokazano je kako tumorske stanice, bez odgovarajuće angiogeneze i neovaskularizacije postaju nekrotične i apoptotične. Neovaskularizacija predstavlja proces koji se odvija u četiri koraka. U prvom koraku dolazi do lokalnog oštećenja bazalne membrane, prilikom čega dolazi do hipoksije i uništenja membrane. Nakon oštećenja membrane, djelovanjem angiogenetskih faktora dolazi do endotelne aktivacije i migracije. Proliferacijom endotelnih stanica stvara se jaka osnova za razvoj metastaza, koja se kasnije i nastavlja djelovanjem ostalih angiogenetskih čimbenika. Brojni stimulacijski i inhibicijski angiogeni čimbenici koji održavaju optimalnu razinu kisika i nutrijenata u tumorskom čvoru i okolnom tkivu prikazani su u Tablici 1 (Nishida i sur., 2006).

Otkriveni su brojni endogeni angiogeni faktori (Tablica 1.) od kojih su najvažniji VEGF (engl. *Vascular endothelial growth factor*), bFGF (enlg. *basic Fibroblast growth factor*), angiogenin, TGF- $\alpha$  i  $\beta$  (engl. *Transforming growth factor  $\alpha, \beta$* ), TNF- $\alpha$  (engl. *Transforming growth factor  $\alpha$* ), G-CSF (engl. *Granulocyte – colony stimulation factor*), interleukin 8, epidermalni i hepatocitni faktor rasta. Najveća pažnja istraživanja procesa neovaskularizacije je usmjeren na VEGF faktor koji ima ključnu ulogu u normalnoj fiziologiji, ali i patofiziologiji angiogeneze. Njegovim se vezanjem za VEGF receptor stvara signal koji se prenosi do jezgre endotelnih stanica gdje se aktiviraju grupe gena nužne za rast. Najvažniji produkti su već spomenute MMP koje režu izvanstanični matriks sačinjen od guste mreže proteina i ugljikohidrata. Njegovim razaranjem je omogućena migracija, proliferacija, reorganizacija i razvoj endotelnih stanica u

složenu mrežu novih žila koje svoju punu funkciju ostvaruju pomoću adhezijskih molekula poput integrina. Angiotenzinom 1 i 2, te njegovim Tie-2 receptorom se ostvaruje stabilnost nastalog krvožilja. Obitelji VEGF faktora se sastoji od VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E čimbenika koji potiču formaciju i proliferaciju novih krvnih žila, te od VEGF-C i VEGF-D zaduženih za formaciju i proliferaciju limfnih žila. VEGF-A se nalazi na položaju 6q21.3, snažan je mitogen i ključan je za permeabilnost, tj. propusnost membrane. VEGF-B je ovisno o RNA-izrezivanju prisutan u dvije izoforme. Iako njegova funkcija i dalje nije u potpunosti razjašnjena smatra se kako je ključan za razvoj srčanih krvnih žila. Faktori VEGF-C i VEGF-D dijele sličan aminokiselinski slijed (gotovo 61% identičan) i funkciju. Naime, poznato je kako ovi spomenuti faktori djelujući na isti VEGFR-3 receptor reguliraju limfogenezu, te embrionalnu angiogenezu (Nishida i sur., 2006). Prekomjerna regulacija samih stimulacijskih faktora nije dovoljna za inicijaciju i progresiju angiogeneze, već je nužna i smanjena regulacija inhibicijskih čimbenika (Tablica 1). Postoji nekoliko angiogenetskih inhibitornih proteina poput angiostatina, endostatina, interferona, trombospondina, prolaktina, te tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza (Tablica 1). Angiostatin je građen od jednog ili više fragmenata plazminogena, i ima važnu ulogu u indukciji apoptoze tumorskih i endotelnih stanica, kao i u inhibiciji migracije. Istraživanja koja su proveli Kirsch i suradnici 1998. godine ukazuju na rezultate prema kojima je kod tumora obrađenih angiostatinom utvrđena smanjena aktivnost i ekspresija VEGF-a i VEGFR-a. Endostatin, C-terminalni fragment kolagena XVIII ima sposobnost vezanja za integrine i na taj način smanjenja endotelne adsorpcije. Pro-angiogenetski čimbenici imaju ključnu ulogu u razvoju tumora i preživljenju pacijenata. Brojna istraživanja (Andre i sur., 2000; George i sur., 2000; Kurebayashi i sur., 2000) su dokazala kako povećana ekspresija faktora VEGF utječe na lošije prognostičke ishode i preživljenje pacijenata koji boluju od adenokarcinoma, karcinoma dojki, kolorektalnog karcinoma i karcinoma pluća. Također, neovaskularizacija smanjuje učinkovitost djelovanja kemoterapeutika (Nishida i sur., 2006). Dobiveni su rezultati sugerirali značajan pad razine faktora VEGF od 30 pg/mL i 20 pg/mL u skupinama obrađenim pripravkom Agarikon plus i kombinacijom Agarikon plus i 5-FU (Slika 13.). Rita i sur. (2011) su u svom istraživanju dokazali kako ergosterol iz medicinskih gljiva smanjuje angiogenezu i neovaskularizaciju kod miševa oboljelih od sarkoma i tumora pluća.

Dušični oksid je mala, relativno nestabilna lipofilna molekula kratkog životnog vijeka koja ima ključnu ulogu u prijenosu plinova. Zbog svog vazodilatacijskog, protuupalnog, antitrombotskog i neurotransmiterskog djelovanja, smatra se važnim faktorom normalne

fiziologije tijela. U regularnim uvjetima nastaje iz tri izoforme dušik oksid sintetaze (NOS). Neurološka i gastrična NOS, za razliku od inducibilne NOS (iNOS) čine konstitutivnu skupinu NOS-a (cNOS), ovisnu o koncentraciji kalcijevih iona koja sintetizira kratkoživući NO manje koncentracije (koncentracija u nanomolima). Inducibilna NOS, neovisna o kalcijevim ionima sintetizira NO koji traje danima u mikromolarnoj koncentraciji. NOS je u prirodi prisutna kao dimer sastavljen od N-terminalne oksigenacijske i C-terminalne redukcijske domene. Supstrati vezani za N-terminalni kraj su: kisik, 5,6,7,8 tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) i L-arginin, dok su supstrati vezani za C kraj: NADPH, flavin mononukleotid, te flavin adenin dinukleotid. Sinteza NO-a se odvija u dva koraka. U prvom koraku djelovanjem NOS-a dolazi do hidroksilacije L-arginina u N-hidroksi-L arginin (NOHA) koji se zatim u drugom koraku oksidira u L-citrulin i NO (Vahora i sur. 2016). Metabolizam iNOS je dakle usko povezan sa razinom L-arginina koji je aktiviranim makrofazima potreban za sintezu NO-a i reaktivnih dušikovih spojeva. Arginaza hidroksilira L-arginin čime nastaje L-ornitin i urea (Munder, 2009). Mehanizam funkcioniranja NO-a je dvostran, i dijeli se na funkcije vezane uz ciklički gvanozin monofosfat (cGMP) i djelovanje neovisno o cGMP-u. Kod djelovanja baziranog na cGMP-u NO se veže za topive hem gvanilil ciklaze što izaziva spajanje cGMP ovisne protein kinaze G, fosfodiesteraze što uzrokuje otvaranje kanala ovisnog o cikličkim nukleotidima. U stanjima kod kojih cGMP nije dostupan, djelovanje se vrši: a) vezanjem za proteine koji sadrže metal, b) vezanjem za proteine koji ne sadrže NO grupu, c) posttranslacijskom modifikacijom modulacije stanične signalizacije S-nitrozilacijom (Vahora sur., 2016).

NO ima važnu ulogu u razvoju i progresiji tumora, ali također djelujući kao terapijski spoj i u liječenju tumora. U stanjima niže i srednje koncentracije NO-a potiču se procesi angiogeneze, metastaziranja, veće invazivnosti i antiapoptoze. Pri višim koncentracijama, stvaranjem peroksinitrita postaje citotoksičan za tumorske stanice i potiče apoptozu (Fukumura i sur., 2006)

Jedan od glavnih uzročnika tumorske progresije su kronične upale i infekcije. Akutna upala nastaje kroz zaštitni učinak tijela na djelovanje određenih patogenih ili kemijskih spojeva s ciljem uklanjanja patogenog izvora i uspostavljanja normalne homeostaze organizma. Kronična upala aktivira stanični odgovor što rezultira inicijacijom karcinogeneze (Landskron i sur., 2014). Zahvaćene epitelne i upalne stanice luče različite proupalne citokine (IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ) i spojeve (NO i arginazu) koji doprinose nastanku slobodnih kisikovih i dušikovih radikala. Slobodni kisikovi radikali svojim spojevima 8-okso-7,8 dihidro-2 deoksigvanozin (8-oxo-dG) i 8-nitrogvaninom izazivaju direktno oštećenje DNA molekule. Citokini svojim djelovanjem mijenjaju tumorski mikrookoliš u kojem dolazi do inhibicije apoptoze i indukcije upale što

pogoduje tumorskom rastu. Proupalni IL-6 se vežući za svoj IL-6R $\alpha$  receptor i glikoproteinski (gp 130) koreceptor aktivira JAK/STAT signalni put, uzrokuje hipermetilaciju tumor supresor gena i hipometilaciju protoonkogenata što rezultira povećanom proliferacijom i inhibicijom apoptoze (Landskron i sur., 2014). Razni transkripcijski čimbenici poput hipoksija inducibilnog čimbenika (HIF), STAT-a, NF $\kappa$ B i TNF- $\alpha$  potiču indukciju iNOS-a koji tijekom upale funkcionira poput promotora tumorske progresije (Vahora i sur., 2016).

U upalnom okolišu, epitelne i upalne stanice sintetiziraju reaktivne kisikove i reaktivne dušikove radikale. Takva nastala DNA oštećenja uzrokuju mutacije u matičnim stanicama što rezultira inicijacijom i progresijom tumora (Vahora i sur., 2016). Postoje dvije izoforme arginaze. Izoforma I je citoplazmatski protein koji se nalazi u jetri i sudjeluje u završnom koraku sinteze uree. Arginaza II se nalazi u mitohondrijima u kojima sudjeluje u metabolizmu poliamina. Povećanje serumske razine arginaze I ukazuje na jetreno oštećenje koje najčešće nastaje tumorskim djelovanjem. Dokazano je kako sintezu iNOS stimuliraju Th1 citokini poput IFN- $\gamma$ , a arginazu Th2 citokini IL-4, IL-10 i IL-13. NOHA enzim inhibira arginaznu aktivnost čime osigurava dovoljnu količinu L-arginina za sintezu NO-a. Osim supresivnog učinka na NO, arginaza također potiče prekomjernu sintezu kolagena, generaciju prolina i poliamina što uzrokuje veću proliferaciju stanica i razvoj tumora (Munder, 2009). Regulacija aktivnosti iNOS-a neovisnog o koncentraciji kalcijevih iona (NOS 2) kontrolirana je negativnom povratnom spregom djelovanjem, p53 tumor supresor gena. Stanice zahvaćene NOS 2 u *in vivo* i *in vitro* uvjetima također pokazuju slabiji tumorski rast i invazivnost (Vahora i sur., 2016).

Kao što je već spomenuto NO ima važnu ulogu u angiogenezi i metastaziranju. Epitelna NOS (eNOS) djeluje kao medijator VEGF-C čime sudjeluje u procesu limfoangiogeneze i limfnog metastaziranja. Posttranslacijskim modifikacijama, NO stimuliranjem ekspresije Fas molekule potiče indukciju apoptoze. S-nitrozilacijom kaspaznih područja bogatih cisteinom provodi se oksidacija tiola koja rezultira inhibicijom apoptoze. Djelovanje NO-a je uglavnom vezano za kaspazu 3 koja je ključna kaspaza za aktivaciju vanjskog puta apoptoze koji je vezan za Fas ligand (receptor smrti). Veće izlaganje NO, dovodi do aktivacije Ras proteina i stimulacije antiapoptotskog Akt signalnog puta i antiapoptotske AKT protein kinaze Bcl2 gena čime osigurava bolje preživljenje tumorskih stanica i mikrookoliša (Vahora i sur., 2016). Uloga NO-a se u razvoju angiogeneze uglavnom bazira na stimulaciji receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) i VEGF faktora, te inhibiciji p53 tumor supresor gena. Recipročan odnos između NO-a i EGFR-a sugerira kako se aktivacijom EGFR-a, također i aktivira iNOS (Vahora i sur., 2016).

Analizirajući dobivene rezultate o razini NO i arginaze zaključilo se kako je dokazana hipoteza o njihovom suprotnom učinku na razvoj ili supresiju tumora.

Iz rezultata je vidljivo da razina NO-a u ispitanim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu raste, dok razina aktivnost arginaze pada. Prateći razinu NO zaključujemo kako medicinske gljive pokazuju najsnažniji protutumorski učinak u kombinaciji sa 5-FU (Slika 14 i Slika 15). Primjena samo AP ili 5-FU samostalno, pokazuje razinu NO manju za 15  $\mu$ M odnosno 25  $\mu$ M u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom pripravka Agarikon plus i 5-FU. Zabilježena aktivnost arginaze je bila najmanja u skupinama obrađenim sa 5-FU gdje je izmjerena razina bila manja za 3,0 U/L u odnosu na obrađenu skupinu (Slika 16 i Slika 17). Aktivnost izmjerene arginaze sa ili bez LPS-a u skupinama obrađenim pripravkom Agarikon plus i kombinacijom Agarikon plus i 5-FU je gotovo identična (3.5 U/L) i pokazuje blago smanjenje u odnosu na kontrolnu skupinu. Temeljem navedenog smatramo da 5-FU svojim citotoksičnim i antiangiogenim djelovanjem ima višestruku ulogu: a) inhibira rast i proliferaciju stanice tumora, b) aktivacijom tronbospodina 1 mijenja stromalni mikrookoliš smanjujući razinu angiogenih čimbenika, c) inhibira razinu tumor supresorskih stanica te potiče aktivaciju M1 makrofaga i sintezu iNOS da katabolizira L-arginin u NO djelujući protutumorski i citotoksično kroz aktivaciju stanične smrti apoptozom i nekrozom, d) vodi pojačanoj aktivnosti makrofaga kao antigen predočnih stanica izražavanjem visoke razine glavnog sustava tkivne podudarnosti i predočavanjem tumorskih antigena vodi stimulaciji citotoksičnih stanica T e) aktivacijom citotoksičnih stanica T i proizvodnja IFN- $\gamma$  dodatno stimulira makrofage na pojačanu fagocitozu i „respiratorni prasak“ povećavajući tumoricidnu aktivnost, f) pojačano izlučivanje IFN- $\gamma$  ključno je ne samo za suradnju makrofaga i citotoksičnih stanica T nego i za stimulaciju NK stanica ključnih za protutumorski učinak (Bracci i sur., 2014). Naši rezultati su u suglasju s drugim istraživačima koji pokazuju da primjena kemoterapije poput ciklofosfamida i 5-fluorouracil može ukloniti regulatorne imunosne stanice (Apetoh i sur., 2015, Bracci i sur., 2014, Galluzzi i sur., 2015) što potvrđuju i rezultati kliničkih ispitivanja. Pokazano je da pacijenti koji su prvo liječeni imunoterapijom potom kemoterapijom imaju bolji klinički ishod od pacijenata koji su samo primali kemoterapiju (Apetoh i sur., 2015, Bracci i sur., 2014, Galluzzi i sur., 2015). Brojni podaci potvrđuju da primjena kemoterapije može povećati učinkovitost imunoterapije, točnije može poboljšati anti-tumorske učinke imunoterapije, posebice dokidanjem imunosupresije izazvane Treg stanicama i mijeloidnim supresorskim MDSC (engl. *Myeloid Derived Suppressor Cells*) stanicama, ali i pojačavajući sazrijevanje dendritičkih stanica i njihove funkcije kroz predočavanje tumorskih antigena,

jačanje aktivnosti citotoksičnih stanica T, te pospješena prodora imunskih stanica u tumorsku jezgru.

Prema Ghiringhelli i Apetoh (2015) antitumorska aktivnost 5-fluorouracila (5-FU) se temelji na povećanju senzibilizacije tumorskih stanica da budu ubijene NK stanicama i CD8 T stanicama kroz pretjerani izražaj NKG2D i Fas liganada. 5-FU također uklanja MDSC-ove, čime se djelomično vraća aktivacija CD8 T stanica. Međutim, 5-FU-inducirana MDSC stanična smrt dovodi do oslobađanja IL-1- $\beta$  što poboljšava Th17 polarizaciju stanica koja vodi pojačanom izlučivanju IL-17 i tumorske angiogeneze. Kombinirane terapije s 5-FU s imunomodulatorima kao što su IL-1Ra, anti-IL-17 ili aktivirajući citokini T-stanica mogli bi biti korisni u pojačanju antitumorskog učinka 5-FU.

Naši podaci su u potpunom suglasju s podacima Ghiringhelli i Apetoh (2015) gdje je jasno vidljivo da imunoterapija s pripravkom Agarikon plus može sinergistički djelovati s 5-FU te poboljšati protutumorsku učinkovitost.

## 5. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti kako slijedi:

1. 5-FU sam ili u kombinaciji s komercijalnim pripravkom Agarikon plus smanjuje volumen tumora u miševa nositelja kolorektalnog karcinoma u odnosu na kontrolu
2. Dobiveni rezultati potvrđuju značajan pad razinine faktora VEGF, glavnog čimbenika angiogeneze u svim obrađenim skupinama nakon 21. dana od injiciranja tumora s Agarikon plus, 5-FU, Agarikon plus +5-FU
3. Pripravak Agarikon plus, te kombinacija Agarikon plus i 5-FU imaju značajna protutumorska svojstva temeljena na aktivaciji makrofaga te sprječavanju polarizacije makrofaga iz M1 u M2 na što ukazuje povećana razina Th1 citokina
4. Povećana razina NO-a u nadtalogu makrofaga slezene skupine obrađene s 5-FU ili 5-FU u kombinaciji s komercijalnim pripravkom Agarikon plus potvrđuje povećani citotoksičan učinak makrofaga na stanice tumora
5. Stanica kolorektalnog tumora injicirane subkutano u miša soja BALB/c jesu dobar model za proučavanje antiupalnih, antitumorskih i antiangiogenetskih značajki pripravka Agarikon plus i 5-FU

## 6. LITERATURA

1. Andre T., Kotelevets L., Vaillant J.C. (2000): Vegf, Vegf-B, Vegf-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during neoplastic progression of human colonic mucosa. *International Journal of Cancer* **86**: 174-181
2. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović Šudar V., Marušić M., Tardi M., Višnjic D. (2010): *Imunologija*, 7. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb
3. Apetoh L., Ladoire S., Coukos G., Ghiringhelli F. (2015): Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure? *Annals of Oncology* **26**: 1813-1823.
4. Baba A. i Catoi C. (2007): *Comparative oncology*. The publishing house of the Romanian academy.
5. Bracci L., Schiavoni G., Sistigu A., Belardelli F. (2014): Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death and Differentiation* **21**: 15-25.
6. Bredholt G., Mannelqvist M., Stefansson I.M., Birkeland E., Hellem Bo T., Oyan A.M., Trovik J., Kalland K.-H., Jonassen I., Salvesen H.B., Wik E., Akslen L.A. (2015): Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. *Oncotarget* **6**(37): 39676-39691.
7. Chen L., Endler A., Shibasaki F. (2009): Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Experimental and Molecular Medicine* **41**(12): 849-857.
8. Cheruku H.R., Mohamedali A., Cantor D.I., Tan S. H., Nice E.C., Baker M.S. (2015): Transforming growth factor-  $\beta$ , MAPK and Wnt signaling interactions in colorectal cancer. *EuPA Open Proteomics* **8**: 104-115.
9. de Caestecker M.P., Piek E., Roberts A.B. (2000): Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **6**(92): 138-402.
10. Dedić Plavetić N., Letilović T., Vrbanec D. (2003): Uloga angiogeneze u rastu i progresiji tumora. *Liječnički Vjesnik* **125**: 260-265.



11. Dennis K.L., Blatner N.R., Gounari F., Khazaie K. (2013): Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. *Current Opinion in Oncology* **25**(6): 637-645.
12. Folgueras A.R., Pendas A.M., Sanchez L.M., Lopez-Otin C. (2004): Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *The International Journal of Developmental Biology* **48**: 411-424.
13. Fukumura D., Kashiwagi S., Rakesh K.J. (2006): The role of nitric oxide in tumor progression. *Nature Reviews* **6**: 521-534.
14. Galluzzi L., Buque A., Kepp O., Zitvogel L., Kroemer G. (2015): Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell* **28**: 690-714.
15. Ganeshpurkar A., Rai G., Jain A.P. (2010): Medicinal mushrooms: Towards a new horizon. *Pharmacognosy Reviews* **4**(8): 127-135.
16. George M.L., Tutton M.G., Janssen F. (2001): VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* **3**: 420-427.
17. Ghiringhelli F., Apetoh L. (2015): Enhancing the anticancer effects of 5-Fluorouracil: current challenges and future perspectives. *Biomedical Journal* **38**(2): 111-116.
18. Kirsch M., Strasser J., Allende R. (1998): Angiogenesis suppresses malignant glioma growth *in vivo*. *Cancer Research* **58**: 4654-4659.
19. Kurebayashi J., Otsuki T., Kunisue H. (1999): Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* **90**: 977-981.
20. Landskron G., De la Fuente M., Thuwajit P., Thuwajit C., Hermoso M.A. (2014): Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology Research*: 1-19, ID 149185.
21. Lull C., Wichers H.J., Savelkoul F.J. (2005): Antiinflammatory and Immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation* **2**: 63-68.
22. Mannello F. i Medda V. (2012): Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* **47**: 27-58.
23. Munder M. (2009): Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology* **158**: 638-651.
24. Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., Kojiro M. (2006): Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*. **2**(3): 213-219.
25. Oršolić N., Šver L., Terzić S., Tadić Z., Bašić I. (2003): Inhibitory effect of water-soluble derivate of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and

- metastazing ability: a possible mode of antitumor action. *Nutrition and Cancer* **47**(2): 156-163.
- 26.** Panni R.Z., Linehan D.C., DeNardo D.G. (2013): Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer. *Immunotherapy* **5**(10): 1-21.
  - 27.** Pardini B., Kumar R., Naccarati A., Novotny J., Prasad R.B., Forsti A., Hemminki K., Vodicka P., Bermejo J.L. (2011): 5-Fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer and MTHFR/MTRR genotypes. *British Journal of Clinical Pharmacology* **72**: 162-163.
  - 28.** Patel S. i Goyal A. (2012): Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *Biotech* **2**: 1-15.
  - 29.** Reunanen N. i Kahari V. (2013): Matrix metalloproteinases in cancer cell invasion. Landes Bioscience, Texas. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>
  - 30.** Rita Carvalho Garbi Novaes M., Valadares F., Campos Reis M., Rodrigues Goncalves D., da Cunha Menezes M. (2011): The effects of dietary supplementation with *Agaricales* mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: Evidence-based medicine. *Clinics* **66**(12): 2133-2139.
  - 31.** Sica A., Schioppa T., Mantovani A., Allavena P. (2006): Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumor progression: Potential targets of anty-cancer therapy. *European Journal of Cancer* **42**: 717-727.
  - 32.** Sudhakar A. (2009): History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science and Therapy* **1**(2): 1-4.
  - 33.** Šaban N., Stepanić V., Vučinić S., Horvatić A., Cindrić M., Perković I., Zorc B., Oršolić N., Mintas M., Pavelić K., Pavelić S.K. (2013): Antitumor mechanisms of amino Acid hydroxyurea derivatives in the metastatic colon cancer model. *International Journal of Molecular Sciences* **14**(12): 23654-23671
  - 34.** Través P. G., Luque A., Hortelano S. (2012): Macrophages, inflammation and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators of Inflammation* 2012, ID 568783.
  - 35.** Vahora H., Ali Khan M., Alalami U., Hussain A. (2016): The potential role of ntric oxide in halting cancer progression trough chemoprevention. *Journal of Cancer Prevention* **21**: 1-12.

## **7. ŽIVOTOPIS**

### **Osobne informacije**

Ime i prezime: Denis Jagečić

Datum rođenja: 24.8.1993.

Adresa: Ptičekova 13-a, 49243 Oroslavje

e-mail: [denis.jagecic@gmail.com](mailto:denis.jagecic@gmail.com)

Kontakt broj: 098/978-4508

### **Obrazovanje**

- 2015.-2017.** Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek  
Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija
- 2012.-2015.** Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike
- 2008.-2012.** Opća gimnazija  
Srednja škola Oroslavje

### **Radno iskustvo**

2016. Laboratorijska stručna praksa – Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za animalnu fiziologiju

Tijekom laboratorijske prakse i cjelokupnog školovanja, naučio sam izvoditi, mjeriti i interpretirati široki raspon imunoloških (precipitacijski test, aglutinacijski test, direktna i indirektna imunofluorescencija, radioimunoassay, direktna i indirektna ELISA, protočna citometrija, brzi antigenski testovi...), molekularnih (PCR, elektroforeza, stanična kultura, Western blot...), biokemijskih (Microarray, HPLC, GC, AAS, sprektrofotometrija..),

hematoloških (test osmotske rezistencije eritrocita, test izolacije limfocita iz periferne krvi pomoću fikola, test hemolize, test određivanja krvnih grupa), te testova za određivanje genotoksičnosti (komet test, mikronukleus test)

### **Osobne vještine**

**Materinski jezik:** hrvatski

**Strani jezici:** engleski (B2 razina)

### **Digitalna kompetencija**

-koristim Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi

-služim se Internetom (e-mail, google+, društvene mreže)