

Utjecaj duljine izloženosti oksidacijskom stresu na modulaciju antioksidacijskog odgovora i metabolizma u stanica tumora dojke

Mlinarić, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:857205>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Monika Mlinarić

**UTJECAJ DULJINE IZLOŽENOSTI OKSIDACIJSKOM STRESU
NA MODULACIJU ANTIOKSIDACIJSKOG ODGOVORA
I METABOLIZMA U STANICA TUMORA DOJKE**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za oksidacijski stres na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Lidije Milković i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujem mentorici dr.sc. Lidiji Milković na ukazanom povjerenju, strpljenju, pomoći i bezbrojnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.

Također, veliko hvala prof. dr.sc. Nadi Oršolić na svojoj pomoći i savjetima prilikom pisanja diplomskog rada te na prekrasnim predavanjima tijekom čitavog studija.

Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji, koja me tijekom svih godina obrazovanja podržavala, vjerovala u mene i moj uspjeh.

Zahvaljujem se prijateljicama, koje su bile uz mene i uljepšale svaki dan ovog studija.

Posebno hvala Stjepanu na beskrajnoj ljubavi i podršci, bez koje ovo ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ DULJINE IZLOŽENOSTI OKSIDACIJSKOM STRESU NA MODULACIJU ANTIOKSIDACIJSKOG ODGOVORA I METABOLIZMA U STANICA TUMORA DOJKE

Monika Mlinarić

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *Reactive oxygen species*) su nužne za funkcioniranje fizioloških procesa u stanicama, no mogu doprinijeti i razvoju bolesti kao što su tumori. Nepoželjno djelovanje ROS-a nastupa uslijed njihove nedostatne eliminacije antioksidansima tijekom oksidacijskog stresa (OS). Osim što je OS uključen u sve faze nastanka i razvoja tumora, u samih je tumorskih stanica pokazana povećana razina ROS-a u odnosu na zdrave, karakteristika koju iskorištava većina konvencionalne terapije bazirane na selektivnom povećanju ROS-a. Kako ne bi došlo do smrti zbog oksidacijskih oštećenja, tumorske stanice često imaju i pojačane antioksidacijske mehanizme zaštite te mijenjaju svoj metabolizam sukladno potrebama rasta. Heterogenost samih tumora doprinosi različitim odgovorima na terapiju. Ovim je istraživanjem ispitivan utjecaj duljine izloženosti različitim koncentracijama vodikovog peroksida na trima tipovima staničnih linija tumora dojke: MCF-7 (hormonski pozitivne), SkBr-3 (HER2 pozitivne) i SUM 159 (trostruko negativne). Proučavana je stanična vijabilnost, razina endogenih ROS-a, te ekspresija proteina i aktivnost glutationa i katalaze radi otkrivanja potencijalnih razlika u antioksidacijskoj zaštiti i aktivaciji metabolizma. Rezultati ukazuju na razlike u odgovoru staničnih linija u ovisnosti o koncentraciji i duljini izloženosti vodikovom peroksidu. Stanična linija MCF-7 se pokazala najmanje osjetljivom, dok je SUM 159 bila najosjetljivija.

(55 stranica, 14 slika, 8 jednadžbi, 2 tablice, 75 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: oksidacijski stres, vodikov peroksid, stanične linije tumora dojke, antioksidacijska obrana, signalni put NRF2, metaboličko reprogramiranje

Voditelj: Dr. sc. Lidija Milković, znan. sur.

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji: 1. Prof. dr. sc. Nada Oršolić

2. Prof. dr. sc. Biljana Balen

3. Doc. dr. sc. Romana Gračan

Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 11.1.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

INFLUENCE OF THE OXIDATIVE STRESS LENGTH ON THE MODULATION OF ANTIOXIDATIVE RESPONSE AND METABOLISM IN BREAST CANCER CELLS

Monika Mlinarić

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Although necessary for physiological cell functions, reactive oxygen species (ROS) can also contribute to the development of diseases such as tumors. Their detrimental effect is associated with their insufficient elimination by antioxidants during oxidative stress (OS). In addition to OS being involved in all stages of tumor development and progression, tumor cells have been shown to have increased levels of ROS compared to healthy ones, a feature exploited by most conventional therapies based on selective ROS augmentation. To avoid oxidative damage-induced death, tumor cells often enhance antioxidant defense mechanisms and reprogram their metabolism to boost tumor growth. The heterogeneity of the tumors contributes to different responses to therapy. This study aimed to investigate the effect of length of exposure to different concentrations of hydrogen peroxide on three breast cancer cell lines: MCF-7 (hormone positive), SkBr-3 (HER2 positive), and SUM 159 (triple-negative). Cell viability, endogenous levels of ROS, protein expression, and glutathione and catalase activity were studied to explore potential differences in antioxidative capacity and metabolic activation. The results indicate cell line-dependent response to concentration and length of exposure to hydrogen peroxide. The MCF-7 cell line was the least sensitive, while the SUM 159 was the most sensitive.

(55 pages, 14 figures, 8 equations, 2 tables, 75 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: oxidative stress, hydrogen peroxide, breast cancer cell lines, antioxidative defense, the NRF2 signaling pathway, metabolic reprogramming

Supervisor: Dr. Lidija Milković, Research Assoc.

Cosupervisor: Prof. Dr. Nada Oršolić

Reviewers: 1. Prof. Dr. Nada Oršolić

2. Prof. Dr. Biljana Balen

3. Asst. Prof. Dr. Romana Gračan

Supstitute: Assoc. Prof. Dr. Maja Matulić

Thesis accepted: 11.1.2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. OKSIDACIJSKI STRES (OS, engl. <i>OXIDATIVE STRESS</i>)	1
1.1.1. Reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>).....	1
1.1.1.1. Izvori ROS-a	1
1.1.1.2. Dvostruka uloga ROS-a	3
1.1.2. Antioksidacijska obrana	5
1.1.2.1. Antioksidacijski enzimi	6
1.1.2.2. Antioksidacijski spojevi.....	8
1.1.2.3. Indukcija antioksidansa	9
1.2. OKSIDACIJSKI STRES U KARCINOGENEZI.....	11
1.2.1. Uloga ROS-a u karcinogenezi.....	12
1.2.1.1. Utjecaj vodikova peroksida	14
1.2.2. Uloga antioksidansa u karcinogenezi.....	14
1.2.3. Oksidacijski stres i metabolizam tumora	16
1.3. TUMOR DOJKE	18
1.3.1. Klasifikacija tumora dojke	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. UZGOJ STANICA	21
3.2. MJERENJE STANIČNE VIJABILNOSTI	22
3.3. MJERENJE RAZINE UNUTARSTANIČNOG ROS-a.....	23
3.4. MOKRI PRIJENOS PROTEINA NA MEMBRANU	23
3.5. MJERENJE KONCENTRACIJE UKUPNOG GLUTATIONA.....	27
3.6. MJERENJE AKTIVNOSTI KATALAZE	28
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. MJERENJE STANIČNE VIJABILNOSTI	30
4.2. MJERENJE RAZINE UNUTARSTANIČNOG ROS-a.....	32
4.3. MOKRI PRIJENOS PROTEINA NA MEMBRANU	34

4.4. MJERENJE KONCENTRACIJE UKUPNOG GLUTATIONA.....	40
4.5. MJERENJE AKTIVNOSTI KATALAZE	42
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČAK	48
7. LITERATURA.....	49
8. PRILOZI.....	55

POPIS KRATICA

- 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB, engl. *5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)*)
- 8-OH-G (8-hidroksigvanin, engl. *8-Hydroxyguanine*)
- ADP (adenozin difosfat, engl. *Adenosine Diphosphate*)
- AMP (adenozin monofosfat, engl. *Adenosine Monophosphate*)
- AMPK (protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom, engl. *5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase*)
- AP-1 (aktivator proteina 1, engl. *Activator Protein 1*)
- AQP (akvaporin, engl. *Aquaporin*)
- ATP (adenozin trifosfat, engl. *Adenosine Triphosphate*)
- BSA (goveđi serumski albumin, engl. *Bovine Serum Albumin*)
- CAT (katalaza, engl. *Catalase*)
- DCFH-DA (diklor-dihidro-fluorescein diacetat, engl. *2'-7'Dichlorofluorescein Diacetate*)
- DMEM medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- EC (izvanstanično, engl. *Extracellular*)
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- ER (receptor za estrogen, engl. *Estrogene Receptor*)
- ERK (kinaza aktivirana izvanstaničnim signalom, engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*)
- FAD (flavin adenin dinukleotid, engl. *Flavin Adenine Dinucleotide*)
- FBS (fetalni goveđi serum, engl. *Fetal Bovine Serum*)
- Fosfatni pufer (PBS, engl. *Phosphate Buffered Saline*)
- GPx (glutation peroksidaza, engl. *Glutathione Peroxidase*)
- GR (glutation reduktaza, engl. *Glutathione Reductase*)
- GSH (glutation, engl. *Glutathione*)
- GSSG (glutation disulfid, engl. *Glutathione Disulphide*)
- GST (glutation-S-transferaza, engl. *Glutathione-S-Transferase*)
- HER2 (humani epidermalni čimbenik rasta 2, engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)
- HIF-1 α (hipoksijom inducirani faktor 1-alfa, engl. *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*)
- HNE (4-hidroksinonenal, engl. *4-Hydroxynonenal*)
- HO-1 (hem oksigenaza 1, engl. *Heme Oxygenase 1*)
- JNK (kinaza koja fosforilira N-kraj transkripcijskog faktora c-Jun, engl. *c-Jun N-Terminal Kinases*)
- KEAP 1 (engl. *Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*)
- MAPK (protein kinaza aktivirana mitogenom, engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*)

MDA (malondialdehid, engl. *Malondialdehyde*)

NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*)

NF- κ B (jezgrin faktor kapa B, engl. *Nuclear Factor Kappa B*)

NQO1 (NAD(P)H: kinon oksidoreduktaza 1, engl. *NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1*)

NRF2 (nuklearni eritroidni faktor 2, engl. *Nuclear-factor Erythroid 2-Related Factor 2*).

OS (oksidacijski stres, engl. *Oxidative Stress*)

PKB (protein kinaza B, engl. *Protein Kinase B*) ili AKT

PKC (protein kinaza C, engl. *Protein Kinase C*)

PPP (put pentoza-fosfata, engl. *The Pentose Phosphate Pathway*)

PR (receptor za progesteron, engl. *Progesterone Receptor*)

RIPA pufer (engl. *Radio Immuno Precipitation Assay*)

ROS (reaktivne kisikove vrste, engl. *Reactive Oxygen Species*)

SDS (Natrijev dodecil sulfat, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SOD (superoksid dismutaza, engl. *Superoxide Dismutase*)

STAT3 (prenosilac signala i aktivator transkripcije 3, engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)

TBS (Tris pufer, engl. *Tris-Buffered Saline*)

TBST (TBS s 0,1% Tween 20)

TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilendiamin, engl. *N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine*)

UPS (ubikvitin-proteasom sustav, engl. *Ubiquitin-Proteasome System*)

1. UVOD

1.1. Oksidacijski stres (OS, engl. *Oxidative Stress*)

Premda neophodan za održavanje života, kisik u stanicama može odigrati nepoželjnu ulogu tako da u reakciji oksidacije povremeno oduzima elektrone ostalim molekulama. U tom procesu nastaju reaktivne vrste. One mogu nastati zbog različitih vanjskih utjecaja, ali i zbog prirodnog metabolizma stanica. Ako reaktivne vrste koje stalno nastaju unutar stanica nazovemo prooksidansima, protektivne mehanizme i molekule zadužene za njihovo uklanjanje nazivamo antioksidansima. Prooksidansi koji nastaju nisu isključivo negativni jer i oni imaju vrlo važnu ulogu u organizmu. Reakcije oksidacije i redukcije potrebne su za mnoge biokemijske mehanizme koji se odvijaju u stanici. Osnova ovih reakcija je prijenos elektrona s reducensa na oksidans, odnosno s prooksidansa na antioksidans. Prilikom prijenosa elektrona bitno je održavati stabilno redoks stanje u stanici, a ono je karakterizirano koncentracijom elektrona u njoj. Stalna produkcija i eliminacija radikala nužne su za pravilan rad stanice i organizma, ali ako dođe do neravnoteže u korist prooksidansa, zbog njihove prevelike produkcije ili nedovoljne eliminacije, nastaje stanje koje se naziva oksidacijski stres.

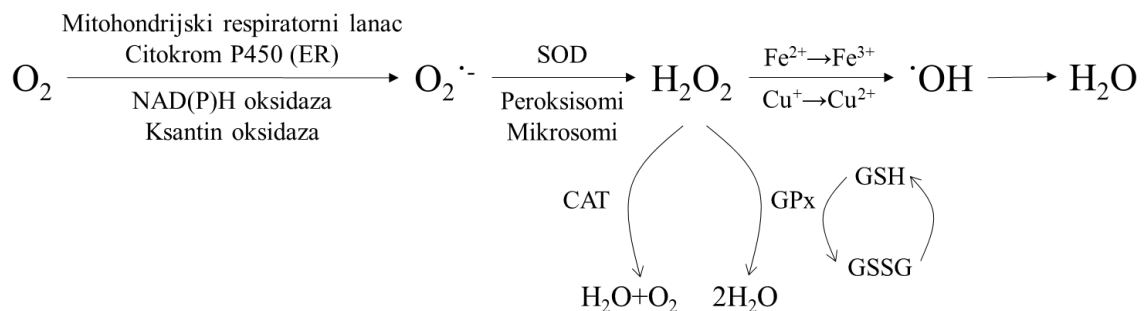
1.1.1. Reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*)

Reaktivne vrste su nestabilni radikali, ioni ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona, što ih čini jako reaktivnima i daje im mogućnost reagiranja s različitim biomolekulama. Zasiurno najvažnije reaktivne vrste koje nastaju u našim stanicama su reaktivne kisikove vrste. Možemo ih kategorizirati u dvije grupe: slobodni radikali kao što su superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni ($\cdot OH$), organski (R^{\cdot}), peroksilni (ROO^{\cdot}) ili alkoksilni radikal (RO^{\cdot}) te neradikali poput vodikova peroksida (H_2O_2), singletnog kisika (1O_2) ili ozona (O_3) (Liou i Storz 2010). ROS nastaje endogeno prilikom aktivacije imunskih stanica, tijekom upale, stresa, ishemije, različitih infekcija, pri razvoju tumora i procesom starenja ili zbog vanjskih faktora kao što su izloženost ksenobioticima, zagađenom zraku i vodi, dimu cigarete, alkoholu, teškim metalima, nekim lijekovima ili ionizirajućem zračenju (Valko i sur. 2007; Pizzino i sur. 2017).

1.1.1.1. Izvori ROS-a

ROS u stanicama nastaju uglavnom u procesu prijenosa elektrona koji se može odvijati uz ili bez prisutnosti enzima. Jedan od najvećih endogenih izvora ROS-a je mitohondrijski respiratorni lanac gdje, u procesu staničnog disanja zbog „curenja“ elektrona na kompleksima

1 i 3, nastaje superoksidni anion (Valko i sur. 2004); to se događa s 1-5 % konzumiranog kisika (Reuter i sur. 2010). Osim u mitohondriju, superoksidni anion nastaje zbog „curenja“ elektrona prilikom detoksikacije na citokromu P450 u endoplazmatskom retikulumu; a nastaje i zbog aktivnosti enzima oksidaza i oksigenaza, primjerice NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*) oksidaza i ksantin oksidaza, u procesu jednoelektronske redukcije molekularnog kisika (Valko i sur. 2004). Superoksidni anion sam ne izaziva velika oštećenja, ali reagirajući s drugim molekulama može tvoriti reaktivnije radikale (Slika 1).



Slika 1. Nastanak i eliminacija reaktivnih kisikovih vrsta

Kratice: O₂ (kisik), ER (endoplazmatski retikulum), O₂^{·-} (superoksidni anion), SOD (superoksid dismutaza), H₂O₂ (vodikov peroksid), Fe (željezo), Cu (bakar), ·OH (hidroksilni radikal), H₂O (voda), CAT (katalaza), GPx (glutation peroksidaza), GSH (glutation), GSSG (glutation disulfid), GR (glutation reduktaza).

Reakcijom dismutacije, koju katalizira superoksid dismutaza (SOD, engl. *Superoxide Dismutase*) sprječava se nakupljanje superoksidnog aniona i nastaje vodikov peroksid (Jednadžba 1 u Tablica 1). On nije slobodni radikal jer nema nespareni elektron, ali sudjeluje u putu redukcije kisika i nastanka drugih reaktivnih radikala. Osim što nastaje eliminacijom superoksidnog aniona, vodikov peroksid stvara se iz molekularnog kisika u peroksisomima i mikrosomima (Valko i sur. 2004). Iako nije reaktivan kao ostali radikali, ima duži vijek i može difundirati kroz membranu te izazivati stanična oštećenja (Matés i Sánchez-Jiménez 2000). Mimo štetnih, ima i fiziološke uloge u organizmu koje su opisane u odlomcima 1.1.1.2 i 1.2.1.1. Glutation peroksidaza (GPx, engl. *Glutathione Peroxidase*) i katalaza (CAT, engl. *Catalase*) enzimi su zaduženi za uklanjanje vodikova peroksida (Jednadžba 2 i Jednadžba 3 u Tablica 1). Ako se to ne dogodi i on reagira s prijelaznim metalima, poput željeza i bakra, u Fentonovoj reakciji (Jednadžba 4 u Tablica 1), nastaje hidroksilni radikal koji je najpotentniji radikal i može izazvati velika stanična oštećenja. Osim u Fentonovoj reakciji, hidroksilni radikal može nastati tijekom metalima katalizirane Haber-Wiessove reakcije (Jednadžba 5 u Tablica 1) i

troelektronskom redukcijom kisika. Hidroksilni radikal je jako nestabilan i kratkoživi, stoga se zadržava na mjestu nastanka i tamo izaziva štetu na biomolekulama (Reuter i sur. 2010). Male količine hidroksilnog radikala mogu ukloniti neenzimatski antioksidansi ako se nađu na mjestu njegova nastanka, ali ne postoji enzim koji bi eliminirao nastali hidroksilni radikal. Najbolji način zaštite je prevencija njegova nastanka (Lushchak 2014).

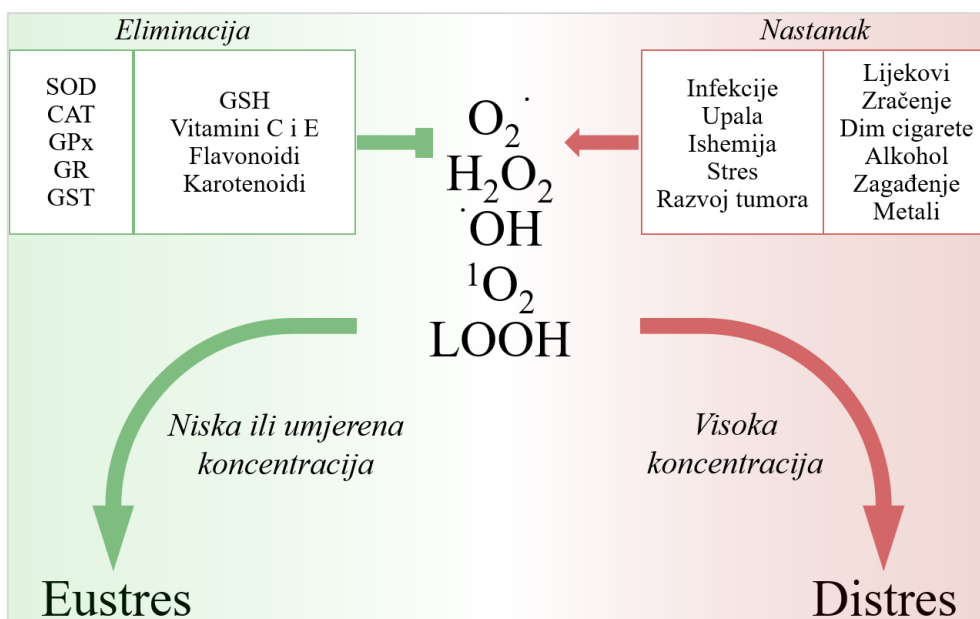
Tablica 1. Prikaz jednadžbi nastanka i eliminacije ROS-a

Jednadžba 1	SOD katalizira dismutaciju superoksidnog aniona	$2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
Jednadžba 2	CAT katalizira reakciju razgradnje vodikova peroksida	$2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{CAT}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Jednadžba 3	GPx katalizira reakciju razgradnje vodikova peroksida	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GPx}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ <div style="text-align: center;"> $\text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{GR}} \text{NADPH} + \text{H}^+$ </div>
Jednadžba 4	Nastanak hidroksilnog radikala u Fentonovoj reakciji	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Fentonova reakcija}} \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^-$
Jednadžba 5	Nastanak hidroksilnog radikala u Haber-Weissovom reakciji	$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Haber-Weissova reakcija}} \text{O}_2 + \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^-$

Kratice: SOD (superoksid dismutaza), $\text{O}_2^{\cdot-}$ (superoksidni anion), H^+ (vodikov ion), O_2 (kisik), H_2O_2 (vodikov peroksid), H_2O (voda), CAT (katalaza), GPx (glutation peroksidaza), GSH (glutation), GSSG (glutation disulfid), GR (glutation reduktaza), NADP^+ odnosno NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidirani odnosno reducirani oblik), Fe (željezo), OH^{\cdot} (hidroksilni radikal).

1.1.1.2. Dvostruka uloga ROS-a

ROS imaju dvostruku ulogu u organizmu, ovisno o prisutnoj koncentraciji mogu biti štetni ili blagotvorni (Slika 2). U niskim ili umjerenim koncentracijama imaju važnu ulogu u radu stanice, pa takav OS nazivamo fiziološkim, odnosno eustresom. Kada koncentracija ROS-a postane previsoka, počinju izazivati oksidacijska oštećenja i promjene u signalnim putevima te OS više nije fiziološki i nazivamo ga distresom (Sies 2017). Kada se govori o OS-u, uglavnom se referira na njegove štetne učinke, odnosno distres.



Slika 2. Ravnoteža nastanka i eliminacije ROS-a određuju stanje eustresa ili distresa

Kratice: SOD (superoksid dismutaza), CAT (katalaza), GPx (glutation peroksidaza), GR (glutation reduktaza), GST (glutation-S-transferaza), GSH (glutation), $O_2^{\cdot-}$ (superoksidni anion), H_2O_2 (vodikov peroksid), $\cdot OH$ (hidroksilni radikal), 1O_2 (singletni kisik), LOOH (lipidni hidroperoksid).

U niskim i umjerenim koncentracijama ROS imaju bitnu fiziološku ulogu. Kao sekundarni glasnici sudjeluju u regulaciji stanične signalizacije, sudjeluju u sintezi i metabolizmu brojnih molekula, izuzetno su važni prilikom obrane organizma od patogena te sudjeluju u indukciji apoptoze oštećenih i starih stanica (Schieber i Chandel 2014; Pizzino i sur. 2017). Prilikom obrane organizma od patogena, u stanicama imunskog sustava, aktivira se NADPH oksidaza koja u kratkom vremenu generira veliku količinu ROS-a (oksidacijski prasak) tako ubijajući patogene (Pizzino i sur. 2017). U znatno manjim količinama NADPH oksidaza stvara ROS i u nefagocitnim stanicama. Većina stanica na poticaj citokina, hormona ili faktora rasta proizvodi niske razine ROS-a koje kao sekundarni glasnici sudjeluju u signalnim putevima uključenim u rast i diferencijaciju stanice. U reducirajućim uvjetima ROS stimuliraju staničnu proliferaciju, blago oksidirajući uvjeti potiču diferencijaciju stanica, umjeren oksidacija aktivira apoptozu, a intenzivna oksidacija pokreće nekrozu stanica (Valko i sur. 2007). ROS u prijenosu signala oksidiraju cisteinske ostatke proteina i tako mijenjaju njihovu strukturu i aktivnost, aktivirajući različite redoks-ovisne signalne puteve, pri čemu može doći do aktivacije ili inhibicije enzima, do promjene transkripcijskih faktora, sekundarnih glasnika ili receptora (Klaunig i sur. 1998; Holmström i Finkel 2014). Ovaj je proces reverzibilan i događa se pri niskim razinama ROS-a, dok u slučaju distresa dolazi do

ireverzibilnih promjena proteina koje štete njihovoj funkciji (Schieber i Chandel 2014). Dakle, pri previsokim koncentracijama ROS-a javlja se njihov štetan učinak: ROS uzrokuju lipidnu peroksidaciju, oksidacijska oštećenja proteina i DNA, a mogu i inducirati apoptozu. Zbog svih oštećenja dolazi do promjene stanične morfologije i funkcije, mijenja se ekspresija gena, stanična signalizacija i aktivnost enzima. Nastala oštećenja DNA uključuju inhibiciju sinteze proteina ili zastoj replikacije, kao i mutacije koje dovode do smrti stanice ili karcinogeneze¹ (Valko i sur. 2004). Oksidacijom lipida mijenja se fluidnost i permeabilnost membrane, može doći do inaktivacije membranskih proteina te začetka lipidne peroksidacije čiji produkti mogu inicirati karcinogenezu (Burdon 1995). Upravo se radi takvih oštećenja uzrokovanih ROS-om smatra kako je OS povezan s razvojem brojnih bolesti i starenjem. Zbog navedenih promjena važno je održavati koncentraciju ROS-a pri niskim, fiziološkim vrijednostima. Hoće li OS djelovati štetno ili blagotvorno definirano je vrstom ROS-a i specifičnosti prema ciljnoj molekuli, kao i koncentraciji i mjestu stvaranja (Schieber i Chandel 2014). Ravnoteža između blagotvornog i štetnog učinka bitna je za pravilan rad stanica, a omogućava ju niz reakcija nazvanim redoks regulacija. Proces redoks regulacije i homeostaze omogućava funkcioniranje organizma i zaštitu od oksidacijskih oštećenja (Valko i sur. 2007).

1.1.2. Antioksidacijska obrana

Upravo radi štetnih učinaka ROS-a organizam mora imati mogućnost obrane koju obavlja na nekoliko načina. Obrambeni mehanizmi odgađaju ili inhibiraju oksidaciju, a uključuju prevenciju, popravak, fizičku i antioksidacijsku obranu. Prevencija podrazumijeva uklanjanje kisika ili smanjivanje lokalne koncentracije kisika te uklanjanje iona metala zbog čega se onemogućava nastanak prekomjerne količine ROS-a, posebice nepoželjnog hidroksilnog radikala. Kad je potrebna visoka razina ROS-a ona se može postići lokalno, pri čemu je bitna kontrola. Ako ipak dođe do oksidacijskog oštećenja, postoje načini popravka i uklanjanja oštećenih molekula prije nego one izazovu dodatna oštećenja. Direktno uklanjanje i neutralizaciju ROS-a obavljaju endogeni ili egzogeni, enzimatski ili neenzimatski antioksidansi. Endogeni antioksidansi su oni koji nastaju u ljudskom tijelu, a egzogeni su oni koje unosimo putem hrane ili lijekova. Antioksidanse možemo grupirati i s obzirom na mjesto djelovanja, pa su tako unutarstanični zaduženi za sprječavanje oksidacijskih oštećenja unutar stanice, membranski antioksidansi nalaze se u membrani i ondje neutraliziraju radikale, a izvanstanični štite izvan stanice gdje većinom vežu ione metala i tako sprječavaju reakciju s

¹ Tumorigeneza, karcinogeneza ili kancerogeneza je proces nastanka i razvoja tumora.

reaktivnim radikalima (Tablica 2). Antioksidansi mogu djelovati i stimulacijom detoksicirajućih mehanizama koji uklanjaju karcinogene i toksične molekule ili ROS (Kang i sur. 2005).

Tablica 2. Kategorije antioksidansa

	<i>PORIJEKLO</i>	<i>AKTIVNOST</i>	<i>LOKACIJA</i>	<i>PRIMJER</i>
ANTIOKSIDANSI	ENDOGENI	ENZIMATSKI	UNUTARSTANIČNI	SOD
				CAT
				GPx
				HO-1
				NQO1
				EC-SOD
		IZVANSTANIČNI	EC-GPx	
			GSH	
		NEENZIMATSKI	UNUTARSTANIČNI	Tioredoksin
				Bilirubin
				Koenzim Q
				Transferin
				Laktoferin
				Albumin
EGZOGENI	NEENZIMATSKI	UNUTARSTANIČNI	Polifenoli	
			Vitamin C	
			Minerali	
		MEMBRANSKI	Vitamin E	
			β-karoten	

Kratice: SOD (superoksid dismutaza), CAT (katalaza), GPx (glutation peroksidaza), HO-1 (hem oksigenaza 1), NQO1 (NAD(P)H: kinon oksidoreduktaza 1), EC-SOD (izvanstanična SOD), EC-GPx (izvanstanična GPx), GSH (glutation).

U Tablica 2 prikazani su primjeri nekih antioksidansa kategoriziranih po navedenim kriterijima, to naravno nisu svi, već samo neki poznatiji primjeri. U narednim odlomcima će se detaljnije opisati aktivnost onih antioksidansa koji su se istraživali u kontekstu ovog rada.

1.1.2.1. Antioksidacijski enzimi

Prvi od važnih antioksidacijskih enzima uključenih u eliminaciju ROS-a je SOD koja eliminira visoko reaktivni superoksidni anion stvarajući manje reaktivan, ali i dalje opasan, vodikov peroksid (Jednadžba 1 u Tablica 1). U ljudi postoje tri izoforme ovog enzima: unutarstanične izoforme su citosolna SOD koja u aktivnom mjestu ima bakar i cink te mitohondrijska SOD koja ima mangan, izvanstanična SOD (EC-SOD, engl. *Extracellular Superoxide Dismutase*) u aktivnom mjestu također ima bakar i cink (Valko i sur. 2006).

Razgradnju nastalog vodikova peroksida kataliziraju CAT i GPx. CAT je jedan od najefektivnijih enzima u prirodi jer jedna molekula CAT može razgraditi čak 6 milijuna molekula vodikova peroksida u minuti (Valko i sur. 2006). Budući da je tako efektivna, CAT je zadužena za uklanjanje vodikova peroksida kada se on nalazi u prekomjernoj količini, dotada to obavlja specifičnija GPx. Dakle, u stanju OS CAT je zadužena za većinsku eliminaciju vodikova peroksida. GPx katalizira raspad vodikova peroksida, ali i organskih hidroperoksida. Kompetira CAT za supstrat te budući da ima viši afinitet za vodikov peroksid zadužena je za njegovu razgradnju dok je u nižim koncentracijama. S obzirom na prisutnost selena (Se) u aktivnom mjestu, GPx se dijeli u dvije kategorije: GPx-ovisna i GPx-neovisna o selenu. Katalizira reakciju razgradnje vodikova peroksida koristeći GSH kao donor elektrona, pri čemu on prelazi u oksidirani oblik kojeg reducira glutation reduktaza (GR, engl. *Glutathione Reductase*) u reakciji u kojoj je donor elektrona NADPH (Jednadžba 3 u Tablica 1).

Osim enzima koji imaju direktan učinak u eliminaciji ROS-a, postoje i oni enzimi koji indirektno sprječavaju njihov nastanak. Primjer su hem oksigenaza 1 (HO-1, engl. *Heme Oxygenase 1*) i NAD(P)H: kinon oksidoreduktaza 1 (NQO1, engl. *NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1*). HO-1 je enzim koji razgrađuje štetni hem i tako sprječava oksidacijska oštećenja. Katabolizira hem u ugljikov monoksid (CO), biliverdin i željezo (Fe^{2+}). Budući je jedini način kojim se stanice rješavaju štetnog hema, konstantno je eksprimiran i smatra se održavateljskim (*housekeeping*) genom (Otterbein i sur. 2003). U fiziološkim je uvjetima ekspresija HO-1 niža, a aktiviraju ju prisutnost hema, nekih citokina i faktora rasta te ROS-a (Bahmani i sur. 2011). Zbog produkata koji nastaju tijekom aktivnosti HO-1, on ima citoprotektivnu, antiupalnu, antiapoptotsku i antiproliferativnu ulogu. CO djeluje antiupalno modulirajući aktivaciju monocita i makrofaga u imunološkom odgovoru, biliverdin se odmah prevodi u bilirubin s antioksidacijskim svojstvima, a željezo potiče ekspresiju feritina i transportera za željezo koji ga vežu i izbacuju iz stanice sprječavajući nastanak hidroksilnih radikala u Fentonovoj reakciji (Otterbein i sur. 2003). Dakle, HO-1 ima bitnu citoprotektivnu ulogu i može štiti stanice od oksidacijskih oštećenja u stanju OS-a, slično kao i NQO1. NQO1 je citoprotektivni, detoksikacijski enzim koji štiti stanice od toksičnih kinona i oksidacijskih oštećenja. Katalizira dvoelektronsku redukciju kinona u hidrokinone, a u polovičnoj jednoelektronskoj redukciji nastaju štetni semikinoni koji reagiraju s molekularnim kisikom i stvaraju ROS (Ross i Siegel 2017). NQO1 je inducibilni enzim koji se aktivira u stanju OS-a, a ima mogućnost redukcije koenzima Q (ubikinon) i vitamina E čime štiti membrane od oksidacijskih oštećenja i lipidne peroksidacije (Siegel i sur. 1997). Djeluje antioksidacijski i

kao superoksid reduktaza direktno eliminira superoksidni anion (Siegel i sur. 2004). Osim antioksidacijskih i detoksikacijskih uloga, NQO1 veže i modulira aktivnost proteina te sprječava njihovu degradaciju, naročito u stanju OS-a. Tako, primjerice NQO1 stabilizira TP53 i sprječava njegovu proteasomsku degradaciju (Asher i sur. 2002). Osim što reagira s proteinima koje treba uništiti, može reagirati direktno s proteasomom te vezati mRNA i poticati translaciju proteina (Ross i Siegel 2017). Građom je to dimerni protein s flavin adenin dinukleotidom (FAD, engl. *Flavin Adenine Dinucleotide*) u aktivnom mjestu, zbog kojeg djeluje kao redoks senzor ovisno o omjeru NADPH/NADP⁺. U uvjetima kada ima dovoljno NADPH, NQO1 je u reduciranom stanju (FADH₂). Kada padne razine NADPH, kao što se događa u stanju OS-a kada se on iskorištava za regeneraciju GSH, NQO1 postaje oksidiran (FAD) i mijenja konformaciju. Promjena konformacije uzrokovana padom razine NADPH mijenja aktivnost NQO1 te potiče vezanje proteina i mRNA (Ross i Siegel 2017). Svojim detoksikacijskim i antioksidacijskim sposobnostima NQO1 štiti stanicu od oksidacijskih oštećenja i potencijalne karcinogeneze.

1.1.2.2. Antioksidacijski spojevi

Antioksidacijski spojevi mogu biti topljivi u vodi ili lipidima, pa u odnosu na to mogu biti aktivni u citoplazmi i izvanstaničnom prostoru ili unutar membrane. Mogu djelovati samostalno ili s nekim antioksidacijskim enzimom. Jedan od najpoznatijih lipofilnih antioksidansa je vitamin E koji je aktivan u staničnoj membrani gdje neutralizira radikale nastale u lipidnoj peroksidaciji i sprječava dovršetak tog štetnog procesa. Za regeneraciju vitamina E može poslužiti vitamin C, hidrofilni antioksidans aktivan u citoplazmi gdje neutralizira reaktivne vrste poput vodikova peroksida. Vitamin C prima elektrone s reaktivnijih vrsta i tako sprječava izazivanje oštećenja pri čemu on sam postaje slabo reaktivni radikal kojeg regenerira GSH.

GSH ili γ -glutamyl-cisteinil-glicin po kemijskom je sastavu tripeptid građen od glutaminske kiseline, cisteina i glicina. Aktivno mjesto je tiol (-SH) na cisteinskom ostatku (Pastore i sur. 2003). Nastaje u svim stanicama, međutim sinteza GSH posebno je intenzivna u jetri kao glavnom detoksikacijskom organu. Unutar stanica se u najvećim količinama nalazi u citoplazmi, jezgri i mitohondrijima (Valko i sur. 2006) gdje se može nalaziti u slobodnom obliku ili vezan na proteine (Pastore i sur. 2003). Postoji u reduciranom (GSH) i oksidiranom stanju (GSSG, glutathion disulfid, engl. *Glutathione Disulphide*) čiji nam omjer govori o redoks statusu stanice. Aktivnost GSH popraćena je njegovom oksidacijom, a kako bi se osigurala

stalna zaštita stanica, GSH se mora regenerirati u reakciji koju katalizira GR. Zbog stalne aktivnosti GR u zdravih stanica većina ukupnog GSH nalazi se u reduciranom stanju (Liou i Storz 2010), a povećana koncentracija GSSG-a u odnosu na GSH ukazuje na OS (Jones i sur. 2000). Porastom razine potencijalno toksičnog GSSG-a mijenja se redoks status stanice, on se degradira i započinje *de novo* sinteza GSH-a (Masella i sur. 2005). Zbog utjecaja ROS-a povećava se sinteza GSH-a (Valko i sur. 2006). GSH je najvažniji endogeni neenzimatski antioksidans u našim stanicama koji sprječava oksidacijska oštećenja reagirajući s reaktivnim radikalima i oksidiranim molekulama. Samostalno neutralizira hidroksilne radikale i singletni kisik, a djeluje kao supstrat antioksidacijskim enzimima poput GPx (Jednadžba 3 u Tablica 1) te detoksikacijskim enzimima poput GST². Tako može spriječiti oksidacijska oštećenja DNA i lipida (Valko i sur. 2007) te proteina redukcijom nastalih disulfidnih veza do cisteina (Liou i Storz 2010). Osim što je jaki antioksidans, sudjeluje u metabolizmu otrova i fazi 2 biotransformacije ksenobiotika gdje konjugacijom direktno detoksicira karcinogene (Balendiran i sur. 2004; Dominko i Đikić 2018). GSH može biti kovalentno vezan na druge proteine³ i djelovati kao koenzim, sudjeluje u modulaciji imunološkog odgovora te za regeneraciju vitamina C (Balendiran i sur. 2004). Kao i svaka molekula u našem tijelu, GSH može imati negativnu ulogu. Prilikom prijenosa elektrona s iona metala može nastati superoksidni anion i tako GSH može imati oksidirajući učinak (Balendiran i sur. 2004).

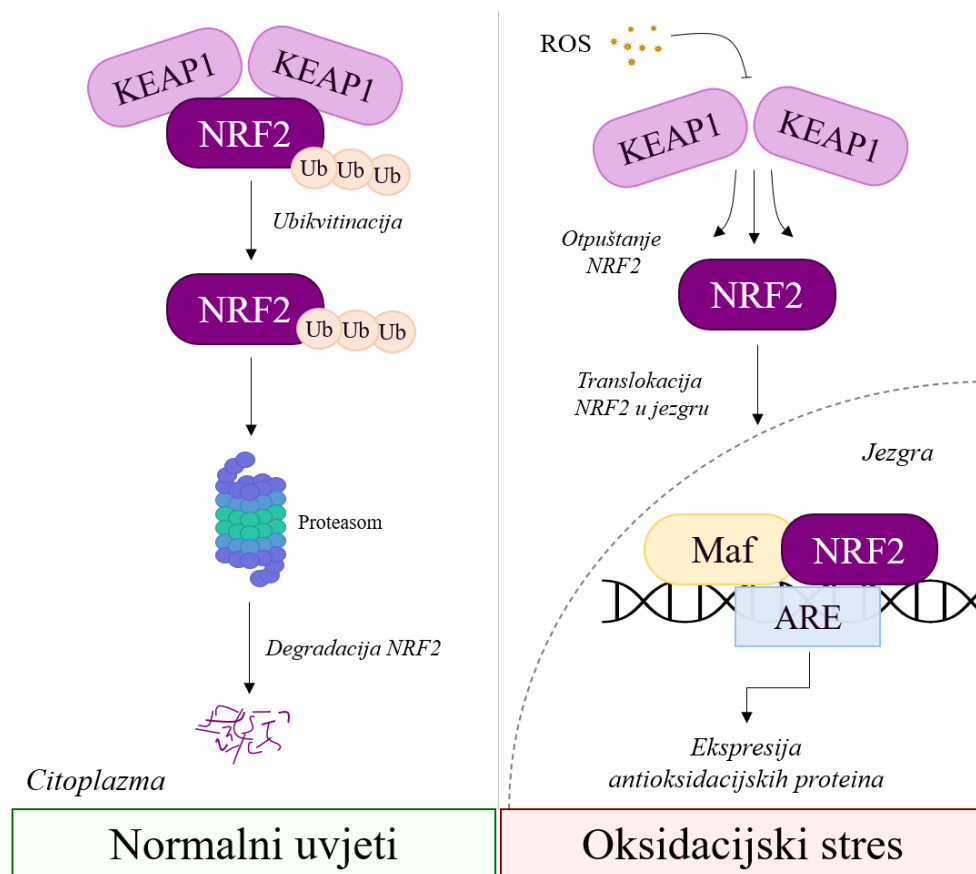
1.1.2.3. Indukcija antioksidansa

GSH, HO-1, NQO1, ali i ostali antioksidansi, induciraju se preko antioksidacijskog elementa odgovora (ARE, engl. *Antioxidant Response Element*) na podražaj OS-a (Pastore i sur. 2003; Ray i sur. 2012). ARE se nalazi u promotorima mnogih gena koji kodiraju za antioksidacijske i detoksikacijske enzime, odgovoran je za ekspresiju enzima bitnih za fazu 2 biotransformacije, kao i feritina (Kang i sur. 2005). Egzogeni ili endogeni ROS, poput vodikova peroksida, aktiviraju transkripciju antioksidacijskih gena preko ARE (Ray i sur. 2012). Ekspresija antioksidansa i detoksikacijskih enzima ovisi o aktivaciji ARE slijeda, a jedna od molekula odgovornih za tu aktivaciju je nuklearni eritroidni faktor 2 (NRF2, engl. *Nuclear-Factor Erythroid 2-Related Factor 2*).

² Glutation-S-transferaza (GST, engl. *Glutathione-S-Transferase*) je detoksikacijski enzim koji katalizira konjugaciju GSH-a na toksične ili karcinogene molekule i omogućava njihovu neutralizaciju (Liou i Storz 2010).

³ Glutathionilacija je posttranslacijska modifikacija proteina u kojoj se GSH kovalentno veže na cisteinske ostatke. Uloga glutathionilacije je zaštita i stabilizacija proteina, sprječavanje nepovratne oksidacije cisteina, regulacija transkripcije i aktivnosti enzima te kontrola nekih signalnih puteva (Pastore i sur. 2003; Dalle-Donne i sur. 2009).

NRF2 je transkripcijski faktor važan u održavanju redoks homeostaze. Zbog svoje citoprotektivne uloge smatra se tumor-supresorom. U stanju OS-a dolazi do pojačane ekspresije NRF2-reguliranih gena koji omogućavaju efektivniju eliminaciju ROS-a i ksenobiotika (Harder i sur. 2015). Neki od gena pod utjecajem NRF2 su oni za peroksiredoksine, sulforedoksine, tioredoksine, GSH, GPx i mnogi drugi. Osim OS-a, NRF2 mogu aktivirati i kinaze poput ERK (kinaza aktivirana izvanstaničnim signalom, engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*), JNK (kinaza koja fosforilira N-kraj transkripcijskog faktora c-Jun, engl. *c-Jun N-Terminal Kinases*) ili AMPK (protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom, engl. *5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase*) (Lennicke i sur. 2015). U fiziološkim uvjetima dolazi do aktivacije NRF2 kao odgovor na ROS. Kada se one eliminiraju, NRF2 se ponovno degradira. Ako dođe do nekih promjena i NRF2 više nije pod kontrolom, postaje stalno aktivan i ponaša se kao onkogen (Menegon i sur. 2016).



Slika 3. Redoks ovisna aktivacija NRF2

U uvjetima kada nije potreban, stanice stalno degradiraju NRF2 (nuklearni eritroidni faktor 2) preko sustava ubikvitin-proteasom (UPS, engl. *Ubiquitin-Proteasome System*)⁴. NRF2 se u citoplazmi nalazi u inaktivnom obliku vezan za represorski protein KEAP1 (engl. *Kelch-like ECH-Associated Protein 1*).

⁴ Ubikvitinacija je jedan od načina razgradnje proteina u eukariotskim stanicama. Protein ubikvitin djeluje kao biljeg za proteine i navodi ih do proteasoma gdje se uništavaju.

To je dimerni protein s veznim mjestom za NRF2 i mjestom koje prepoznaju ubikvitin ligaze te je odgovoran za slanje NRF2 u proteosomsku destrukciju (Harder i sur. 2015). Na taj se način NRF2 održava u niskoj koncentraciji i onemogućava se transkripcija nepotrebnih gena. U stanju OS-a dolazi do aktivacije NRF2, a vodikov peroksid je jedan od glavnih aktivatora NRF2 puta (Lennicke i sur. 2015) (Slika 3). KEAP1 djeluje kao redoks senzor te nakon oksidacije ROS-om (reaktivne kisikove vrste) dolazi do konformacijskih promjena i otpuštanja NRF2. Slobodan NRF2 se nakuplja u citoplazmi, otkuda se translocira u jezgru i dimerizira s MAF proteinom. U obliku heterodimera NRF2-MAF prepoznaje i veže se za ARE slijed (antioksidacijski element odgovora), a to pokreće ekspresiju antioksidacijskih i detoksikacijskih faktora. Kada dođe do obnavljanja redoks homeostaze, KEAP1 translocira u jezgru gdje veže NRF2 i ponovno pokreće proces degradacije.

Ostale kratice: Ub (ubikvitin).

1.2. Oksidacijski stres u karcinogenezi

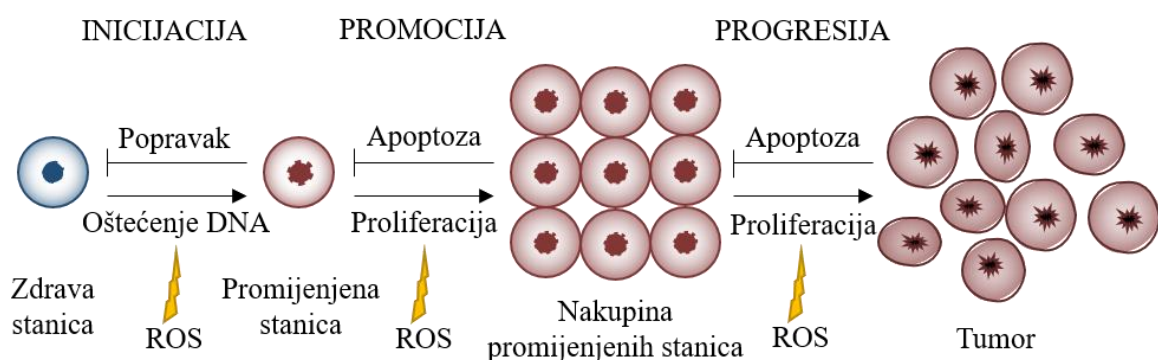
Zbog važne uloge u radu stanice nužna je stalna proizvodnja ROS-a, ali isto tako važna je i njegova eliminacija. U stanju OS-a dolazi do prekomjerne proizvodnje ili nedovoljne eliminacije ROS-a koji izazivaju različita oksidacijska oštećenja. Prilikom kronične izloženosti ona se nakupljaju i povezana su s razvojem različitih bolesti, uključujući i tumor (vidi poglavlje 1.3). ROS utječu na sve procese vezane uz nastanak i razvoj tumora: od inicijacije, proliferacije i progresije do apoptoze ili preživljenja tumorskih stanica, utječu na njihov metabolizam, morfologiju i adheziju te mogućnost metastaziranja (Liou i Storz 2010). Tumorske stanice koriste iste signalne puteve kao i zdrave stanice, ali one ih prenamjenjuju u svoju korist. Zdrave stanice, na podražaj citokina i hormona, stvaraju ROS u niskim fiziološkim koncentracijama pri čemu oni imaju ulogu sekundarnih glasnika koji potiču njihovu proliferaciju. Tumorske stanice na isti način potiču svoju proliferaciju, ali bez dobivenog signala (Burdon 1995). Zbog stalno aktivnih signala za rast, tumorske stanice mogu uzimati više nutrijenata, preživjeti veći stanični stres te posljedično proliferirati u puno većoj mjeri od zdravih stanica (Schieber i Chandel 2014). Uslijed ovakvog „hiper-metabolizma“ tumorske stanice produciraju puno veću razinu ROS-a od zdravih nepromijenjenih stanica (Szatrowski i Nathan 1991). Osim pojačanog metabolizma, tumorske stanice stvaraju više ROS-a zbog disfunkcije mitohondrija, povećane aktivnosti peroksisoma, oksidaza i oksigenaza, zbog pojačane unutarstanične signalizacije i aktivnosti onkogeni (Liou i Storz 2010). Budući je u tumorskih stanica prisutna viša koncentracija ROS-a u usporedbi sa zdravim stanicama, one se moraju adaptirati. Dolazi do metaboličkih adaptacija, kojima dobivaju više nutrijenata i energije, te do jačanja antioksidacijskog sustava. Kao i u zdravih stanica, ROS u tumoru mogu imati dvostruku ulogu. Protumorsku ili protutumorsku ulogu ROS-a definira vrsta stanica ili tkiva, mjesto na kojem radikali nastaju, njihova koncentracija i duljina izloženosti (Reuter i sur. 2010). ROS može

izazvati karcinogenezu, ali isto tako može djelovati protutumorski i izazivati smrt tumorskih stanica. Niska subletalna koncentracija ROS-a promovira proliferaciju (Burdon 1995), a visoka koncentracija izaziva apoptozu tumorskih stanica (Holmström i Finkel 2014). Upravo se na principu potenciranja ROS-a u tumorskih stanica bazira aktivnost kemo- ili radioterapije (Renschler 2004). Ujedno, bitna je duljina izloženosti jer dugotrajna izloženost OS-u može potaknuti nastanak rezistencije na apoptozu u tumorskih stanica (Brown i Bicknell 2001). Pri kroničnoj izloženosti OS-u tumorske stanice mogu postati rezistentne čak i na onu koncentraciju ROS-a koja je za njih bila pogubna pri akutnoj izloženosti; na ovaj se način, zbog dugotrajne primjene kemoterapije i selektivne adaptacije tumorskih stanica na nju, razvija rezistencija (Mahalingaiah i Singh 2014).

1.2.1. Uloga ROS-a u karcinogenezi

Zbog oksidacijskih oštećenja dolazi do trajnih promjena genomskog materijala ili promjena u ekspresiji gena koje mogu biti začetak mutageneze, karcinogeneze i starenja. ROS su mutageni koji mogu inicirati karcinogenezu direktno oksidacijom DNA, RNA i lipida ili indirektno mijenjajući stanične signalne puteve (Reuter i sur. 2010). Najveća oštećenja izaziva hidroksilni radikal koji može oštetiti DNA baze ili deoksiriboznu os i izazvati jedno- ili dvolančani lom DNA (Liou i Storz 2010). Uslijed netočne replikacije ili krivog popravka oštećene DNA baze nastaju mutacije poput supstitucija i delecija, a zbog pogrešnog popravka loma DNA nastaju kromosomske aberacije koje izazivaju amplifikacije, gubitak heterozigotnosti ili promjene u ekspresiji gena; sve pogreške koje nastaju mogu doprinijeti razvoju tumora (Bohr i sur. 1995; Valko i sur. 2004). Promjene uzrokovane ROS-om mogu inicirati apoptozu oštećene stanice, ali mogu dovesti i do aktivacije proto-onkogeni i/ili inaktivacije tumor-supresorskih gena koji će pokrenuti malignu transformaciju (Matés i Sánchez-Jiménez 2000). Primjer oksidacijskog oštećenja DNA je nastanak 8-hidroksigvanina (8-OH-G, engl. *8-hydroxyguanine*), mutagena i karcinogena koji se koristi kao biljeg u svrhu detekcije oksidacijskog oštećenja (Valko i sur. 2006). Osim direktnog učinka na DNA, hidroksilni radikal dovodi do karcinogeneze tako što reagirajući s fosfolipidima uzima elektron iz nezasićene masne kiseline i započinje lipidnu peroksidaciju. Tijekom lanca reakcija nastaje veliki broj radikala, a najbolje istraženi krajnji produkti su malondialdehid (MDA, engl. *Malondialdehyde*), akrolein i 4-hidroksinonenal (HNE, engl. *4-Hydroxynonenal*). MDA je mutagen i karcinogen koji reagira s DNA bazama stvarajući DNA adukte, a HNE ima vrlo jake učinke na signalne puteve unutar stanice (Valko sur. 2007; Milkovic i sur. 2015; Cipak Gasparovic i sur. 2017). Oksidacijom proteina mijenja se njihova struktura i funkcija te ovako

promijenjeni proteini mogu sudjelovati u promociji tumora. Može doći do aktivacije ili inhibicije nekih enzima (primjerice, DNA polimeraze koja ne može popraviti oštećenu DNA), do promjene receptora ili transkripcijskih faktora (primjerice, oksidacijom KEAP1 proteina omogućava se aktivnost NRF2 transkripcijskog faktora) te do promjene signalnih puteva unutar stanice (primjerice, aktivacija MAPK (protein kinaza aktivirana mitogenom, engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*)/AP-1 (aktivator proteina 1, engl. *Activator Protein 1*) i NF- κ B (jezgrin faktor kapa B, engl. *Nuclear Factor Kappa B*) signalnih puteva koji promiču proliferaciju stanica) (Klaunig i sur. 1998; Liou i Storz 2010). ROS izazivaju abnormalnu ekspresiju gena, zaustavljaju međustaničnu komunikaciju i mijenjaju signalne puteve unutar stanice što rezultira proliferacijom i izbjegavanjem apoptoze tumorskih stanica (Klaunig i sur. 1998). Nakon maligne transformacije, tumorske stanice i dalje imaju povišenu razinu ROS-a koja održava onkogeni fenotip i potiče progresiju tumora (Storz 2005). ROS sudjeluju u svim koracima karcinogeneze (Slika 4) te je nazočni OS povezan s nastankom tumora, ali i s njegovim napredovanjem. ROS aktivira MAPK i PKC (protein kinaza C, engl. *Protein Kinase C*) te transkripcijske faktore poput NF- κ B, HIF-1 α (hipoksijom inducirani faktor 1-alfa, engl. *Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha*), AP-1 ili STAT3 (prenosilac signala i aktivator transkripcije 3, engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) koji kontroliraju ekspresiju proteina uključenih u upalu, transformaciju stanica te preživljenje, proliferaciju, invaziju, angiogenezu i metastaziranje tumorskih stanica (Kang i sur. 2005; Gupta i sur. 2012). Pojačana endogena produkcija ili egzogena primjena ROS-a, kao i smanjena antioksidacijska obrana, potiču staničnu proliferaciju.



Slika 4. Proces nastajanja tumora

Promijenjena inicirana stanica još nije tumorska jer postoje načini popravka, ali ako do njih ne dođe, a dođe do dodatnih oštećenja, započinje faza promocije. Sada nema mogućnosti popravka niti apoptoze oštećene stanice, a ona se nekontrolirano dijeli. Svakim daljnjim oštećenjem mogu nastati dodatne promjene koje daju tumorskim stanicama nove prednosti poput angiogeneze, invazije i metastaziranja. Kratice: ROS (reaktivne kisikove vrste).

1.2.1.1. Utjecaj vodikova peroksida

Vodikov peroksid nije radikal, ali spada u ROS. Za razliku od superoksidnog aniona i hidroksilnog radikala, uključen je u različite fiziološke procese uključujući prijenos signala, proliferaciju i diferencijaciju stanica, metabolizam te modulaciju imunološkog odgovora (Lennicke i sur. 2015; Di Marzo i sur. 2018). Zbog stabilnosti i slabije reaktivnosti djeluje kao sekundarni glasnik. Također je uključen u procese apoptoze, autofagije, hipoksije, upale, zacjeljivanja rana, kontrakcije mišića i mnogih drugih (Sies 2017). Vodikov peroksid nastaje i eliminira se u stanici metodama opisanim u odlomku 1.1.1.1. Njegova difuzija kroz membranu je posredovana specifičnim kanalima nazvanima akvaporini (AQP, engl. *Aquaporin*)⁵. Nastanak i eliminacija vodikova peroksida te održavanje njegove fiziološke koncentracije bitne za rad stanice dobro su kontrolirane u zdravih stanica. Budući da on sudjeluje u diferencijaciji, rastu i preživljavanju stanica, njegova koncentracija je često povišena u tumorskih stanica kako bi im omogućio navedene karakteristike (Szatrowski i Nathan 1991; Burdon 1995). Bitno je naglasiti da je njegova uloga dvojaka te ovisna o koncentraciji i mjestu nastanka, zbog čega ju je potrebno održavati u ravnoteži, jer previsoka razina vodikova peroksida može zaustaviti stanični ciklus i inducirati apoptozu tumorskih stanica. Zato su u tumora antioksidacijski mehanizmi zaštite također pojačani te ih štite od oksidacijskih oštećenja i smrti (Lennicke i sur. 2015). Dakle, tumori imaju povišenu razinu ROS-a, ali i antioksidacijske zaštite, kako bi kontrolirali njihovu postojeću razinu, zbog čega se dodavanjem ROS-a, ovisno o količini, osim navedenog poticanja proliferacije, može potaknuti i apoptozu tumorskih stanica. Protumorska ili antitumorska uloga vodikova peroksida ovisi o njegovoj koncentraciji kao i lokaciji na kojoj nastaje: niža potiče proliferaciju, rast i rezistenciju tumora dok previsoka izaziva apoptozu. Tako se karakteristika tumora, prisustvo više razine ROS-a nego u zdravih stanica, može iskoristiti kao potencijalna strategija protiv njega u antitumorskoj terapiji.

1.2.2. Uloga antioksidansa u karcinogenezi

Antioksidansi su zaduženi za eliminaciju ROS-a, stoga bi se mogli koristiti za sprječavanje karcinogeneze. Da bi se to dogodilo, moraju očuvati regulaciju staničnog ciklusa, inhibirati proliferaciju i potaknuti apoptozu tumorskih stanica, smanjiti upalu i stimulirati detoksikacijske enzime (Valko i sur. 2007). Međutim, kao i ROS, antioksidansi imaju dvostruku ulogu u karcinogenezi. Oni štite stanice od oksidacijskih oštećenja - u zdravih stanica

⁵ Akvaporini ili kanali za vodu su membranski proteini koji omogućavaju transport vode preko stanične membrane u ovisnosti o osmotskom gradijentu.

je to poželjno i može spriječiti karcinogenezu, ali isti mehanizmi odvijaju se i u tumorskih stanica te ih antioksidansi štite i omogućavaju im daljnji rast. Visoka razina ROS-a u tumorskih stanica uravnotežena je visokom razinom antioksidansa koji održavaju redoks ravnotežu, dok bi u protivnom i tumorske stanice mogle podleći oksidacijskim oštećenjima i posljedičnoj smrti (Schieber i Chandel 2014). Iako visoka razina ROS-a pokreće apoptozu stanica tumora, one se jednako tako mogu prilagoditi na OS regulacijom antioksidansa koji potiču njihovo preživljenje i razvoj rezistencije (Liou i Storz 2010). Zato primjena antioksidacijske terapije u pacijenata s postojećim tumorom može napraviti još veću štetu, budući da dodatno stimulira rast tumora i potiče preživljenje tumorskih stanica (Valko i sur. 2007; Milkovic i sur. 2014).

Povećana proizvodnja ROS-a u tumorskih stanica povezana je i s većim antioksidacijskim kapacitetom. Jedan od važnih načina kojim se tumorske stanice brane od oksidacijskih oštećenja je aktivacija NRF2 transkripcijskog faktora oksidacijom KEAP1 proteina (Schieber i Chandel 2014). U zdravih stanica i ranijim fazama razvoja tumora NRF2 održava redoks homeostazu, sprječavajući oksidacijska oštećenja poticanjem eliminacije ROS-a, i na taj način može spriječiti ili zaustaviti karcinogenezu. S druge strane, on može i potaknuti karcinogenezu tako što smanji potrebnu razinu ROS-a koja bi aktivirala apoptozu u promijenjenim stanicama (Milkovic i sur. 2017). Otkriće uloge GSH i tioredoksin signalnih puteva (koji su aktivirani posredstvom NRF2) u razvoju tumora govori u prilog njegove uloge u inicijaciji karcinogeneze (Harris i sur. 2015). Nadalje, njegova protumorska uloga očituje se i u zaštiti tumorskih stanica od oksidacijskih oštećenja, istovjetnoj kao u zdravih stanica. Dakle, kontrolirani NRF2 ima citoprotektivnu ulogu i može spriječiti inicijaciju tumora, ali njegova pojačana aktivacija u tumorskim stanicama, štiteći ih od oksidacijskih oštećenja doprinosi razvoju tumora i omogućava im stvaranje rezistencije (Harder i sur. 2015). Tumorske stanice na nekoliko načina mogu postići stalnu aktivnost NRF2. Može doći do mutacija unutar KEAP1, NRF2 ili UPS koje dovode do pojačane aktivacije NRF2, može doći do njegove prekomjerne ekspresije ili posttranslacijskog utišavanja KEAP1, a do pojačane aktivnosti može doći i zbog aktivnosti onkogena *K-Ras*, *B-Raf* ili *Myc* (Harder i sur. 2015). U različitim je tumorskih stanica pokazana povećana ekspresija NRF2 koja je povezana s progresijom i razvojem tumora, stvaranjem rezistencije na kemoterapiju i lošijom prognozom za pacijenta (Lau i sur. 2008; Lennicke i sur. 2015). Zbog aktivacije NRF2 pokazana je povećana ekspresija GST, GPx i GSH (Reuter i sur. 2010). Aktivacijom transkripcijskih faktora NF- κ B, HIF-1 α ili NRF2 potiče se antioksidacijska obrana tumorske stanice i dolazi do pojačane aktivnosti SOD, GPx, CAT ili nekog drugog antioksidansa uključenog u eliminaciju ROS-a (Gupta i sur. 2012). U raznih tumora uočena je

povišena razina GSH koja pomaže razvitku rezistencije tumorskih stanica na kemoterapiju. Način na koji GSH svojim antioksidacijskim i detoksikacijskim sposobnostima štiti zdrave stanice, isti je i u tumorskih stanica. Ovaj oblik zaštite tumorskim stanicama omogućava preživljenje i razvitak rezistencije, budući da GSH konjugira i izbacuje citotoksične lijekove koji se primjenjuju (Balendiran i sur. 2004). Zbog povišene razine ROS-a kojeg GSH uklanja, povećava se koncentracija GSSG u odnosu na GSH i značajno se smanjuje GSH/GSSG omjer u krvi pacijenata s tumorom kolona i dojke (Valko i sur. 2006). Tumorske stanice iskorištavaju i HO-1 u svoju korist, pa je u tumorskih stanica često viša ekspresija HO-1 nego u okolnom tkivu. Budući ima citoprotektivnu ulogu, HO-1 štiti stanice, bilo zdrave bilo tumorske. HO-1 djeluje protumorski jer sudjeluje u progresiji tumora, nastajanju metastaza i stvaranju rezistencije (Dulak 2007). Također, potiče vaskularizaciju i angiogenezu u tumoru, što omogućava brži rast i metastaziranje (Bahmani i sur. 2011). Zbog citoprotektivne uloge i NQO1 je često prekomjerno eksprimiran u tumorskih stanica, a postoje i mutacije u *NQO1* genu povezane s nastankom tumora. Također, pokazana je veza između povišene razine NQO1 i stupnja diferenciranosti, višeg stadija, postojanja metastaza i prekomjerne ekspresije HER2, što ukazuje na ulogu NQO1 u inicijaciji, progresiji, invaziji i metastaziranju (Yang i sur. 2014).

1.2.3. Oksidacijski stres i metabolizam tumora

Tumorske stanice mijenjaju svoj metabolizam kako bi što bolje iskoristile nutrijente i energiju u svrhu brze proliferacije i rasta. Promjene koje se događaju uključuju pojačano korištenje glikolize, indukciju puta pentozna-fosfata (PPP, engl. *The Pentose Phosphate Pathway*), pojačan metabolizam aminokiselina i lipida te biosintezu makromolekula (Phan i sur. 2014). Tumorske stanice imaju visoku razinu aerobne glikolize, koju inače zdrave stanice koriste samo u anaerobnim uvjetima, stoga se ovaj fenomen naziva Warburgov učinak (Holmström i Finkel 2014). Razgradnjom glukoze do piruvata u glikolizi nastaju samo 2 adenozin trifosfata (ATP, engl. *Adenosine Triphosphate*), što tumor nadoknađuje povećanom ekspresijom glukoznih transportera i pojačanim unosom glukoze u stanice (Phan i sur. 2014). Osim za nastanak ATP-a, glikoliza je bitna jer nastaju prekursori kao što je glukoza-6-fosfat, koja se koristi u PPP-u za povećanu produkciju NADPH, a on se iskorištava za regeneraciju GSH-a i detoksikaciju (Holmström i Finkel 2014; Phan i sur. 2014).

Enzim koji je indirektno bitan u odgovoru na oksidacijski stres, je AMPK. To je unutarstanični energetska senzor koji je uključen u održavanje homeostaze stanične energije te metabolizma glukoze (Hardie i Carling 1997). Aktivni oblik AMPK je fosforilirani: p-AMPK,

a njegova aktivacija povezana je s aktivacijom drugih antioksidacijskih enzima. AMPK se aktivira u stanju metaboličkog stresa, nedostatka nutrijenata i hipoksije, odnosno uslijed nedostatka ATP-a čime se snižava njegova razina u odnosu na adenzin monofosfat (AMP, engl. *Adenosine Monophosphate*) ili adenzin difosfat (ADP, engl. *Adenosine Diphosphate*) (Hardie 2011). Također, aktivira se zbog porasta koncentracije unutarstaničnog kalcija prilikom manjka glukoze ili oštećenja DNA (Vara-Ciruelos i sur. 2019). Glavna uloga AMPK je metaboličko reprogramiranje s anabolizma na katabolizam kako bi se omogućilo preživljenje stanice. Dakle, inhibiraju se putevi u kojima se energija troši, a promoviraju se oni u kojima nastaje. Potiče se unos glukoze u stanice aktivacijom glukoznih transportera te unos masnih kiselina translokacijom transportera za masne kiseline, promovira se glikoliza, oksidacija masnih kiselina i stvaranje novih mitohondrija (Hardie 2011). Osim što potiče nastanak novih mitohondrija, AMPK sudjeluje u degradaciji starih. Budući su mitohondriji jedan od glavnih izvora ROS-a u stanici, starenjem se povećava mogućnost njihova nastanka i pojavnost oksidacijskih oštećenja. Uz promociju nastanka ATP-a, AMPK sprječava njegovo trošenje pa tako inhibira ekspresiju i aktivnost enzima bitnih za sintezu proteina i masnih kiselina, sprječava glukoneogenezu te zaustavlja stanični ciklus (Hardie 2011). Budući da brza proliferacija i rast stanica iziskuju puno nutrijenata, sinteza proteina i lipida mora biti stalno aktivna. Zbog mogućnosti zaustavljanja proliferacije i staničnog ciklusa, AMPK se može smatrati tumor-supresorom. Njegova tumor-supresorska uloga dokazana je nižom pojavnošću tumora u dijabetičara koji su koristili lijek za inhibiciju produkcije glukoze koji istovremeno aktivira AMPK (Evans i sur. 2005). *In vitro* je pokazan isti učinak povišenja razine AMPK na stanicama tumora dojke, gdje je isti lijek imao antiproliferativni i proapoptotski učinak (Queiroz i sur. 2014). Osim toga, El-Masry i sur. (2012) su aktivacijom AMPK spriječili proliferaciju i potaknuli apoptozu stanica tumora dojke. AMPK je tumor-supresor u slučaju kada štiti zdrave stanice i sprječava proliferaciju tumorskih stanica. Ako dođe do gubitka AMPK prije inicijacije tumora, omogućava se proliferacija i rast tumorskih stanica. Može doći do gubitka funkcije AMPK radi mutacije, nemogućnosti aktivacije te zbog prejake aktivacije protein kinaze B (PKB, engl. *Protein Kinase B*) koje se javljaju u mnogih tumorima (Queiroz i sur. 2014). Kada tumor nastane, AMPK djeluje kao tumor-promotor i štiti stanice od manjka kisika i nutrijenata te oksidacijskog stresa (Vara-Ciruelos i sur. 2019). Visoke razine AMPK u postojećem tumoru promoviraju njegov rast i proliferaciju.

1.3. Tumor dojke

Maligni tumori⁶ su jedan od najvećih zdravstvenih problema naše svakodnevice. Iako se rade brojna istraživanja i došlo je do mnogih napredaka u dijagnozi i liječenju, i dalje nije riješen problem porasta učestalosti jednog od najvećih uzročnika smrtnosti. Tumor dojke drugi je najčešći tumor u oba spola i najčešći tumor u žena gdje čini čak 24 % dijagnosticiranih tumora, također vodeći je uzrok smrtnosti od tumora u brojnim zemljama (Bray i sur. 2018). Iako postoje nasljedni i genetski čimbenici koji uzrokuju tumor dojke u 5-10 % slučajeva, on većinom nastaje zbog nenasljednih faktora. Tumor dojke heterogena je bolest koja se razlikuje u patološkim obilježjima, odgovoru na terapiju i preživljenju pacijenata. Zbog tih razlika bitna je klasifikacija tumora dojke koja omogućava selekciju pacijenata te davanje odgovarajuće prognoze i terapije.

1.3.1. Klasifikacija tumora dojke

Tumor dojke nastaje unutar tkiva dojke. Maligni tumor koji nastaje iz epitelnih stanica naziva se karcinom, iz stanica vezivnog tkiva nastaje sarkom te unutar limfnih čvorova može nastati limfom. Najčešći su karcinomi, duktalni koji nastaju iz mliječnih kanalića i lobularni koji nastaju iz mliječnih žlijezda u dojci. Ako je karcinom, duktalni ili lobularni, ograničen na epitelno tkivo dojke u kojem je nastao nazivamo ga lokaliziranim ili karcinomom *in situ*, kada karcinom probije bazalnu membranu i infiltrira okolno tkivo dojke klasificiramo ga kao invazivni ili infiltrativni karcinom (Makki 2015).

Osim podjele na histološkoj, tumor dojke možemo klasificirati i na molekularnoj razini. Proučavajući varijacije u ekspresiji gena povezane s kliničkim ishodom unutar grupe pacijenata s tumorom dojke, Perou i sur. (2000) prvi su opisali način klasifikacije na molekularnoj razini koji uključuje podjelu tumora dojke na četiri tipa: luminalni, bazalni, HER2 (humani epidermalni faktor rasta 2, engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) pozitivni i normalni. Uz ovu podjelu, opisana je i podjela s obzirom na izraženost receptora za estrogen (ER, engl. *Estrogene Receptor*), gdje je samo luminalni tip tumora ER pozitivan, odnosno ovisan o estrogenu. Daljnjim se istraživanjima uvidjelo da postoje razlike u prognozi unutar grupe luminalnog tipa tumora dojke, pa su se i oni razdijelili u luminalni tip A s boljom i

⁶ Maligni tumor ili neoplazma označava nakupinu promijenjenih stanica nekog tkiva koja nema fiziološku funkciju i ne odgovara na signale iz okoliša. Promjene koje obilježavaju tumorske stanice i razlikuju ih od zdravih su nekontrolirana proliferacija, izbjegavanje supresora rasta, mogućnost invazije i metastaziranja, neograničeni replikacijski potencijal, indukcija angiogeneze i izbjegavanje apoptoze (Hanahan i Weinberg 2000).

luminalni tip B s lošijom prognozom (Sørlie i sur. 2001). Iako je moguće detektirati razlike i klasificirati tumor dojke na osnovu varijacija u ekspresiji gena, ova je metoda vrlo kompleksna te zbog toga neprimjenjiva u klinici gdje ju je zamijenila provjera proteinskih biomarkera imunohistokemijskim bojanjem⁷. Provjerom izraženosti receptora za estrogen, progesteron (PR, engl. *Progesterone Receptor*) i HER2 te sljedbom pripadajućeg imunohistokemijskog algoritma vrši se klasifikacija tumora dojke u spomenute tipove. Hormonski pozitivan ili luminalni tip tumora je onaj koji odgovara na utjecaj hormona (primjerice, estrogena) zbog izraženih hormonskih receptora (Gurer-Orhan i sur. 2017). Luminalni tip A je sporo-rastući, manje agresivan tumor koji se zbog prisutnosti ER i PR može tretirati hormonskom terapijom, radi toga ima najbolju prognozu i visoko preživljenje (Sørlie i sur. 2001). Za razliku od njega, luminalni tip B, osim ER i PR, izražava i HER2 te ima lošiju prognozu. Tumor koji ima prekomjernu izraženost HER2, ali nema izražene ER i PR, je HER2 pozitivni tumor. On je agresivniji od ostalih i ima lošiju prognozu, ali se zbog primjene ciljane terapije uz kemoterapiju lakše liječi od trostruko negativnog tipa (Gurer-Orhan i sur. 2017). Ako je tumor negativan za sva tri provjerena proteinska biljega on je trostruko negativan ili bazalan tip tumora dojke. Ovaj tip tumora je agresivan i invazivan te ima najlošiju prognozu, zbog nemogućnosti primjene hormonske ili ciljane terapije jedini način liječenja je kemoterapija (Gurer-Orhan i sur. 2017).

Tumor dojke može se klasificirati na različite histološke i molekularne načine, ali svi imaju istu svrhu – klasificirati pacijente prema razlikama bitnim za prognozu i liječenje. Molekularnim se metodama danas može pronaći ogroman broj razlika i sličnosti u grupama pacijenata, ali bitno je da li ta razlika nosi klinički značaj. Klasifikacija na osnovu izraženosti ER, PR i HER2 dovoljno je jednostavna kako bi se rutinski koristila, a omogućuje davanje prognoze i najprikladnije terapije.

⁷ Imunohistokemija je metoda koja se koristi za vizualizaciju staničnih komponenti, primjerice proteina, u uzorku tkiva koristeći specifična antitijela vezana na enzim ili fluorescentnu boju. Rezultat se očitava na svjetlosnom ili fluorescentnom mikroskopu.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Poznata je dvojaka uloga ROS-a ovisna o njihovoj koncentraciji koja uključuje njihov doprinos u odvijanju fizioloških procesa, dok su više koncentracije uključene u razne patološke procese. Nadalje, u tumorskih je stanica, u odnosu na zdrave, pokazana viša razina ROS-a koje dodatno stvara i protutumorska terapija. Kako ne bi došlo do oksidacijskih oštećenja i smrti tumorskih stanica u njima dolazi do pojačanja antioksidacijske zaštite koja im omogućava preživljenje i neometani rast. Iako u zdravih stanica aktivacija antioksidacijske zaštite djeluje protutumorski, antioksidansi u tumorskih stanica djeluju protutumorski. Ali ništa nije jednostavno, pa tako osim navedene protumorske uloge ROS-a, poznata je i njihova protutumorska uloga. Stvaranjem previsokih koncentracija ROS-a koje se ne mogu dostatno eliminirati, čak i tumorske stanice mogu podleći oksidacijskim oštećenjima i smrti. Tumor dojke jedan je od najčešćih tumora naše svakodnevice, poznat po svojoj heterogenosti. Budući da različiti tipovi tumora dojke ne reagiraju isto na terapiju, vjerojatno je i da postoje razlike u odgovoru na oksidacijski stres kao i u antioksidacijskom kapacitetu.

Cilj ovog rada je ispitati odgovor stanica tumora dojke na vodikovim peroksidom izazvani OS. U ovisnosti o dodanoj koncentraciji i duljini izloženosti vodikovom peroksidu, pratit će se promjene u staničnoj vijabilnosti, unutarstaničnoj razini ROS-a, antioksidacijskom kapacitetu i metabolizmu stanica te tako ispitati razlikuje li se odgovor tijekom kratkotrajne i dugotrajne izloženosti oksidacijskom stresu. Pri tome će se pratiti promjene u aktivnosti CAT i koncentraciji GSH kao bitnih antioksidansa u borbi protiv OS-a. Provjerit će se izraženost glavnog regulatora transkripcije za antioksidacijske i detoksikacije enzime, NRF2. Nadalje, istražiti će se izraženost antioksidacijskih enzima HO-1 i NQO1. Za provjeru da li dolazi do metaboličke adaptacije tumorskih stanica, pogledat će se izraženost fosforiliranog i nefosforiliranog oblika AMPK. Usporedit će se i razlike u odgovoru na izazvani OS između tri različite stanične linije tumora dojke (MCF-7 (hormonski pozitivne), SkBr-3 (HER2 pozitivne) i SUM 159 (trostruko negativne) koje danas predstavljaju osnovni način klasifikacije u klinici.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj stanica

Rad sa staničnim kulturama odvijao se u zaštitnom kabinetu za rad u sterilnim uvjetima u sterilnoj prostoriji. Uzgoj stanica, manipulacija, nasađivanje i tretmani isti su za sve tri stanične linije tumora dojke korištene u svrhu ovog istraživanja: MCF-7 (hormonski pozitivna), SkBr-3 (HER2 pozitivna) i SUM 159 (trostruko negativna).

Podaci o korištenim kemikalijama koji nisu navedeni u tekstu nalaze se u prilogu (odlomak 8).

Stanice se čuvaju u krio tubicama u tekućem dušiku na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kada su bile potrebne za pokus, izvade se i stave u čašicu s malo hladne vode kako bi se otopile. Otopljena suspenzija umiješana je u 4 mL medija za uzgoj stanica (DMEM s 10 % FCS-om (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); dalje u tekstu: medij) u staklenoj epruveti, a potom centrifugirana 5 minuta na 1300 rpm u centrifugi za staklene epruvete Heraeus Function Line Labofuge 400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Supernatant se izlio, a talog resuspendirao u 1 mL medija i prebacio u bocu za uzgoj stanica TC Flask T75, Cell+, Vented Cap (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) u koju je prethodno dodano 9 mL medija. Stanice su uzgajane u inkubatoru za uzgoj stanica Heraeus Hera Cell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 5 % CO_2 . Rasle su u eksponencijalnoj fazi rasta te su prije konfluentnosti (faze usporenog rasta) tripsinizirane tako što se prvo medij odvodio iz boce, isprane su jednom s PBS-om (137 mM NaCl, 10 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl) te se dodalo 1-2 mL tripsina s 0,25 % EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*) i sačekalo 5 min. Kada su se stanice zaokružile i odlijepile od površine, u bocu se dodao medij koji inhibira djelovanje tripsina, a zatim se sav sadržaj iz boce prebacio u označenu staklenu epruvetu. Manji volumen stanica razrijedio se 2x ili 10x s tripanskim modrilom i žive stanice su izbrojane u Bürker-Türk-ovoj komorici pod invertnim mikroskopom Axiovert 25 (ZEISS, Oberkochen, Njemačka). Prema Jednadžba 6 izračunao se broj stanica u suspenziji. Prebrojane stanice su smrjavane, dalje nasađivane u bocu ili ostavljane za pokus.

Jednadžba 6. Izračunavanje broja stanica

$$\text{Broj stanica} = \frac{\text{izbrojane stanice}}{\text{broj polja}} * \text{volumen polja} * \text{faktor razrjeđenja} * \text{volumen suspenzije}$$

Sve stanice su centrifugirane 5 minuta na 1300 rpm. Smrzavalo se 2-3 milijuna stanica u 1 mL medija za smrzavanje (DMEM:FCS:DMSO = 4:5:1) u krio tubicama. Talog stanica izdvojenih za pokus se resuspendirao u 1 mL medija i stanice su ponovno izbrojane. Izračunat je volumen suspenzije stanica koji je potrebno uzeti da bi se nasadio potreban broj stanica za pokus. Stanice su paralelno nasađivane za kratkotrajne i dugotrajne pokuse. Ostavljane su 24 sata kako bi se zalijepile za površinu i povratile svoja svojstva te su zatim tretirane rastućim koncentracijama vodikova peroksida (2,5 – 100 μ M; Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska). Prilikom kratkotrajne izloženosti (KT) stanice su tretirane jednom te se nakon 24 sata mjerila stanična vijabilnost (MTT test), razina ROS-a te su izolirani proteini za WB analizu i mjerenje GSH i CAT. Dugotrajna izloženost je uključivala 3 uzastopna tretmana vodikovim peroksidom svakih 48 sati. Svakom sljedećem tretmanu stanicama je prethodilo odstranjivanje starog medija te dodatak odgovarajućeg novog tretmana. Nakon zadnjih 48 sati (sedmi dan od nasađivanja) su napravljene odgovarajuće analize ili pripreme za iste.

3.2. Mjerenje stanične vijabilnosti

Stanične vijabilnosti mjerene su komercijalnim kompletom EZ4U (MTT test; Biomedica, Beč, Austrija) prema uputama proizvođača. Test se bazira na redukciji bezbojne tetrazolijeve soli u obojene, topive derivate formazana koji se izlučuju u medij, a čiji se intenzitet očitava na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini 450 nm, uz referentnu valnu duljinu 620 nm. Budući da ovu reakciju mogu obavljati samo žive stanice, razvijena boja proporcionalna je njihovom broju.

U svrhu mjerenja stanične vijabilnosti MTT testom nasađivano je 5000 stanica u 100 μ L medija po jednoj jažici prozirne mikrotitarske pločice s 96 jažica (TPP, Trasadingen, Švicarska). Triplikat ili kvadruplikat stanica je rađen po svakom tretmanu te heksaplikat ili octaplikat kontrola. Stanice su ostavljene 24 sata prije nego su tretirane vodikovim peroksidom u rasponu koncentracija od 2,5 do 100 μ M. Izloženost tako tretiranih stanica je bila kratkotrajna (24 sata) i dugotrajna (sedam dana, odnosno tri uzastopna tretmana vodikovim peroksidom u trajanju od 48 sati svaki). Prije kapanja reagensa mijenjao se medij kako fenol crveno ne bi utjecalo na očitavanje apsorbancije te dodavalo 200 μ L bezbojnog medija (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). U svaku jažicu je dodano 20 μ L prethodno pripremljenog reagensa za MTT test, napravljenog miješanjem tetrazolijeve soli u 2,5 mL aktivatora dok se ne otopi. Apsorbancija je očitavana na čitaču mikrotitarskih pločica Multiskan EX (Thermo Electron

Corporation, Shanghai, Kina) na 450/620 nm u vremenskim intervalima od 30 min tijekom dva sata. Podaci su izraženi kao postotak u odnosu na kontrolu.

3.3. Mjerenje razine unutarstaničnog ROS-a

Unutarstanična razina ROS-a izmjerena je koristeći DCFH-DA (diklor-dihidro-fluorescein diacetat, engl. *2'-7'Dichlorofluorescein Diacetate*). Princip ovog testa je oksidacija nefluorescentnog DCFH-DA u fluorescentni oblik koji se očitava pri ekscitaciji/emisiji na 500/529 nm. Nakon kapanja DCFH-DA na stanice, on prolazi membranu i ulazi u citoplazmu gdje ga deacetiliraju esterase. Deacetilirani DCFH podložan je oksidaciji koju obavlja unutarstanični ROS, nastaje fluorescentni oblik DCF čiju fluorescenciju pratimo. Količina unutarstaničnog ROS-a proporcionalna je oksidaciji DCFH-DA, stoga se tako može kvantificirati i uspoređivati unutar grupe uzoraka.

Za mjerenje unutarstanične razine ROS-a nasađivano je 5000 stanica u 100 μ L bezbojnog medija po jednoj jažici crne mikrotitarske pločice s 96 jažica (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija). Triplikat ili kvadruplikat stanica je rađen po svakom tretmanu te heksaplikat ili octaplikat kontrola. Stanice su ostavljene 24 sata prije inkubacije s DCFH-DA i tretmana vodikovim peroksidom u rasponu koncentracija od 2,5 do 100 μ M. Zbog izuzimanja utjecaja fenolnog crvenila, korišten je bezbojni medij prilikom nasađivanja stanica i tretmana pri kratkotrajnoj (KT) izloženosti, odnosno kod zadnjeg tretmana pri dugotrajnoj izloženosti (DT). U KT, 24 sata nakon nasađivanja prije dodatka tretmana, a u DT prije zadnjeg tretmana dodavano je 20 μ L DCFH-DA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) po jažici, finalne koncentracije 10 μ M te su stanice inkubirane 60 min.. Sav rad obavljan je u mraku. Nakon inkubacije zamijenjen je medij i nakapan odgovarajući tretman. Mjerenje fluorescencije na čitaču mikrotitarskih pločica Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švicarska) obavljano je prije tretmana, odmah nakon te u 10. minuti pa svakih 60 minuta tijekom 5 sati i nakon 24 odnosno 48 sati. Podaci su izraženi kao RFU (engl. *Relative Fluorescence Units*) u vremenu te kao razina ROS-a nastala tijekom 24 sata za KT odnosno 48 sati za DT koja je dodatno korigirana prema staničnoj vijabilnosti za pojedini tretman vodikovim peroksidom.

3.4. Mokri prijenos proteina na membranu

Mokri prijenos proteina na membranu (engl. *Western blot*) je imunokemijska metoda koja se koristi za dokazivanje specifičnih proteina u uzorku, odnosno smjesi proteina, korištenjem označenih specifičnih antitijela (Towbin i sur. 1979).

Za mokri prijenos proteina na membranu nasađivano je 50000 stanica u 1 mL po jednoj jažici prozirne mikrotitarske pločice s 12 jažica (TPP, Trasadingen, Švicarska). Stanice su za DT nasađivane u duplikatu, a za KT u kvadriplikatu kako bi se izolirala dovoljna koncentracija proteina. Nakon 24 sata, stanice su tretirane s 10, 20, 30 i 40 μM vodikovim peroksidom. Izolacija proteina je bila 24 sata nakon tretmana za KT i 48 sati nakon trećeg tretmana, odnosno 7. dan za DT. Iz jažica je prvo odsisan medij, a zatim su dvaput isprane PBS-om. Za lizu stanica dodavano je 30 μL RIPA pufera (50 mM Tris-Cl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS) s 1 % inhibitorom proteaza po jažici za kratkotrajni pokus i 40 μL za dugotrajni pokus. Stanice su inkubirane 5 minuta na ledu, postrugane strugačem, prebačene u mikroepruvete te centrifugirane 10 minuta na 13400 rpm u centrifugi MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Supernatanti s proteinima su prebacivani u nove mikroepruvete, a talog s DNA, RNA i smećem je bačen. Koncentracija proteina u uzorcima izmjerena je prema protokolu kojeg je predložio Bradford (1976)⁸. Kao standard korištene su koncentracije BSA (goveđi serumski albumin, engl. *Bovine Serum Albumin*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) u rasponu od 0,03 do 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ u 20 % RIPA u PBS-u, zbog čega su uzorci prije mjerenja razrijeđeni 5x u PBS-u. Na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica otpipetirano je 5 μL standarda ili uzorka u tehničkim duplikatima. Nakon toga nakapano je 200 μL pripremljenog reagensa za bojanje proteina (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, SAD), sačekalo se 5 minuta da se boja razvije i stabilizira te izmjerilo na čitaču mikrotitarskih pločica Multiskan EX na 620 nm. Nepoznate koncentracije proteina u našim uzorcima izračunate su koristeći metodu linearne regresije prema baždarnoj krivulji ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA, prema Jednadžba 7. Ako su proteini razrjeđivani, dobivena vrijednost množena je s razrjeđenjem. Koncentracija proteina izražavana je kao μg proteina/ μL .

Jednadžba 7. Izračunavanje koncentracije proteina iz baždarne krivulje

$$\text{Koncentracija proteina} = \frac{\text{Apsorbancija uzorka} - \text{Odsječak na Y osi}}{\text{Nagib pravca baždarne krivulje}} * \text{Razrjeđenje}$$

Prethodno određene koncentracije proteina u uzorcima su podešene na istu vrijednost nanosa proteina po jažici gela. Uzimana je vrijednost uzorka s najmanjom koncentracijom. U PCR mikroepruvetu pipetiran je izračunati volumen svakog uzorka, PBS do 16 μL te je dodano 4 μL pufera za nanošenje uzoraka (125 mM Tris HCl, 4 % SDS, 150 mM DTT, 20 % glicerol,

⁸ Metoda se bazira na promjeni crvene boje Coomassie sjajno plavo u plavu nakon vezanja za amino skupine na proteinima, a očitava se na čitaču mikrotitarskih pločica na 595 nm. Razvijena boja proporcionalna je količini proteina, pa se uzorci mogu kvantificirati korištenjem proteinskih standarada poznate koncentracije.

0,01 % Bromfenol plavo), ovaj volumen od 20 μ L izabran je prema korištenim češljicima za elektroforezu s 12 utora. Pripremljeni uzorci su vorteksirani i zagrijani 5 min na 95 °C u PCR uređaju Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) kako bi se denaturirali. Denaturirani proteini su razdvajani na osnovu molekulske mase u električnom polju koristeći metodu gel elektroforeze. Korišten je diskontinuirani sustav koji se sastoji od 5 % gornjeg gela za sabijanje (4,35 mL reH₂O, 1,27 mL 30 % akrilamid/bisakrilamid (Acryl/Bis), 1,87 mL pufer 2 (0,5 M Tris, pH 6,8), 100 μ L 10 % APS, 10 μ L TEMED) i 9 % donjeg gela za razdvajanje (5,4 mL reH₂O, 3,6 mL 30 % Acryl/Bis, 3 mL pufer 1 (1,5 M Tris, pH 8,8), 100 μ L 10 % APS, 10 μ L TEMED). Složena je potrebna aparatura: stakalce s razmaknicom i pokrovno stakalce učvršćeno je na stalku te postavljeno na postolje za izlijevanje gela. Prvo je otpipetiran gel za razdvajanje koji se odmah prekrilo etanolom, za polimerizaciju je trebalo 30 minuta. Etanol se izlio, stakla su posušena te je otpipetiran gel za sabijanje. Odmah se namjestio češljic i sačekalo se 10 minuta da gel polimerizira. Stalak s gelovima se namjestio u prozirnu posudu u koju se ulio pufer za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1 % SDS) toliko da prekriva gelove. Češljic je pažljivo izvađen, a utori su zbog nepolimeriziranog gela isprani puferom. Nanosilo se 4 μ L biljega (*Color-coded Prestained Protein Marker, Broad Range (10-250 kDa)*; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, SAD (CST)) ili 20 μ L pripremljenih proteina u jedan utor na gelu. Kada su svi uzorci nanoseni na gel, zatvorio se sustav za elektroforezu i uređaj za električno napajanje za gel elektroforezu MP-250V (Cleaver Scientific, Warwickshire, UK) se uključio na 90 V. Prelaskom proteina na donji gel voltaža se dizala na 105 V do završetka elektroforeze. Razdvojeni proteini preneseni su s gela na nitroceluloznu membranu za prijenos proteina Roti®-NC (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) korištenjem električnog polja u smjeru okomitom na površinu gela. Prije samog završetka elektroforeze pripremljen je sustav za prijenos proteina. Izrezana nitrocelulozna membrana namočena je u reH₂O, pa u puferu za prijenos proteina (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % metanol). U kadicu u kojoj se slaže *sandwich* uliven je isti pufer te se započelo sa slaganjem: na crnu kazetu stavljena je u puferu namočenu spužvica, a na nju namočeni filter papir. Sljedeća komponenta je gel. Završetkom elektroforeze, gelovi u stakalcima izvađeni su van. Stakalca su odvojena špatulicom i odstranjen je nepotrebn gel za sabijanje. Na pripremljeni *sandwich* položen je gel, a preko njega nitrocelulozna membrana, plastičnim valjkom pažljivo su istisnuti mjehurići. Na to je stavljen namočeni filter papir i ponovno su istisnuti mjehurići. Na kraju se stavila namočena spužvica i crvena kazeta s kojom se zatvorio sustav. Pripremljeni *sandwich* stavio se u posudu sa stalkom za prijenos proteina, a pufer za prijenos proteina uliven je tako da prekriva cijeli

stalak. Sustav se namjestio u stiropornu kutiju i potpuno okružio ledenicama i ledom kako bi se osigurao prijenos proteina na hladnom. Zatvorio se sustav i uključio aparat za elektroforezu na 65 minuta uz konstantu jakost struje od 300 mA. Po završetku, membrana se izvadila i provjerila se uspješnost prijenosa proteina bojanjem u Ponceau S reagensu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) tijekom 5 minuta. Obojana membrana slikala se na skeneru, a zatim odrezala na dva dijela, od kojih su na svakom tri proteina od interesa. Škarama se rezalo između proteina s molekulskom masom od 46 i 57 kDa. Izrezane membrane stavljene su u označene posudice i inkubirane 60 minuta na sobnoj temperaturi u 5 % nemasnog mlijeka u prahu (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) u TBST-u (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20)⁹. Slijedilo je ispiranje membrana tri puta po 5 minuta u TBST-u te inkubacija sa specifičnim kunićjim primarnim antitijelima na 4 °C preko noći na klackalici SK-R1807-E (DLAB Scientific Co., Beijing, Kina). Korištena su antitijela: anti-NRF2 (#12721, CST), anti-HO-1 (#5853, CST), anti-p-AMPK (#2535, CST), anti-AMPK (#5831, CST), anti-NQO1 (#62262, CST) i anti- β -aktin (#8457, CST). Razrjeđenja svih korištenih primarnih antitijela (1:1000) pripremljena su prema preporukama proizvođača. Nakon inkubacije, membrane su isprane tri puta po 5 minuta u TBST-u kako bi se isprala nevezana antitijela, a zatim inkubirane s antikunićjim-IgG sekundarnim HRP-označenim antitijelom (1:2000; #7074, CST) 60 minuta na sobnoj temperaturi na klackalici. Prije vizualizacije membrane su isprane tri puta po 5 minuta u TBST-u. Za vizualizaciju je korišten komercijalni komplet za detekciju proteina kemiluminiscencijom SuperSignalTMWest Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD). Membrane su izvađene iz TBST-a, stavljene na folije i prosušene papirnatim ubrusom. Prethodno se pripremio kemiluminiscencijski reagens sa supstratom za HRP te se odmah ravnomjerno otpipetirao na svaku membranu. Inkubacija u mraku trajala je 5 minuta, nakon čega se svaka membrana postavila između dvije plastične folije i slikala na uređaju za oslikavanje Alliance Q9 mini (UVITEC, Cambridge, UK). Dobivene slike, odnosno ekspresije proteina, analizirane su pomoću Nine Alliance softvera za analizu. Signali su normalizirani koristeći kontrolni β -aktin i signal dobiven bojanjem Ponceau S-om. Podaci su se izrazili kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu KT.

⁹ Blokiranje membrane se radi kako bi se reduciralo stvaranje pozadinskog obojenja zbog nespecifičnog vezanja antitijela na proteine ili samu membranu.

3.5. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa

Koncentracija ukupnog GSH izmjerena je prema metodi koju je predložio Tietze (1969). Metoda se temelji na reakciji DTNB-a (5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina, engl. 5,5'-*Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)*) s GSH u kojoj nastaje obojeni produkt TNB (5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina, engl. 5-*Thio-2-Nitrobenzoic Acid*) koji apsorbira na valnoj duljini od 405 do 412 nm. Brzina kojom nastaje TNB proporcionalna je koncentraciji GSH u uzorku. U istoj reakciji nastaje i disulfid GS-TNB koji se mora reducirati do GSH-a i TNB-a. Ovu reakciju katalizira GR koja kao donor elektrona koristi NADPH. GR je zadužena i za redukciju GSSG u uzorku. Nastali GS-TNB i GSSG u uzorku reduciraju se do GSH koji u reakciji s DTNB daje obojeni produkt, na taj se način mjeri koncentracija ukupnog GSH u pojedinom uzorku.

U svrhu mjerenja koncentracije ukupnog GSH stanice su nasađivane i tretirane na isti način kao za mokri prijenos proteina na membranu (vidi odlomak 3.4). Stanice su tripsinizirane 24 sata nakon kratkotrajnog ili 48 sati nakon dugotrajnog pokusa (7. dan). Odsisan je medij iz jažica koje su onda isprane PBS-om. Dodan je tripsin s 0,25 % EDTA toliko da prekrije površinu jažice i sačekalo se otprilike 5 minuta da se stanice odlijepe, onda se u jažice otpipetiralo malo medija koji treba inaktivirati tripsin. Stanice su pokupljene iz jažica i s medijem vraćene u staklenu epruvetu, pri čemu su sjedinjene stanice istog tretmana iste stanične linije, zatim su centrifugirane 5 minuta na 1300 rpm. Supernatant se bacao, a talog u kojem su stanice se resuspendirao u 1 mL PBS-a i prebacio u mikroeprevete. One su centrifugirane 5 minuta na 2000 rpm u centrifugi za mikroeprevete, nakon čega se odsisao i bacio supernatant. Na talog se otpipetirao PBS, 100 μ L u uzorke iz kratkotrajnog pokusa i 250 μ L u uzorke iz dugotrajnog pokusa, koji su potom vorteksirani. Metoda smrzavanja i odmrzavanja je korištena za lizu stanica. Uzorci su smrzavani 20 minuta na -20 °C, a zatim odmrzavani u hladnoj vodi 10 minuta i vorteksirani, postupak se ponovio četiri puta. Nakon zadnjeg odmrzavanja, uzorci su vorteksirani i centrifugirani 10 minuta na 13400 rpm u centrifugi za mikroeprevete. Supernatant se prebacio u novu označenu mikroeprevetu i izmjerila se koncentracija proteina (Jednadžba 7 u odlomku 3.2.4; Bradford (1976)). Svi su uzorci podešeni na istu koncentraciju. U jednu jažicu pipetiralo se 0,03 mg/mL proteina razrijeđenih u 150 μ L 0,01 M HCl, a isti uzorak pipetirao se u triplikatima na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica. Otapanjem u 0,01 M HCl napravila se 1 mM stock otopina GSH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) od koje su dalje napravljena razrjeđenja za standarde u rasponu od 0,1 do 20 μ M GSH. Na pločicu se kapalo 150 μ L standarda u duplikatima i 150 μ L uzorka u triplikatima koji su ostavljeni na ledu 5 minuta. U 100 mM fosfatnom puferu su pripremljene otopine 5,4 mM DTNB (Sigma Aldrich,

St. Louis, MO, USA), 1,8 mM NADPH (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) i GR tako da je ima 0,4 U/uzorku (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pripremljene otopine su pomiješane u omjeru 1:1:1 do volumena od 7,5 mL koji je bio dostatan za nakapavanje cijele pločice. U svaku jažicu sa standardom i uzorkom kapalo se po 75 μ L pripremljenog reagensa, nakon čega se odmah očitala apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica Multiskan EX na 405 nm. Apsorbancija se očitala nekoliko puta unutar 5 minuta. Pomoću apsorbancija standardnih vrijednosti napravila se baždarna krivulja, a prema njoj su izračunate koncentracije ukupnog GSH u pojedinom uzorku (Jednadžba 7) izražene kao μ M.

3.6. Mjerenje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT određena je metodom koju je opisao Góth (1991). Ova metoda se temelji na razgradnji dodanog vodikova peroksida koju obavlja CAT u uzorku. Koncentracija preostalog vodikova peroksida u uzorku izračuna se iz baždarne krivulje standardnih koncentracija, a može se vizualizirati jer amonijev molibdat s vodikovim peroksidom tvori stabilni žuto obojeni kompleks. Prema Jednadžba 8 se, u ovisnosti o vremenu inkubacije i potrošenom vodikovom peroksidu, izračuna aktivnost CAT.

Za mjerenje aktivnosti CAT stanice su nasadiwane i tretirane na isti način kao za mokri prijenos proteina na membranu (vidi odlomak 3.4). Korišteni su isti proteini izolirani za mjerenje koncentracije ukupnog GSH izolirani prema protokolu opisanom u odlomku 3.5. Pipetirano je 20 μ L uzorka po jažici mikrotitarske pločice s 96 jažica, u tehničkim triplikatima. Pločica i uzorci su čitavo vrijeme bili na ledu. Kao standard koristio se vodikov peroksid. Iz 30 % stock otopine pripremila se 1 M radna otopina, koja se dalje razrjeđivala u fosfatnom puferu (60 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) do željenih koncentracija. Kapalo se po 100 μ L standarda u duplikatima, a bili su u rasponu od 4,375 do 75 mM. Standard od 65 mM pripremio se u većem volumenu (8 mL) jer se on kapao i na uzroke, također po 100 μ L. Čim se nakapao vodikov peroksid zabilježeno je vrijeme i na čitaču mikrotitarskih pločica Multiskan EX na 405 nm očitana je pozadina. Pločica se inkubirala 4-5 minuta, a zatim je u svaku jažicu nakapano 100 μ L stop otopine s 32,4 mM amonijevim molibdatom (Kemika, Zagreb, Hrvatska) koji zaustavlja reakciju. Pričekala se 1 minuta da se stabilizira boja te je izmjerena apsorbancija na 405 nm. Od vrijednosti očitanih nakon zaustavljanja reakcije oduzeta je pozadina te je iz apsorbancija standarda napravljena baždarna krivulja. Prema njoj su iz nagiba pravca i odsječka na osi Y (Jednadžba 7) izračunate koncentracije vodikova peroksida u uzorcima iz kojih je

prema Jednadžba 8 izračunata aktivnost CAT u uzorku. Dobivena vrijednost izražena je kao U/mg proteina.

Jednadžba 8. Izračun aktivnosti CAT

$$\text{Aktivnost katalaze} = \frac{\left(65 \text{ mM- Koncentracija}_{\text{uzorka}} (\text{H}_2\text{O}_2)\right) * \text{Volumen (65 mM u mL)}}{\text{minute inkubacije}}$$

3.7. Statistička obrada podataka

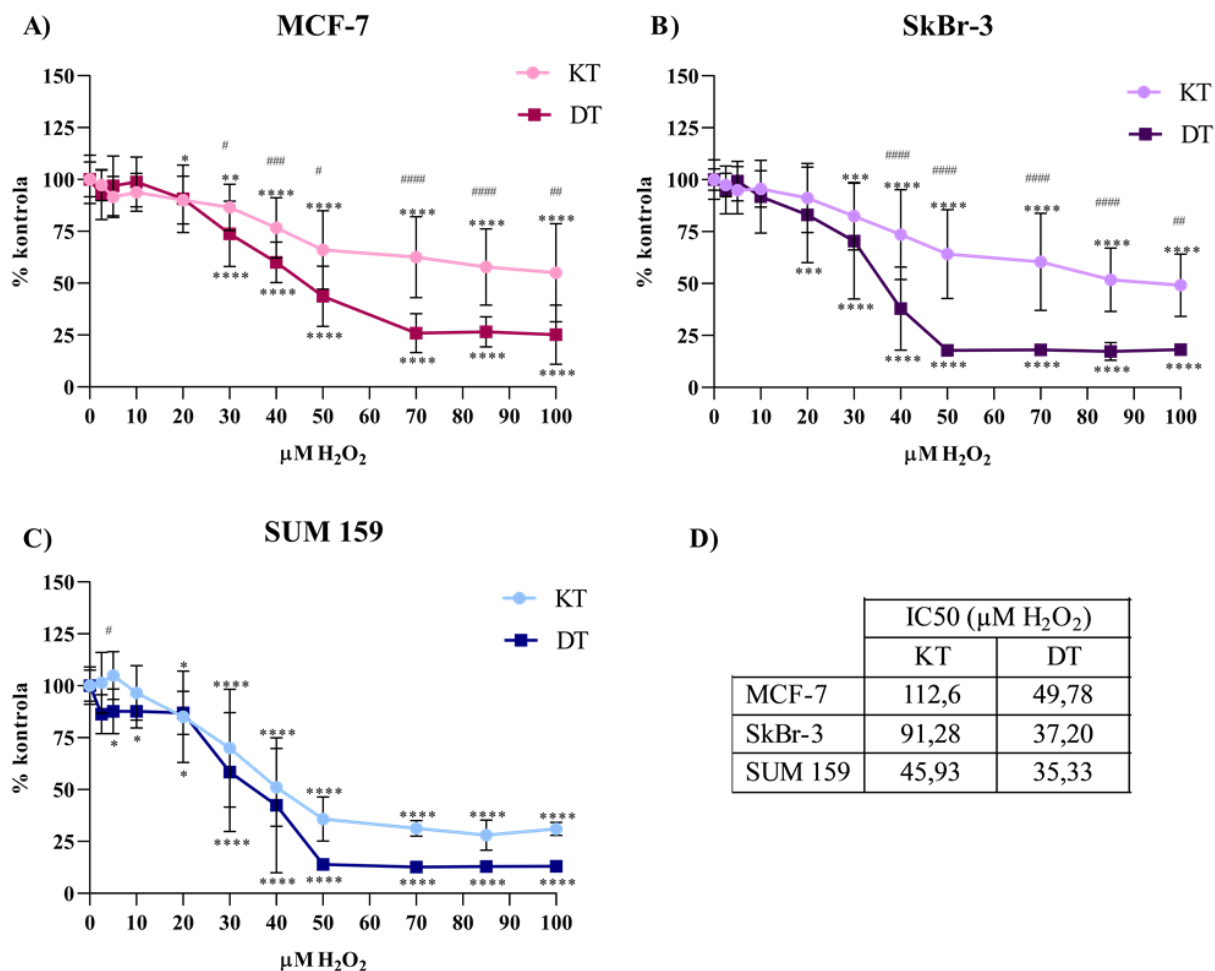
Prikaz i statistička analiza dobivenih rezultata napravljena je pomoću programa GraphPad Prism. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom te izraženi u odnosu na kontrolu (ili vlastitu ili KT). Analiza varijance s dva promjenjiva faktora (2-way ANOVA) s Dunnettovim post hoc testom korištena je za ukazivanje značajnosti između pojedinih grupa uzimajući $P < 0,05$ značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Mjerenje stanične vijabilnosti

Stanična vijabilnost mjerena je nakon kratkotrajne (KT) i dugotrajne (DT) izloženosti vodikovom peroksidu u koncentracijama od 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 70; 85 i 100 μM H_2O_2 , u staničnim linijama MCF-7, SkBr-3 i SUM 159.

U svih se staničnih linija primjećuje smanjenje stanične vijabilnosti u ovisnosti o rastućoj koncentraciji vodikova peroksida. Pri kratkotrajnoj izloženosti 20 μM vodikovom peroksidu započinje značajan pad stanične vijabilnosti u staničnim linijama MCF-7 ($P < 0,05$; Slika 5A) i SUM 159 ($P < 0,05$; Slika 5C), dok isti učinak kod SkBr-3 nastupa pri 30 μM vodikovom peroksidu ($P < 0,001$; Slika 5B). Najizraženiji učinak koncentracijski ovisnog pada stanične vijabilnosti za KT uočen je kod stanične linije SUM 159 (IC_{50} (koncentracija koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju rasta) = 45,93 μM H_2O_2) dok su se druge dvije stanične linije pokazale manje osjetljivima (IC_{50} za SkBr-3 = 91,28 μM H_2O_2 ; IC_{50} za MCF-7 = 112,6 μM H_2O_2 ; Slika 5D). Kod dugotrajne izloženosti, najizraženiji učinak vodikovog peroksida je ponovo uočen kod stanične linije SUM 159 i nastupa već pri 5 μM vodikovom peroksidu ($P < 0,05$; IC_{50} = 35,33 μM H_2O_2 ; Slika 5D). U staničnoj liniji SkBr-3, značajan inhibitory učinak započinje pri 20 μM vodikovom peroksidu ($P < 0,001$; Slika 5B) te raste s povećanjem njegove koncentracije (IC_{50} = 37,20 μM H_2O_2 ; Slika 5D). Najmanje osjetljiva stanična linija je ponovo MCF-7 (IC_{50} = 49,78 μM H_2O_2 ; Slika 5D) u kojoj značajno smanjenje stanične vijabilnosti nastupa pri 30 μM vodikovom peroksidu ($P < 0,0001$; Slika 5A) i također opada s daljnjim povećanjem koncentracije vodikovog peroksida. Osjetljivost staničnih linija MCF-7 i SkBr-3 raste s duljinom izloženosti vodikovom peroksidu, pri čemu niže koncentracije vodikovog peroksida dovode do većeg pada stanične vijabilnosti u DT. Sukladno padaju i IC_{50} vrijednosti (Slika 5D). Kod SUM 159 takva razlika može se primijetiti samo kod 5 μM vodikovog peroksida, dok pri višim koncentracijama razlika izostaje te kratkotrajna i dugotrajna izloženost daju slične učinke. Vrijednosti IC_{50} kratkotrajne i dugotrajne izloženosti za SUM 159 puno su bliže nego za ostale stanične linije, gdje je razlika više od 50 %.



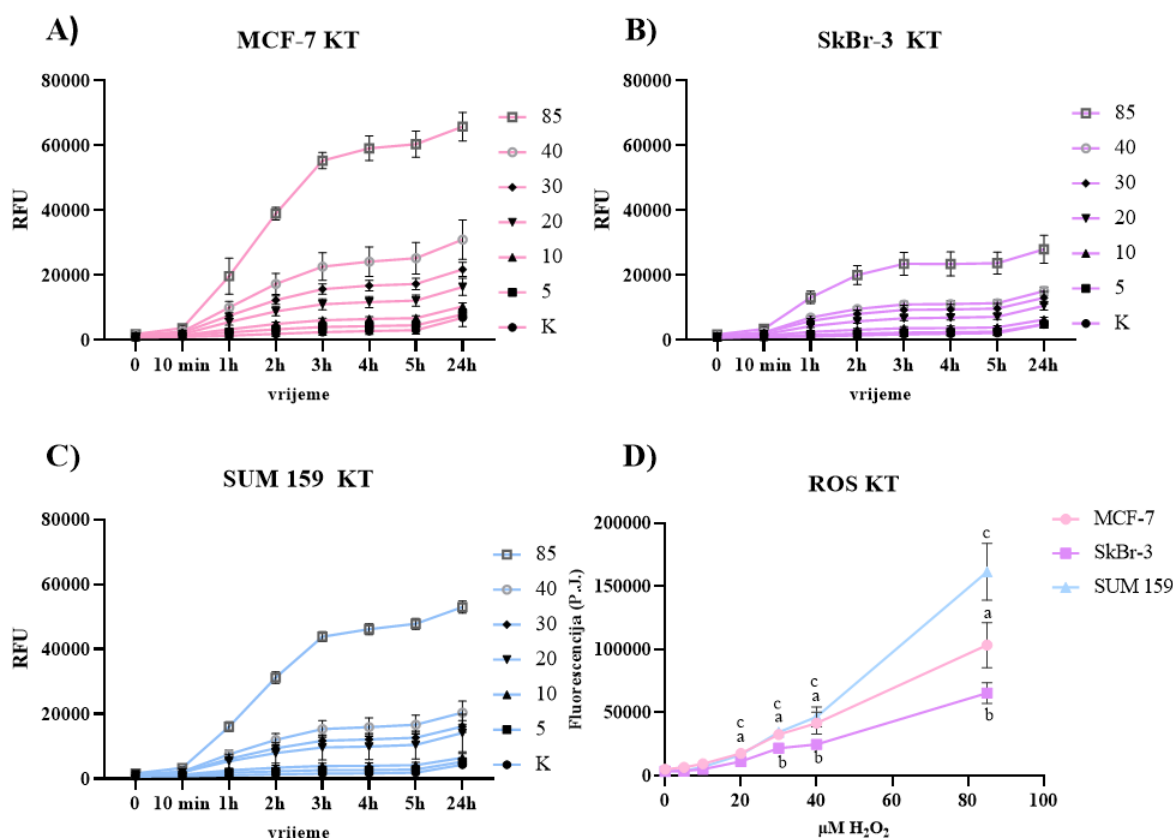
Slika 5. Prikaz stanične vijabilnosti tijekom kratkotrajne i dugotrajne izloženosti vodikovom peroksidu

Slika prikazuje promjenu stanične vijabilnosti u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159. Rezultati su prikazani u odnosu na pripadajuću kontrolu (KT/DT) te izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Oznakom (*) je označena statistička značajnost (P) u odnosu na vlastitu kontrolu (gore za KT, a dolje za DT). Oznakom (#) označena je statistička značajnost između istih koncentracija tretmana KT i DT (nema značajnosti (bez oznake), $P < 0,05$ (*/#), $P < 0,01$ (**/##), $P < 0,001$ (***/###), $P < 0,0001$ (****/####)). Prikaz IC₅₀ za KT i DT svih staničnih linija je naveden pod D). Izračuni su napravljeni metodom nelinearne regresije korištenjem programa GraphPad Prism. Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), IC₅₀ (koncentracija koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju rasta).

4.2. Mjerenje razine unutarstaničnog ROS-a

Razina unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) mjerena je nakon kratkotrajne (KT) i dugotrajne (DT) izloženosti vodikovom peroksidu u koncentracijama od 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 70 i 85 μM H_2O_2 , u staničnim linijama MCF-7, SkBr-3 i SUM 159.

Razina unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta je rasla s porastom koncentracije vodikovog peroksida i vremena u sve tri stanične linije (Slika 6A, B i C). Koncentracije vodikovog peroksida od 20 μM naviše, značajno povećavaju razinu ROS-a u odnosu na kontrolu unutar sat vremena od početka mjerenja. Odmicanjem vremena razlika se dodatno povećava. Izloženost nižim koncentracijama vodikovog peroksida je različito utjecala na razinu unutarstaničnog ROS-a u sve tri stanične linije. U staničnoj liniji MCF-7 je najprije došlo do značajnog porasta razine ROS-a i to za 5 μM H_2O_2 unutar 4 sata ($P < 0,05$) te za 10 μM H_2O_2 unutar dva sata ($P < 0,01$). MCF-7 je ujedno imala i najvišu početnu vrijednost u odnosu na ostale stanične linije. Stanične linije SkBr-3 i SUM 159 su imale približnu početnu vrijednost. U obje je 5 μM H_2O_2 tek nakon 24 sata značajno povećao razinu ROS-a dok je 10 μM H_2O_2 prije povećao razinu u SkBr-3 nego u SUM 159, za dva sata odnosno 3 sata. Uspoređujući razine unutarstaničnog ROS-a tijekom kratkotrajnog izlaganja različitim koncentracijama vodikovog peroksida vidljivo je da u sve tri stanične linije 85 μM H_2O_2 stvara najveću razinu unutarstaničnog ROS-a s značajnim razlikama između sve tri linije ($P < 0,0001$). Izloženost od 40 μM H_2O_2 podiže razinu ROS-a u MCF-7 i SUM 159 prema SkBr-3 ($P < 0,0001$) odnosno 30 μM H_2O_2 u SUM 159 u odnosu na SkBr-3 ($P < 0,05$). Najniže razine ROS-a izmjerene su u SkBr-3, a najviše u SUM 159 pri čemu je značajan porast kod MCF-7 (^a $P < 0,001$) i SUM 159 (^c $P < 0,001$) uočen nakon izlaganja 20 μM H_2O_2 dok je u SkBr-3 (^b $P < 0,0001$) isti uočen izlaganjem 30 μM H_2O_2 .

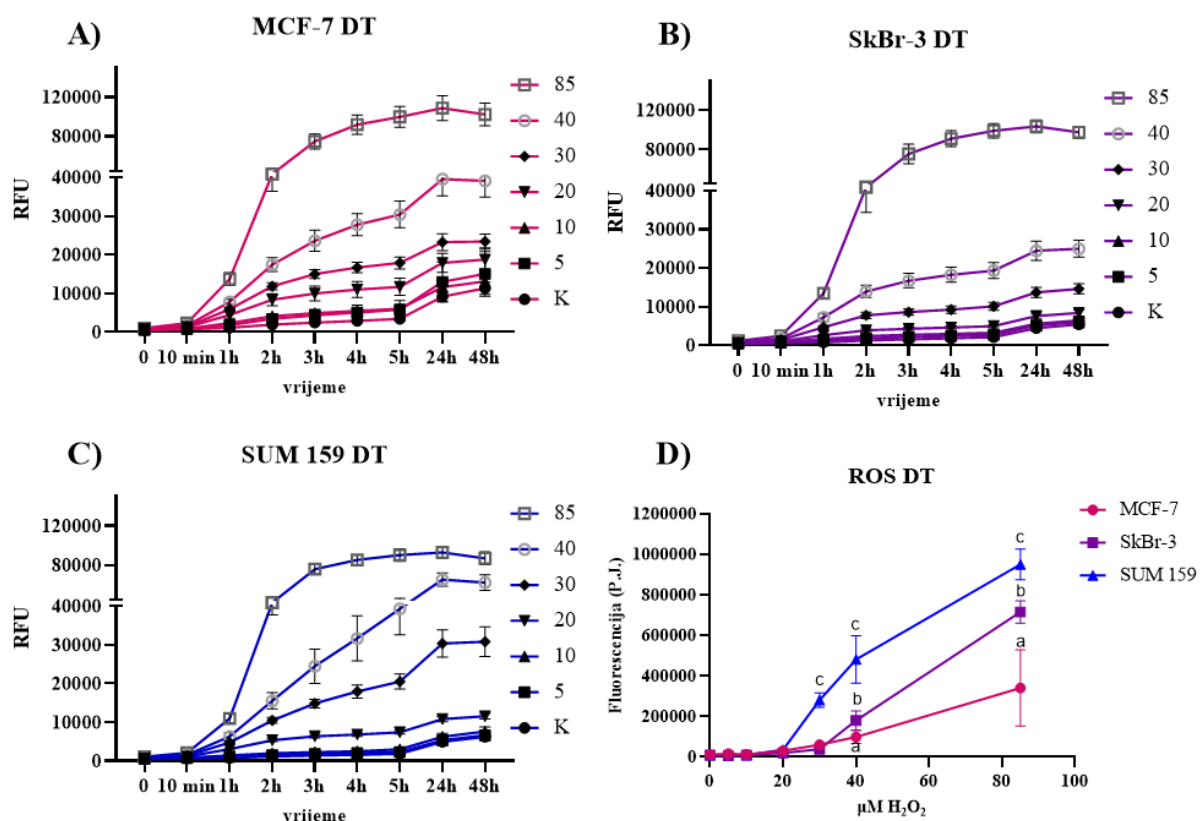


Slika 6. Razina ROS-a tijekom kratkotrajne izloženosti vodikovom peroksidu

Slika prikazuje promjenu razine ROS-a u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159 te D) razinu ROS-a u sve tri stanične linije dodatno korigiranu prema staničnoj vijabilnosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Slovicima je označena statistička značajnost ($P < 0,001$) u odnosu na vlastitu kontrolu i to (a) za MCF-7, (b) za SkBr-3 i (c) za SUM 159. Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), RFU (engl. *Relative Fluorescence Units*), P.J. (proizvoljne jedinice).

Isti trend porasta razine unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta s porastom koncentracije vodikovog peroksida i vremena je vidljiv u sve tri stanične linije kod dugotrajne izloženosti vodikovom peroksidu (Slika 7A, B i C). Koncentracije vodikovog peroksida od 20 μM naviše, značajno povećavaju razinu ROS-a u odnosu na kontrolu unutar dva sata od početka mjerenja u MCF-7 ($P < 0,01$) i SUM 159 ($P < 0,05$) dok je u staničnoj liniji SkBr-3 ($P < 0,05$) potrebno pet sati za postizanje istog učinka. Odmicanjem vremena razlika se dodatno povećava. Izloženost nižim koncentracijama vodikovog peroksida (5 μM i 10 μM) je značajno povećala razinu unutarstaničnog ROS-a unutar 24 sata u sve tri stanične linije ($P < 0,05$). Ponovo je stanična linija MCF-7 imala najvišu početnu vrijednost u odnosu na ostale stanične linije, no i najniži koncentracijski ovisan porast razine ROS-a, dok je stanična linija SUM 159 imala najviši porast razina ROS-a (Slika 7D). Nadalje, značajan porast razine ROS-a kod MCF-7 (^a $P < 0,001$) i SkBr-3 (^b $P < 0,0001$) uočen nakon izlaganja 40 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ dok je u SUM 159 (^c P

< 0,001) isti uočen izlaganjem 30 μM H_2O_2 . U sve tri stanične linije 85 μM H_2O_2 stvara najveću razinu unutarstaničnog ROS-a sa značajnim razlikama između sve tri stanične linije ($P < 0,0001$) kao i izloženost 40 μM H_2O_2 ($P < 0,01$). Pri izloženosti 30 μM H_2O_2 vidljiva je razlika između MCF-7 i SUM 159 ($P < 0,0001$) te MCF-7 i SkBr-3 ($P < 0,0001$).



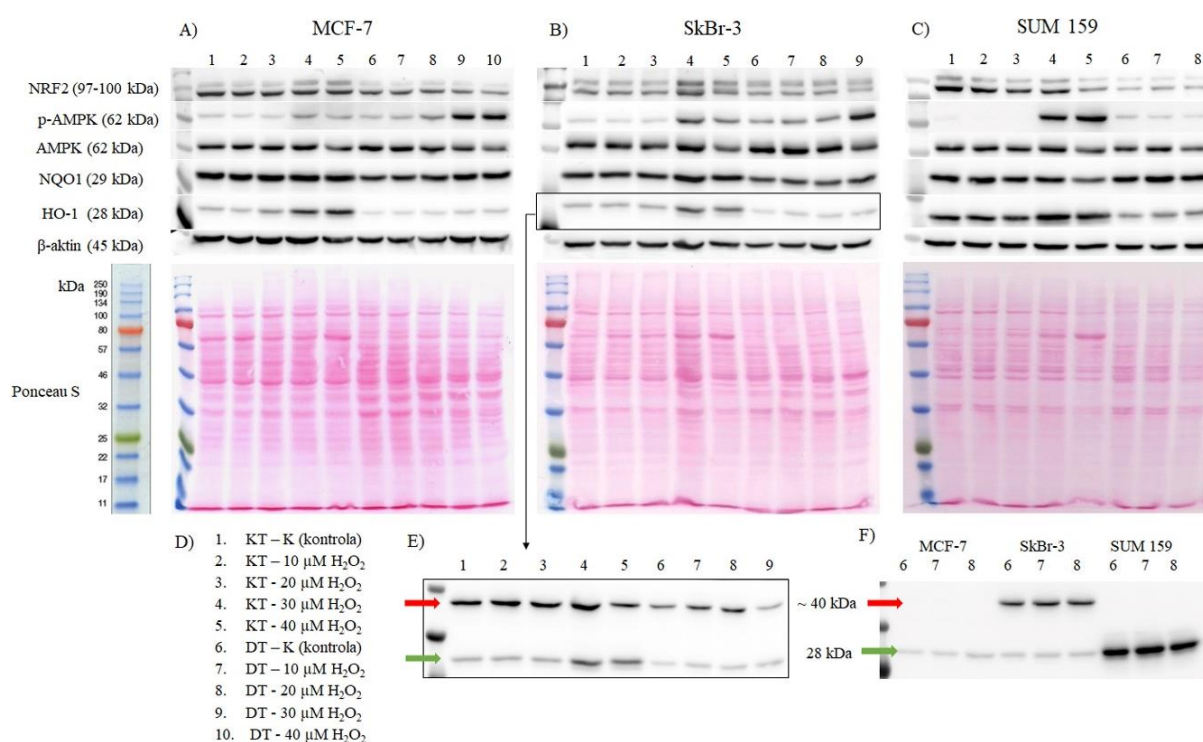
Slika 7. Razina ROS-a tijekom dugotrajne izloženosti vodikovom peroksidu

Slika prikazuje promjenu razine ROS-a u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159 te D) razinu ROS-a u sve tri stanične linije dodatno korigiranu prema staničnoj vijabilnosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Slovicima je označena statistička značajnost ($P < 0,001$) u odnosu na vlastitu kontrolu i to (a) za MCF-7, (b) za SkBr-3 i (c) za SUM 159. Kratice: DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), RFU (engl. *Relative Fluorescence Units*), P.J. (proizvoljne jedinice).

4.3. Mokri prijenos proteina na membranu

Metodom mokrog prijenosa proteina na membranu provjerila se ekspresija proteina NRF2, p-AMPK, AMPK, HO-1 i NQO1 u staničnim linijama MCF-7, SkBr-3 i SUM 159 nakon kratkotrajne (KT) i dugotrajne (DT) izloženosti vodikovim peroksidom u koncentracijama od 10, 20, 30 i 40 μM H_2O_2 . Nakon dugotrajne izloženosti 40 μM vodikovom peroksidu stanične linije SkBr-3, odnosno 30 i 40 μM vodikovom peroksidu stanične linije SUM 159, nije bilo dovoljno proteina za mokri prijenos proteina na membranu.

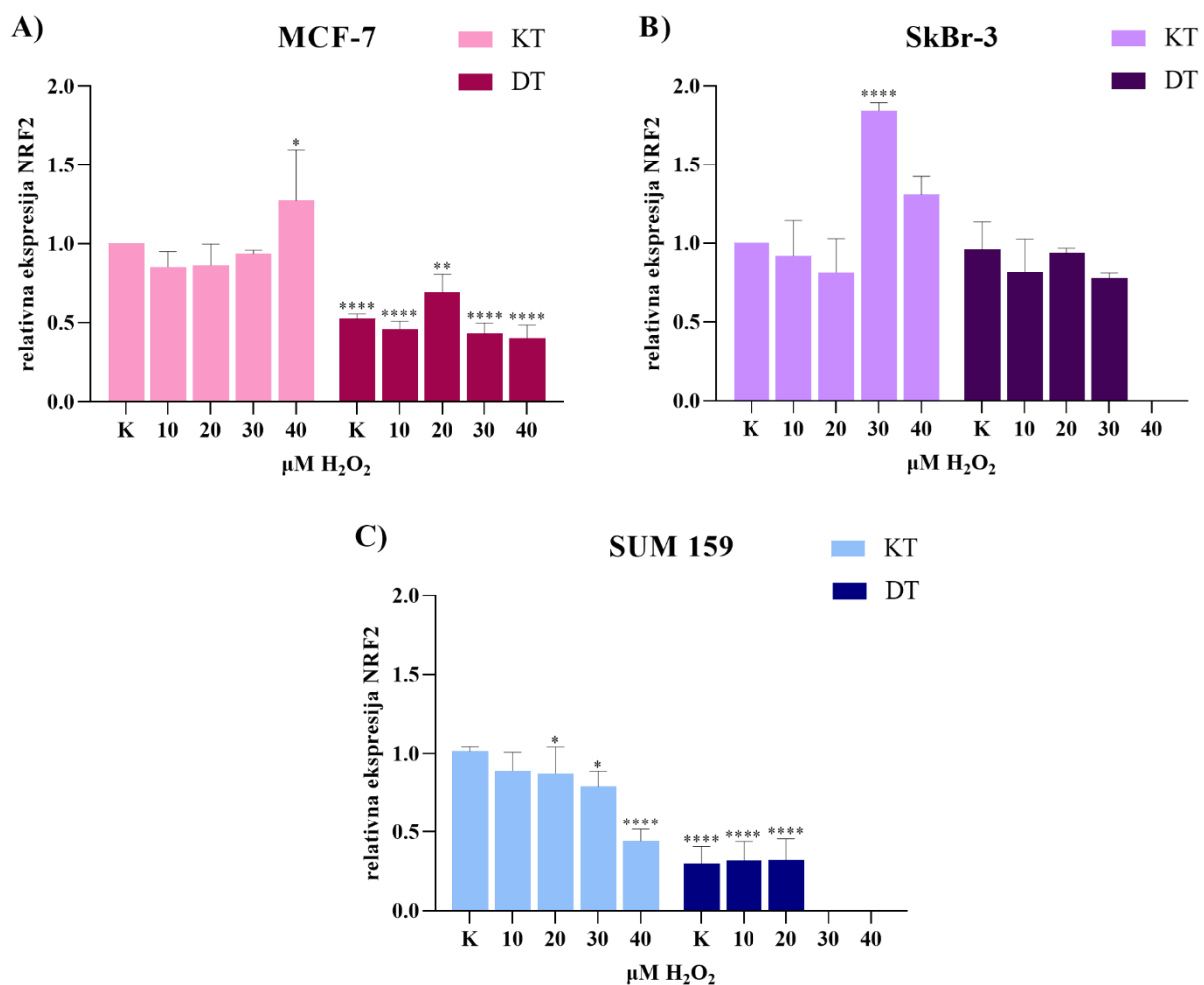
Razlike između pojedinih tretmana i staničnih linija vidljive su već iz slika, no proteini od interesa su dodatno kvantificirani tako što su vrijednosti dobivene programom Nine Alliance normalizirane prema β -aktinu i ukupnim proteinima te izražene u odnosu na kontrolu kratkotrajne izloženosti vodikovom peroksidu. Vidljive razlike uključuju postojanje dva proteinska fragmenta u SkBr-3 nakon anti-HO-1 antitijela, za razliku od jednog u ostalim staničnim linijama. Nadalje, ekspresija HO-1 u staničnoj liniji SUM 159 je bitno izraženija u odnosu na stanične linije MCF-7 i SkBr-3 (Slika 8F). Također, može se primijetiti slabija ekspresija p-AMPK s jačom aktivacijom prilikom kratkotrajnog tretmana 30 i 40 μ M vodikovim peroksidom u SUM 159, u odnosu na druge dvije stanične linije (Slika 8).



Slika 8. Ekspresija proteina NRF2, p-AMPK, AMPK, HO-1 i NQO1 u staničnim linijama MCF-7, SkBr-3 i SUM 159

Slika prikazuje reprezentativne, antitijelima označene proteine od interesa (NRF2, p-AMPK, AMPK, NQO1, HO-1 i β -aktin) s naznačenom molekularnom masom te ukupne proteine obojene Ponceau S-om u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159. D) Brojevima je označen tip tretmana. E) Kod SkBr-3, uz ciljani protein molekularne mase 28 kDa, označen je i dodatni proteinski fragment na otprilike 40 kDa. F) Ovaj fragment specifičan je za SkBr-3 i ne pojavljuje se u drugih staničnim linijama. Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), NRF2 (nuklearni eritroidni faktor 2), AMPK (protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom), p-AMPK (fosforilirani AMPK), NQO1 (NAD(P)H: kinon oksidoreduktaza 1), HO-1 (hem-oksigenaza 1).

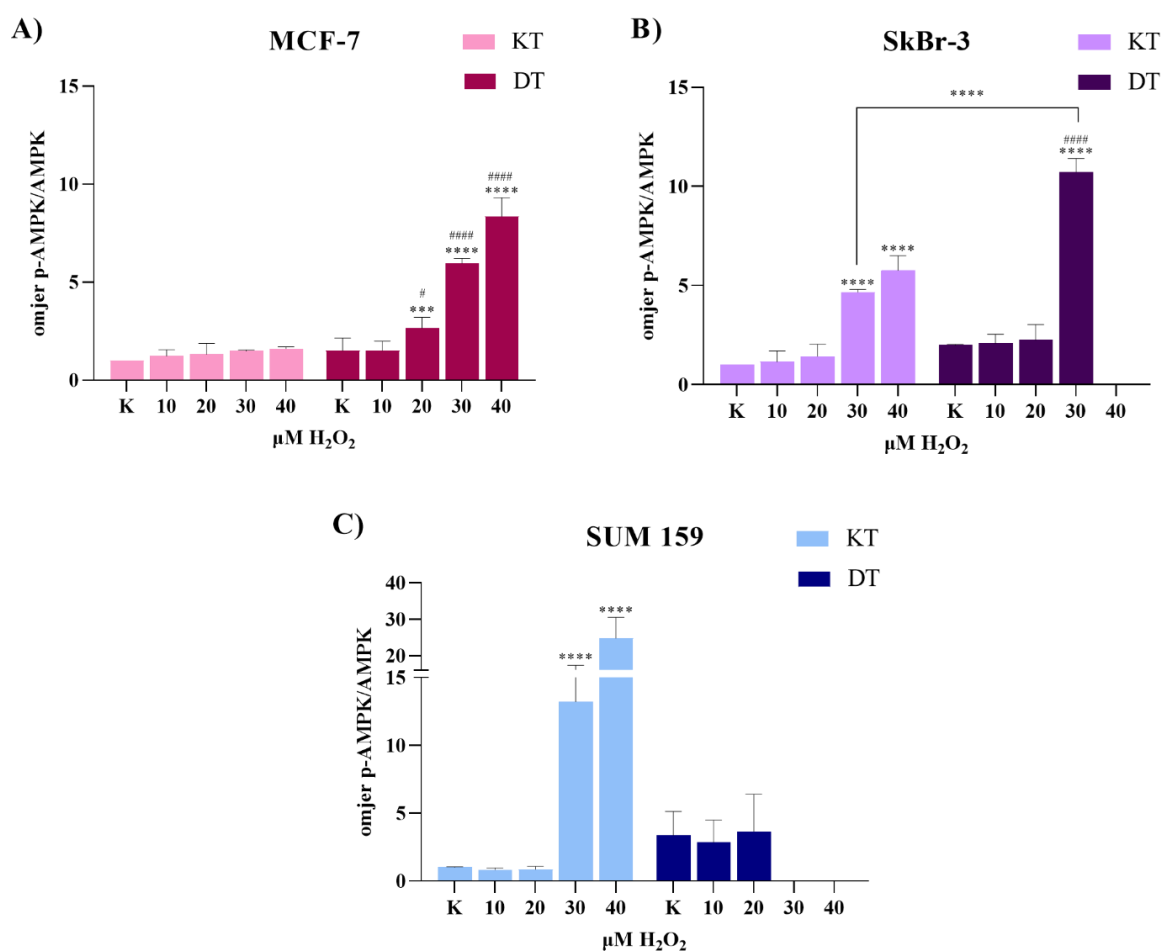
Ekspresija proteina NRF2 mijenjala se ovisno o izloženosti i koncentraciji vodikovog peroksida, ali i staničnoj liniji (Slika 9). Stanične linije MCF-7 te posebice SUM 159 imaju značajno nižu ekspresiju NRF2 pri dugotrajnoj izloženosti vodikovom peroksidu ($P < 0,01$ za MCF-7 i $P < 0,0001$ za SUM 159). Nadalje, kratkotrajna izloženost 40 μM , odnosno 30 μM vodikovom peroksidu staničnih linija MCF-7 odnosno SkBr-3 značajno povećava ekspresiju NRF2 ($P = 0,0371$ za MCF-7, $P < 0,0001$ za SkBr-3), dok u staničnoj liniji SUM 159 ekspresija NRF2 pada s porastom koncentracija vodikovog peroksida ($P = 0,0425$ za 20 μM , $P = 0,0109$ za 30 μM i $P < 0,0001$ za 40 μM). Pri dugotrajnoj izloženosti učinak vodikovog peroksida između pojedinih tretmana je izostao.



Slika 9. Rezultati analize ekspresije proteina NRF2

Prikaz ekspresije proteina NRF2 u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu KT te izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Oznakom (*) je označena statistička značajnost (P) u odnosu na kontrolu KT (nema značajnosti (bez oznake), $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,0001$ (***)). Podaci su normalizirani u odnosu na β -aktin i ukupne proteine. Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), NRF2 (nuklearni eritroidni faktor 2).

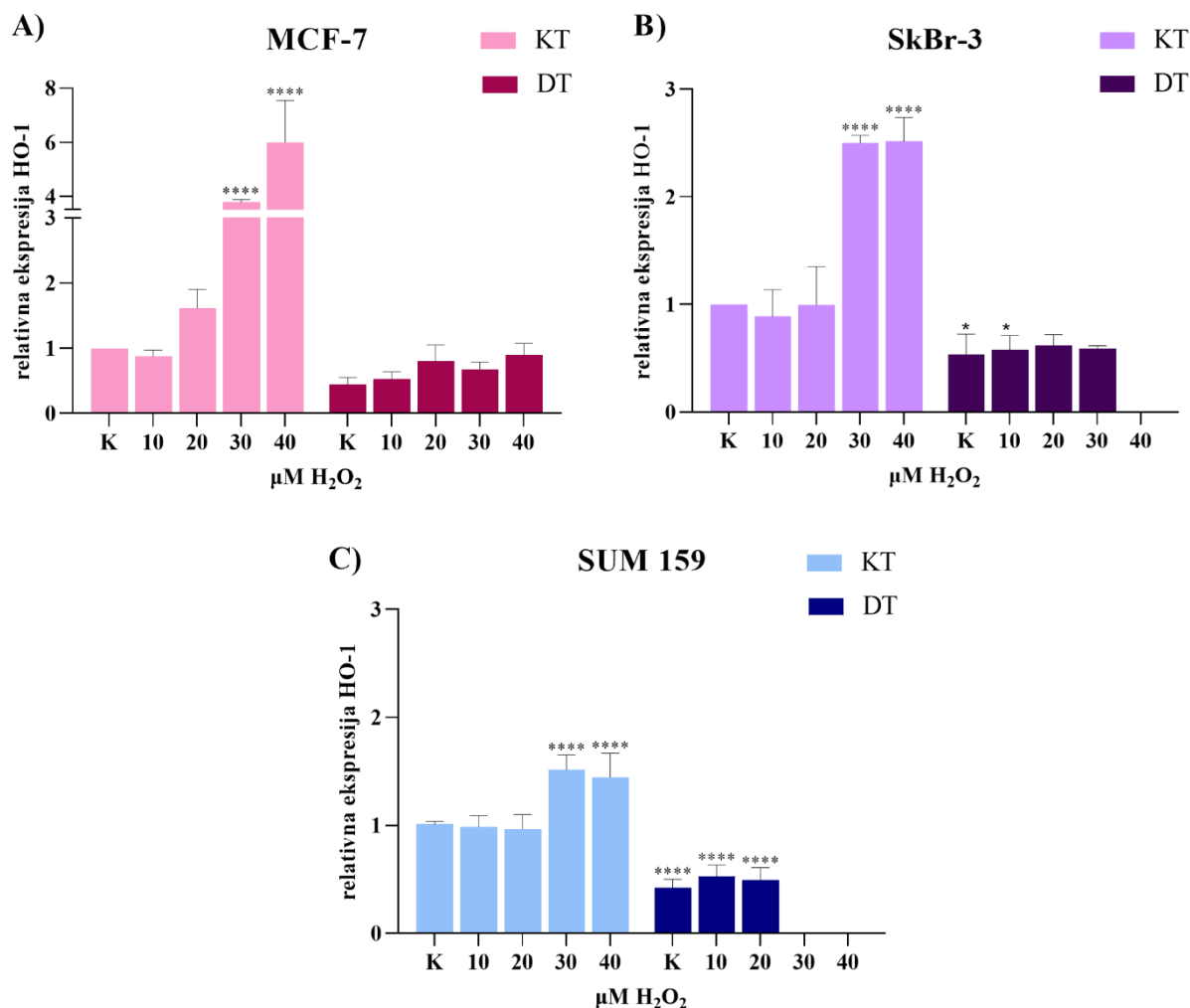
Aktivacija proteina AMPK u staničnoj liniji MCF-7 povećava se s porastom koncentracije vodikovog peroksida tijekom dugotrajne izloženosti dok je učinak izostao kod kratkotrajne izloženosti (Slika 10A). Nasuprot, u staničnoj liniji SUM 159 više koncentracije vodikovog peroksida (30 i 40 μM) dovode do aktivacije AMPK pri kratkotrajnoj izloženosti vodikovom peroksidu ($P < 0,0001$; Slika 10C). Kod stanične linije SkBr-3, više koncentracije vodikovog peroksida dovode do aktivacije AMPK neovisno o duljini izloženosti vodikovom peroksidu ($P < 0,0001$) pri čemu je izraženija aktivacija AMPK 30 μM vodikovim peroksidom vidljiva kod duže izloženosti ($P < 0,0001$; Slika 10B).



Slika 10. Rezultati analize ekspresije fosforiliranog i ukupnog proteina AMPK prikazana kao njihov omjer

Prikaz omjera relativne ekspresije fosforiliranog i ukupnog AMPK (p-AMPK/AMPK) u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159. Omjerom relativne ekspresije p-AMPK i AMPK prikazana je aktivacija ovog enzima pri navedenim uvjetima. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu KT te izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Oznakom (*) je označena statistička značajnost (P) u odnosu na kontrolu KT, a oznakom (#) statistička značajnost u odnosu na kontrolu DT (nema značajnosti (bez oznake), $P < 0,05$ (*/#), $P < 0,001$ (***) , $P < 0,0001$ (****/#####)). Podaci su normalizirani u odnosu na β -aktin i ukupne proteine. Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), AMPK (protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom), p-AMPK (fosforilirani AMPK).

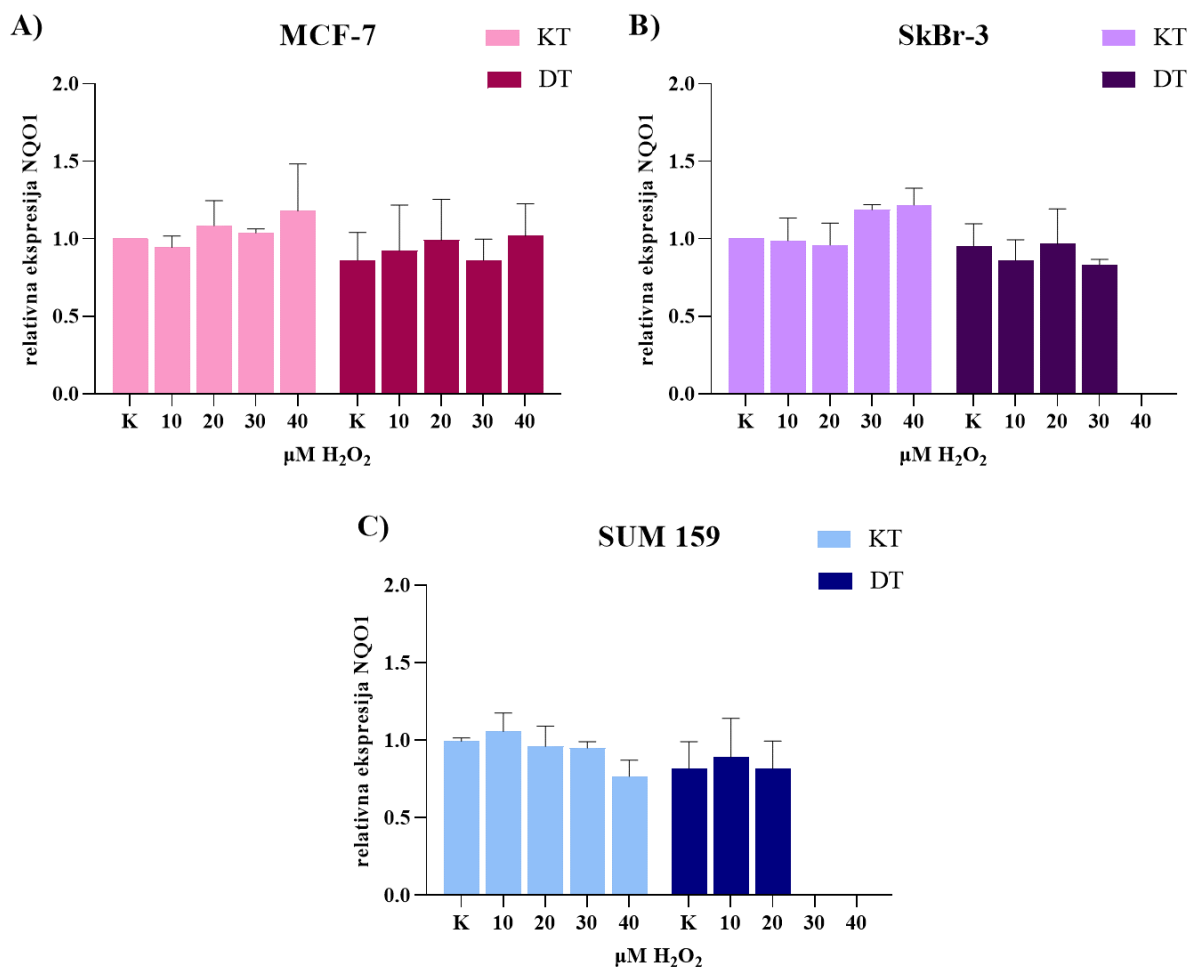
Ekspresija proteina HO-1 raste pri kratkotrajnoj izloženosti 30 i 40 μM vodikovom peroksidu u sve tri stanične linije, a posebice u MCF-7 ($P < 0,0001$; Slika 11). Dugotrajna izloženost rastućim koncentracijama vodikovog peroksida ne utječe na porast ekspresije u MCF-7, dok je u staničnim linijama SkBr-3 i SUM 159 čak vidljiva niža ekspresija HO-1 u odnosu na kratkotrajnu izloženost ($P < 0,05$ za SkBr-3, $P < 0,0001$ za SUM 159). Između skupina unutar dugotrajne izloženosti vodikovom peroksidu ne vidi se značajna razlika (Slika 11).



Slika 11. Rezultati analize ekspresije proteina HO-1

Prikaz ekspresije proteina HO-1 u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu KT te izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Oznakom (*) je označena statistička značajnost (P) u odnosu na kontrolu KT (nema značajnosti (bez oznake), $P < 0,05$ (*), $P < 0,0001$ (****)). Podaci su normalizirani u odnosu na β -aktin i ukupne proteine. Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), HO-1 (hem oksigenaza 1).

Ekspresija proteina NQO1 stalna je u sve tri stanične linije te se ne mijenja u ovisnosti o koncentraciji vodikova peroksida niti duljini izloženosti vodikovom peroksidu (Slika 12).



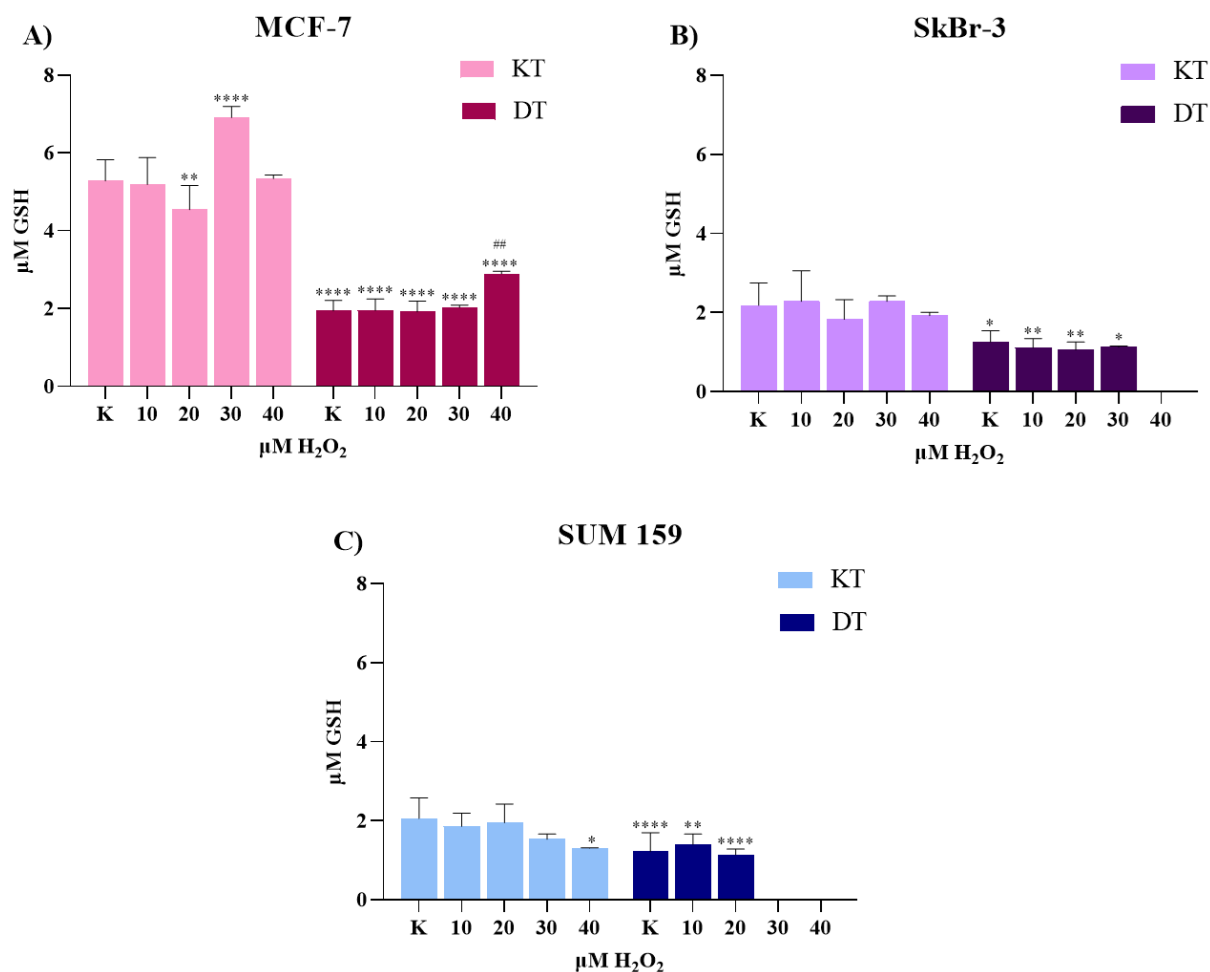
Slika 12. Rezultati analize ekspresije proteina NQO1

Prikaz ekspresije proteina NQO1 u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu KT te izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Podaci su normalizirani u odnosu na β -aktin i ukupne proteine. Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), NQO1 (NAD(P)H: kinon oksidoreduktaza 1).

4.4. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa

Koncentracije ukupnog GSH izmjerene su nakon kratkotrajne (KT) i dugotrajne (DT) izloženosti vodikovom peroksidu (H_2O_2) u koncentracijama od 10, 20, 30 i 40 μM H_2O_2 , u staničnim linijama MCF-7, SkBr-3 i SUM 159. Nakon dugotrajne izloženosti 40 μM vodikovom peroksidu stanične linije SkBr-3, odnosno 30 i 40 μM vodikovom peroksidu stanične linije SUM 159, nije bilo dovoljno proteina za analizu.

Količina ukupnog GSH mijenjala se u ovisnosti o koncentraciji i duljini izloženosti vodikovom peroksidu te o korištenoj staničnoj liniji. Razlika između staničnih linija je posebice zamjetna kod MCF-7 čije izmjerene koncentracije ukupnog GSH nakon kratkotrajne izloženosti su puno više u usporedbi s druge dvije stanične linije. Dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu dovodi do značajnog pada vrijednosti u MCF-7 ($P < 0,0001$) iako one ostaju još uvijek više u odnosu na druge dvije stanične linije (Slika 13). Nadalje, u odnosu na kontrolu KT, koncentracija ukupnog GSH pada pri kratkotrajnoj izloženosti 20 μM vodikovom peroksidu ($P < 0,01$; Slika 13A), ali raste pri izloženosti 30 μM vodikovom peroksidu ($P < 0,0001$; Slika 13A) u staničnoj liniji MCF-7. Porast koncentracije ukupnog GSH je također primijećen nakon dugotrajne izloženosti 40 μM vodikovom peroksidu u MCF-7 ($P < 0,01$; Slika 13A) dok kod staničnih linija SkBr-3 i SUM 159 razlike između skupina unutar dugotrajne izloženosti izostaju iako dugotrajna izloženost u svim staničnim linijama dovodi do značajnog smanjenja ukupnog GSH ($P < 0,0001$ za MCF-7, $P < 0,05$ i $P < 0,01$ za SkBr-3, $P < 0,01$ i $P < 0,0001$ za SUM 159; Slika 13). Pri kratkotrajnoj izloženosti 40 μM vodikovom peroksidu u SUM 159 koncentracija ukupnog GSH pada ($P < 0,05$; Slika 13C), dok kod stanične linije SkBr-3 izostaje utjecaj vodikova peroksida (Slika 13B).



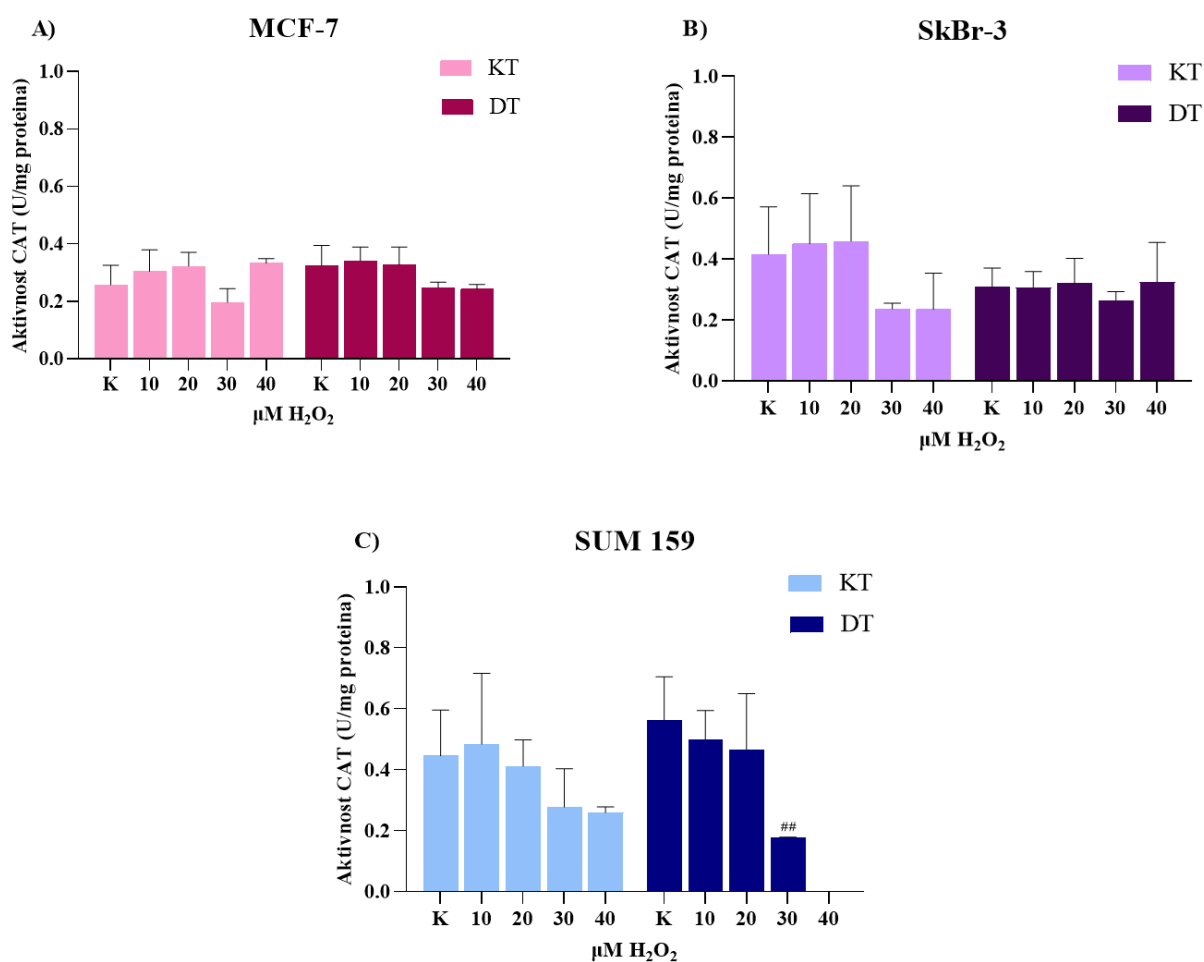
Slika 13. Koncentracija ukupnog GSH

Prikaz koncentracije ukupnog GSH u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Oznakom (*) je označena statistička značajnost (P) u odnosu na kontrolu KT, a oznakom (#) značajnost u odnosu na kontrolu DT (nema značajnosti (bez oznake), $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**/##), $P < 0,0001$ (****)). Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), GSH (glutation).

4.5. Mjerenje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) izmjerena je nakon kratkotrajne (KT) i dugotrajne (DT) izloženosti vodikovom peroksidu u koncentracijama od 10, 20, 30 i 40 μM H_2O_2 , u staničnim linijama MCF-7, SkBr-3 i SUM 159. Nakon dugotrajne izloženosti 40 μM vodikovom peroksidu stanične linije SUM 159, nije bilo dovoljno proteina za analizu.

Aktivnost CAT ne mijenja se u ovisnosti o dodanoj koncentraciji niti duljini izloženosti vodikovom peroksidu u staničnim linijama MCF-7 i SkBr-3 (Slika 14A i Slika 14B). Kod stanične linije SUM 159, kratkotrajna izloženost rasponu koncentracija vodikovog peroksida nije utjecala na aktivnost CAT, dok se kod dugotrajne izloženosti 30 μM vodikovom peroksidu aktivnost CAT značajno smanjuje u odnosu na kontrolu DT ($P < 0,01$; Slika 14C).



Slika 14. Aktivnost CAT

Prikaz aktivnosti CAT u staničnim linijama A) MCF-7, B) SkBr-3 i C) SUM 159. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Oznakom (#) je označena statistička značajnost (P) u odnosu na kontrolu DT (nema značajnosti (bez oznake), $P < 0,01$ (##)). Kratice: KT (kratkotrajna izloženost vodikovom peroksidu), DT (dugotrajna izloženost vodikovom peroksidu), K (kontrola), CAT (katalaza).

5. RASPRAVA

ROS su bitni kako u normalnim stanicama pa tako i u tumorskim stanicama jer ovisno o koncentraciji sudjeluju u svim procesima od proliferacije do diferencijacije i apoptoze. Možemo ih smatrati i prenositeljima informacija koje stanice stvaraju kao odgovor na vanjski podražaj aktivacijom specifičnih signalnih puteva (Milkovic i sur. 2019). Vodikov peroksid je najpoznatiji ROS uključen u redoks signalne puteve. Kod tumora, kako bi se zadovoljile velike potrebe za energijom i građevnim jedinicama, dolazi do promjena u metabolizmu koje doprinose povećanim vrijednostima ROS-a u odnosu na zdrave stanice. Ta karakteristika je jedno od glavnih strategija na kojoj se bazira većina konvencionalne protutumorske terapije, a uključuje selektivno nakupljanje ROS-a, primjerice vodikovog peroksida, koji izaziva smrt tumorskih stanica bez štetnog učinka na zdrave stanice (Wlassoff i sur. 2007). No, dugotrajna izloženost egzogeno dodanom vodikovom peroksidu može doprinijeti i rezistenciji stanica tumora dojke te potiče njihov invazivni karakter (Mahalingaiah i Singh 2014). Jedan od mehanizama obrane uključuje i poticanje NRF2 signalnog puta. U velikom broju tumora, pa tako i u tumorima dojke, dolazi do hiperaktivacije NRF2 signalnog puta bilo zbog mutacija dobivanja funkcije (engl. *Gain-of-Function*) gena NRF2 ili mutacija gubitka funkcije (engl. *Loss-of-Function*) gena njegovog represora KEAP1, kao i drugim mehanizmima aktivacije (Jaganjac i sur. 2020). Kako su tumori dojke heterogeni i različiti u odgovoru na terapiju, ovim istraživanjem se željelo provjeriti kakav je utjecaj duljine izloženosti tumora dojke na vodikovim peroksidom izazvani OS te postoje li razlike u antioksidacijskom kapacitetu i aktivaciji metabolizma na isti. Pri tome su korištene tri različite stanične linije tumora dojke (MCF-7 (hormonski pozitivne), SkBr-3 (HER2 pozitivne) i SUM 159 (trostruko negativne)) koje danas predstavljaju osnovni način klasifikacije u klinici. Rezultati su pokazali smanjenje stanične vijabilnosti u ovisnosti o rastućoj koncentraciji vodikova peroksida u stanica tumora dojke (Slika 5). Također, došlo je do porasta razine unutarstaničnog ROS-a u ovisnosti o koncentraciji i duljini izloženosti vodikovom peroksidu (Slika 6 i Slika 7). Utjecaj različitih koncentracija vodikovog peroksida na hormonski pozitivnu staničnu liniju MCF-7 istraživali su Ma i sur. (2015) koji su pokazali da tretman vodikovim peroksidom inhibira proliferaciju i inducira apoptozu tumorskih stanica ($>30 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$), dok su pri nižim koncentracijama ($5\text{-}15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) primijetili povećanu proliferaciju stanica. Ovim je istraživanjem potvrđen pad stanične vijabilnosti već nakon $20 \mu\text{M}$ vodikovog peroksida, ali nije primijećena pojačana proliferacija pri nižim koncentracijama (Slika 5). Protutumorski učinak vodikovog peroksida pokazan je i na miševima, gdje je indukcijom ROS-a potaknuta apoptoza tumorskih stanica,

vidljivo kao smanjena masa tumora i pojavnost metastaziranja (Salganik i sur. 2000). Pokazane su i razlike u osjetljivosti na tretman između staničnih linija, pri čemu se stanična linija MCF-7 pokazala najmanje osjetljivom na kratkotrajnu ($IC_{50} = 112,6 \mu M H_2O_2$) i dugotrajnu ($IC_{50} = 49,78 \mu M H_2O_2$) izloženost vodikovom peroksidu, no vidljiv je i porast osjetljivosti s duljinom izloženosti (Slika 5D). Sličan odgovor s nešto pojačanom osjetljivošću je primijećen kod HER2 pozitivne stanične linije SkBr-3 ($IC_{50} = 91,28 \mu M H_2O_2$ za KT i $IC_{50} = 37,20 \mu M H_2O_2$ za DT) (Slika 5D). Dakle, u obje stanične linije je tijekom duže izloženosti došlo do značajnog smanjenja stanične vijabilnosti. Iako se stanična linija SUM 159 pokazala najosjetljivijom u oba slučaja izloženosti ($IC_{50} = 45,93 \mu M H_2O_2$ za KT i $IC_{50} = 35,33 \mu M H_2O_2$ za DT) možemo primijetiti da duža izloženost nije toliko utjecala na staničnu vijabilnost kao u ostale dvije stanične linije tumora dojke (Slika 5D). U skladu su rezultati određivanja razine ROS-a koji su pokazali najvišu razinu ROS-a u staničnoj liniji SUM 159 tijekom kratkotrajne i produžene izloženosti oksidacijskom stresu (Slika 6C i Slika 7C) dok je najotpornija stanična linija MCF-7 imala najnižu razinu ROS-a nakon dugotrajnog tretmana (Slika 7A). Stanična linija SkBr-3 je nakon kratkotrajnog tretmana imala najnižu razinu ROS-a (Slika 6B) što je omogućilo njezinu relativno nisku osjetljivost na kratkotrajni učinak vodikovog peroksida dok se kod produžene izloženosti taj učinak gubi te porastom osjetljivosti stanica je došlo i do porasta razine ROS-a (Slika 7B).

Tako je pad stanične vijabilnosti povezan s kraćom i dužom izloženosti vodikovom peroksidu te, ovisno o koncentraciji i duljini izloženosti, podiže razinu unutarstaničnog ROS-a. Osjetljivost, osim o razini nastalog ROS-a, ovisi i o jačini antioksidacijskog kapaciteta same stanične linije. Tumorske stanice se jačanjem svog antioksidacijskog kapaciteta brane od visokih koncentracija ROS-a. Prilagođavaju se na OS regulacijom antioksidansa koji potiču njihovo preživljenje i razvoj rezistencije (Liou i Storz 2010). Egzogeni ili endogeni ROS, poput vodikova peroksida, aktiviraju transkripciju antioksidacijskih gena preko ARE (Ray i sur. 2012) i dolazi do aktivacije glavnog transkripcijskog faktora NRF2 (Lennicke i sur. 2015). U tumorskim stanicama NRF2 je pojačano aktivan, štiti ih od oksidacijskih oštećenja i omogućava stvaranje rezistencije (Harder i sur. 2015). Također, stalna aktivacija NRF2 promiče proliferaciju tumorskih stanica i inducira metaboličko reprogramiranje te aktivira antiapoptotske gene i sprječava apoptozu (Menegon i sur. 2016). Pokazana je povećana ekspresija NRF2 pri kratkotrajnoj izloženosti višim koncentracijama vodikovog peroksida u MCF-7 i SkBr-3, zbog čega su ove stanične linije otpornije na izazvani OS nego SUM 159, čija se ekspresija NRF2 smanjuje nakon tretmana (Slika 9). Rezultati su u skladu s našim

prethodnim istraživanjem gdje smo pokazali da je stanična linija SUM 159 najosjetljivija na tretman s vodikovim peroksidom. Obzirom da smo tamo pokazali da stanična linija SUM 159 ima povišenu razinu višestruko nezasićenih masnih kiselina, te smanjenu ekspresiju akvaporina 3, što posljedično može izazvati lipidnu peroksidaciju i smanjenu mogućnost transporta vodikovog peroksida iz stanice te tako objasniti povećanu osjetljivost (Rodrigues i sur. 2019).

Povećana ekspresija NRF2 vidljiva nakon kratkotrajnog tretmana višim koncentracijama vodikovog peroksida u staničnim linijama MCF-7 i SkBr-3, u stanica SUM 159 dovela je do smanjene ekspresije (Slika 9). Rezultat potvrđuje naš prethodni i objašnjava nalaz povećane razine ROS-a u staničnoj liniji SUM 159. Jednako tako je vidljivo da aktivacija NRF2 nastupa kao prvotni odgovor na egzogeno dodani vodikov peroksid dok izostaje nakon produženog izlaganja istome te se može povezati i s povećanjem osjetljivosti tumorskih stanica. Iako je u SUM 159 došlo do pada ekspresije, odgovor na kratkotrajnu i dugotrajnu izloženost je gotovo isti (Slika 5D). Nakon dulje izloženosti OS-u stanice ne pojačavaju ekspresiju NRF2, no to ne znači da imaju smanjenu antioksidacijsku sposobnost, jer imaju najjaču bazalnu ekspresiju HO-1 u usporedbi s druge dvije stanične linije čija transkripcija može biti regulirana i nekim drugim transkripcijskim faktorom, primjerice AP-1 (Medina i sur. 2020). Ekspresija HO-1 je niža u fiziološkim uvjetima te ju aktiviraju prisutnost hema, nekih citokina i faktora rasta te ROS-a (Bahmani i sur. 2011). Tu je povećana ekspresija HO-1 bila vidljiva samo nakon kratkotrajne izloženosti višim koncentracijama vodikovog peroksida, dok nakon dugotrajne izloženosti nema takvog učinka (Slika 11). Dugotrajnom izloženosti ekspresija se ne mijenja u staničnim linijama MCF-7 i SkBr-3, dok u SUM 159 dolazi do pada ekspresije u usporedbi sa kratkotrajnim tretmanom (Slika 11). Budući da je HO-1 inducibilni enzim, više ga koncentracije ROS-a aktiviraju što se i primjećuje nakon kratkotrajne izloženosti, ali nakon duge izloženosti njegova ekspresija se ne mijenja ili pada, te vjerojatno spada u jedan od prvih odgovora stanica na povišene koncentracije ROS-a. U brojnih je tumora, uključujući i staničnu liniju MCF-7, pokazana povišena ekspresija HO-1 koji ima citoprotektivnu ulogu i štiti stanice od oksidacijskih oštećenja (Bahmani i sur. 2011). Iako ga mogu aktivirati neki čimbenici, poput ROS-a u ovom slučaju; HO-1 je konstantno ekspimiran i može se smatrati održavateljskim (engl. *Housekeeping*) genom (Otterbein i sur. 2003). Bitno je naglasiti da je u staničnoj liniji SkBr-3 bio vidljiv dodatni bend na visini od oko 40 kDa (Slika 8E) što govori u prilog da ova stanična linija specifično prolazi neku posttranslacijsku modifikaciju HO-1, koja nije vidljiva u drugim staničnim linijama.

U ovom bi istraživanju ulogu održavateljskog gena, lakše pripisali enzimu NQO1 za kojeg nije primijećena promjena ekspresije niti u ovisnosti o koncentraciji dodanog vodikovog peroksida niti u ovisnosti o duljini tretmana (Slika 12). Iako je NQO1 inducibilni enzim koji djeluje kao redoks senzor i štiti stanicu od oksidacijskih oštećenja i lipidne peroksidacije (Siegel i sur. 1997), njegova je ekspresija stalna. S druge strane, Yang i sur. (2014) su dokazali povišenu razinu NQO1 u stanica tumora dojke, ali u odnosu na ne-tumorsko tkivo i hiperplazije. Čak su pretpostavili kako bi se povišenje razine NQO1 moglo koristiti kao biomarker za lošiju prognozu. Budući da su u ovom radu istražene stanične linije tumora dojke, među kojima nema velikih razlika u ekspresiji, moguće je povišenje ekspresije NQO1 koje je vezano za karcinogenezu.

Stanje inducirano OS-a djeluje i na metabolizam tumorskih stanica tako da nakon tretmana višim koncentracijama dolazi do aktivacije AMPK. Iako u zdravom tkivu djeluje protutumorski, u nastalom tumoru AMPK djeluje kao tumor-promotor i štiti stanice od manjka kisika i nutrijenata te oksidacijskog stresa (Vara-Ciruelos i sur. 2019). Povećanjem ekspresije aktivnog oblika ovog enzima (p-AMPK) u odnosu na inaktivni oblik govori u prilog njegove aktivacije. Vidljiva je razlika u odgovoru staničnih linija na iste tretmane. Stanična linija SkBr-3 više iskorištava metaboličko reprogramiranje za zaštitu od OS-a te ima pojačanu aktivaciju AMPK nakon kratkotrajne i dugotrajne izloženosti vodikovom peroksidu (Slika 10B). Aktivacija je jača s povećanjem koncentracije tretmana, te duljine izloženosti. Stanična linija MCF-7 pokazuje aktivaciju AMPK samo nakon dugotrajne izloženosti (Slika 10A) kada je pokazan već smanjeni antioksidacijski kapacitet – smanjena ekspresija NRF2 i koncentracija GSH. Nasuprot, do aktivacije AMPK u SUM 159 dolazi samo tijekom kratkotrajnog tretmana i pojačava se s porastom koncentracije vodikovog peroksida (Slika 10C), koju prati pad ekspresije NRF2. Izloženost visokim razinama ROS-a dovodi do aktivacije AMPK, dok je pri niskim razinama poprilično malo aktivnog oblika ovog enzima. Pokazano je da u usporedbi sa zdravim tkivom, u stanica tumora dojke prisutna je niža razina AMPK (Hardie 2011). Aktivacija AMPK povezana je i s aktivacijom drugih antioksidacijskih enzima, pa je pokazano da aktivacijom AMPK dolazi do pojačane ekspresije HO-1 preko NRF2/ARE signalnog puta (Liu i sur. 2011), što smo djelomično i potvrdili.

U stanica tumora dojke Perquin i sur. (2001) pokazali su pojačanu aktivnost GSH, GPx i GR, a zbog utjecaja ROS-a povećava se sinteza GSH-a (Valko i sur. 2006). Slično, Tas i sur. (2005) pokazali su veću aktivnost SOD i GPx, ali sniženu aktivnost CAT koja je rezultirala nakupljanjem vodikovog peroksida. U radu je pokazana povećana koncentracija GSH nakon

kratkotrajne i dugotrajne izloženosti visokim koncentracijama vodikovog peroksida samo u staničnoj liniji MCF-7 (Slika 13A), što ovim stanicama daje prednost preživljenja većeg OS-a. U staničnoj liniji MCF-7 izmjerena je znatno viša razina GSH u odnosu na druge dvije stanične linije te je jedino u njoj došlo po povećanja razine GSH kao odgovor na izloženost višim koncentracijama vodikova peroksida. Rezultat je u skladu s izmjerenim nižim razinama ROS-a te uz nalaz veće vijabilnosti govori u prilog povećanoj otpornosti stanica MCF-7 na izazvani oksidacijski stres. Nakon duže izloženosti u svih je staničnih linija došlo do pada koncentracije GSH koja je povezana s porastom unutarstanične razine ROS-a te porastom osjetljivosti (Slika 13). Prema dobivenom, antioksidacijska sposobnost MCF-7 stanične linije puno više ovisi o aktivnosti GSH nego ostale dvije stanične linije. Tijekom istraživanja nije primijećena promjena u aktivnosti CAT, osim pada aktivnosti nakon dugotrajne izloženosti stanične linije SUM 159 najvišim koncentracijama vodikovog peroksida (Slika 14). Aktivnost CAT stabilna je neovisno o koncentraciji dodanog vodikovog peroksida, pa je prisutna CAT bila dovoljna za eliminaciju vodikovog peroksida ili je to obavljao drugi enzim. U drugih je studija stabilna razina CAT povezana s nižim razinama vodikovog peroksida i smanjenom proliferacijom (Policastro i sur. 2004). Zbog smanjene aktivnosti CAT mnogi tumori imaju smanjeni kapacitet detoksikacije vodikova peroksida (Valko i sur. 2006).

Prema navedenom, stanična linija SUM 159 se pokazala najosjetljivija i ne toliko podložna aktivaciji NRF2 signalnog puta, dok je stanična linija MCF-7 bila najotpornija. Tako možemo pretpostaviti da bi stanična linija SUM 159 mogla biti najosjetljivija na prooksidacijske protutumorske lijekove.

6. ZAKLJUČAK

Vidljive su sljedeće razlike u odgovoru staničnih linija tumora dojke, MCF-7, SkBr-3 i SUM 159 na izazvani OS (tretman vodikovim peroksidom):

1. U svim je staničnim linijama došlo do smanjenja stanične vijabilnosti i porasta unutarstanične razine ROS-a u ovisnosti o dodanoj koncentraciji i duljini izloženosti vodikovom peroksidu.

2. Produžena izloženost stanica vodikovom peroksidu dodatno je smanjila staničnu vijabilnost u svim staničnim linijama.

3. Najizraženiji učinak tretmana vidio se kod najosjetljivije stanične linije SUM 159 koja je, neovisno o duljini izloženosti, imala i najvišu razinu unutarstaničnog ROS-a, dok su najniže razine ROS-a tijekom duže izloženosti izmjerene u staničnoj liniji MCF-7, koja se ujedno pokazala i najmanje osjetljivom na učinke tretmana.

4. Stanične linije MCF-7 i SkBr-3 su na jednokratni povišeni OS reagirale pojačanom ekspresijom transkripcijskog faktora NRF2 dok je u staničnoj liniji SUM 159 isti izazvao nižu ekspresiju, što odgovara njihovim vijabilnostima i endogenim razinama ROS-a. Isti učinak je izostao kod duže izloženosti te može objasniti primijećeno dodatno smanjenje stanične vijabilnosti.

5. Ekspresija HO-1, općenito najviša u staničnoj liniji SUM 159, rasla je nakon kratkotrajne izloženosti višim koncentracijama vodikovog peroksida u sve tri stanične linije s time da je najveći porast ekspresije imala stanična linija MCF-7. Nasuprot, duža izloženost je doprinijela smanjenju ekspresije HO-1.

6. Aktivacija AMPK je rasla s porastom koncentracije vodikovog peroksida i duljinom izloženosti u staničnoj liniji SkBr-3. U MCF-7 je do aktivacije došlo nakon dugotrajnog tretmana, a kod SUM 159 nakon kratkotrajnog tretmana. U oba slučaja je bila smanjena ekspresija NRF2. Nadalje, aktivacija AMPK je korelirala s ekspresijom HO-1 u SUM 159 i SkBr-3 nakon kratkotrajne izloženosti.

7. Nisu primijećene promjene u ekspresiji enzima NQO1 niti u aktivnosti katalaze u ovisnosti o dodanoj koncentraciji i duljini izloženosti vodikovom peroksidu.

8. Koncentracija GSH u svim je staničnim linijama padala nakon dugotrajne izloženosti, dok je porast bio vidljiv samo kod stanične linije MCF-7 nakon tretmana višim koncentracijama vodikovog peroksida, što ujedno može opravdati najnižu razinu ROS-a i njihovu otpornost na ovako izazvani oksidacijski stres.

7. LITERATURA

Asher G., Lotem J., Kama R., Sachs L., Shaul Y. (2002): NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 3099–3104.

Bahmani P., Hassanshahi G., Halabian R., Roushandeh A.M., Jahanian-Najafabadi A., Roudkenar M.H. (2011): The expression of Heme oxygenase-1 in human-derived cancer cell lines. *Iran. J. Med. Sci.* **36**: 260–265.

Balendiran G.K., Dabur R., Fraser D. (2004): The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem. Funct.* **22**: 343–352.

Bohr V.A., Taffel B.G., Larminat F. (Birkhauser Verlag: Basel, 1995). *DNA repair, oxidative stress and aging*. *Oxidative Stress Aging* doi:101007/978-3-0348-7337-6.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**: 394–424.

Brown N.S., Bicknell R. (2001): Oxidative stress: Its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **3**: 323–327.

Burdon R.H. (1995): Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 775–794.

Cipak Gasparovic A., Milkovic L., Borovic Sunjic S., Zarkovic N. (2017): Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. *Free Radic. Biol. Med.* **111**: 226–234.

Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo G., Giustarini D., Milzani A. (2009): Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* **34**: 85–96.

Dominko K., Đikić D. (2018): Glutathionylation: A regulatory role of glutathione in physiological processes. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **69**: 1–24.

Dulak J. (2007): Changing faces of heme oxygenases. *Antioxidants Redox Signal.* **9**: 2043–2047.

El-Masry O.S., Brown B.L., Dobson P.R.M. (2012): Effects of activation of AMPK on human breast cancer cell lines with different genetic backgrounds. *Oncol. Lett.* **3**: 224–228.

Evans J.M.M., Donnelly L.A., Emslie-Smith A.M., Alessi D.R., Morris A.D. (2005): Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Br. Med. J.* **330**: 1304–1305.

Glorieux C., Dejeans N., Sid B., Beck R., Calderon P.B., Verrax J. (2011): Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **82**: 1384–1390.

Góth L. (1991): A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta* **196**: 143–151.

Gupta S.C., Hevia D., Patchva S., Park B., Koh W., Aggarwal B.B. (2012): Upsides and downsides of reactive oxygen species for Cancer: The roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants Redox Signal.* **16**: 1295–1322.

Gurer-Orhan H., Ince E., Konyar D., Saso L., Suzen S. (2017): The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Curr. Med. Chem.* **25**: 4084–4101.

Harder B., Jiang T., Wu T., Tao S., La Vega M.R. De, Tian W., Chapman E., Zhang D.D. (2015): Molecular mechanisms of Nrf2 regulation and how these influence chemical modulation for disease intervention. *Biochem. Soc. Trans.* **43**: 680–686.

Hardie D.G. (2011): AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **25**: 1895–1908.

Hardie D.G., Carling D. (1997): The AMP-activated protein kinase. Fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* **246**: 259–273.

Harris I.S., Treloar A.E., Inoue S., Sasaki M., Gorrini C., Lee K.C., Yung K.Y., Brenner D., Knobbe-Thomsen C.B., Cox M.A., Elia A., Berger T., Cescon D.W., Adeoye A., Brüstle A., Molyneux S.D., Mason J.M., Li W.Y., Yamamoto K., Wakeham A., Berman H.K., Khokha R., Done S.J., Kavanagh T.J., Lam C.-W., Mak T.W. (2015): Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression. *Cancer Cell* **27**: 211–222.

Hill M., Pereira V., Chauveau C., Zagani R., Remy S., Tesson L., Mazal D., Ubillos L., Brion R., Ashgar K., Mashreghi M.F., Kotsch K., Moffett J., Doebis C., Seifert M., Boczkowski J., Osinaga E., Anegón I. (2005): Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J.* **19**: 1957–1968.

Holmström K.M., Finkel T. (2014): Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**: 411–421.

Jaganjac M., Milkovic L., Sunjic S.B., Zarkovic N. (2020): The nrf2, thioredoxin, and glutathione system in tumorigenesis and anticancer therapies. *Antioxidants* **9**: 1–41.

Jones D.P., Carlson J.L., Mody V.C., Cai J., Lynn M.J., Sternberg P. (2000): Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 625–635.

Kang K.W., Lee S.J., Kim S.G. (2005): Molecular Mechanism of Nrf2 Activation by Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **7**: 1664–1673.

Klaunig J.E., Xu Y., Isenberg J.S., Bachowski S., Kolaja K.L., Jiang J., Stevenson D.E., Walborg E.F. (1998): The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **106**: 289–295.

Lau A., Villeneuve N.F., Sun Z., Wong P.K., Zhang D.D. (2008): Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol. Res.* **58**: 262–270.

Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R., Wessjohann L.A., Seliger B. (2015): Hydrogen peroxide - Production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun. Signal.* **13**: .

Liou G.Y., Storz P. (2010): Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **44**: 479–496.

Liu X.M., Peyton K.J., Shebib A.R., Wang H., Korthuis R.J., Durante W. (2011): Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **300**: 84–93.

Lushchak V.I. (2014): Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224**: 164–175.

Ma L., Zhu W.Z., Liu T.T., Fu H.L., Liu Z.J., Yang B.W., Song T.Y., Li G.R. (2015): H₂O₂ inhibits proliferation and mediates suppression of migration via DLC1/RhoA signaling in cancer cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**: 1637–1642.

Mahalingaiah P.K.S., Singh K.P. (2014): Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* **9**: e87371.

Makki J. (2015): Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin. Med. Insights Pathol.* **8**: 23–31.

Marzo N. Di, Chisci E., Giovannoni R. (2018): The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells* **7**: 156.

Masella R., Benedetto R. Di, Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **16**: 577–586.

Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. (2000): Role of reactive oxygen species in apoptosis: Implications for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 157–170.

Medina M.V., Sapochnik D., Garcia Solá M., Coso O. (2020): Regulation of the Expression of Heme Oxygenase-1: Signal Transduction, Gene Promoter Activation, and Beyond. *Antioxid. Redox Signal.* **32**: 1033–1044.

Menegon S., Columbano A., Giordano S. (2016): The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol. Med.* **22**: 578–593.

Milkovic L., Cipak Gasparovic A., Cindric M., Mouthuy P.A., Zarkovic N. (2019): Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells* **8**: 1–14.

Milkovic L., Cipak Gasparovic A., Zarkovic N. (2015): Overview on major lipid peroxidation bioactive factor 4-hydroxynonenal as pluripotent growth-regulating factor. *Free Radic. Res.* **49**: 850–860.

Milkovic L., Siems W., Siems R., Zarkovic N. (2014): Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Curr. Pharm. Des.* **20**: 6529–42.

Milkovic L., Zarkovic N., Saso L. (2017): Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* doi:10.1016/j.redox.2017.04.013.

Otterbein L.E., Soares M.P., Yamashita K., Bach F.H. (2003): Heme oxygenase-1: Unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* **24**: 449–455.

Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. (2003): Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* **333**: 19–39.

Perou C.M., Sørile T., Eisen M.B., Rijn M. Van De, Jeffrey S.S., Renshaw C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge Ø., Pergammenschlkov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. (2000): Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747–752.

Perquin M., Oster T., Maul A., Froment N., Untereiner M., Bagrel D. (2001): The glutathione-related detoxification system is increased in human breast cancer in correlation with clinical and histopathological features. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**: 368–374.

Phan L.M., Yeung S.C.J., Lee M.H. (2014): Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol. Med.* **11**: 1–19.

Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017): Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**: .

Policastro L., Molinari B., Larcher F., Blanco P., Podhajcer O.L., Costa C.S., Rojas P., Durán H. (2004): Imbalance of Antioxidant Enzymes in Tumor Cells and Inhibition of Proliferation and Malignant Features by Scavenging Hydrogen Peroxide. *Mol. Carcinog.* **39**: 103–113.

Queiroz E.A.I.F., Puukila S., Eichler R., Sampaio S.C., Forsyth H.L., Lees S.J., Barbosa A.M., Dekker R.F.H., Fortes Z.B., Khaper N. (2014): Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* **9**: .

Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. (2012): Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**: 981–990.

Renschler M.F. (2004): The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. *Eur. J. Cancer* **40**: 1934–1940.

Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. (2010): Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 1603–1616.

Rodrigues C., Milkovic L., Bujak I.T., Tomljanovic M., Soveral G., Cipak Gasparovic A. (2019): Lipid Profile and Aquaporin Expression under Oxidative Stress in Breast Cancer Cells of Different Malignancies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**: .

Ross D., Siegel D. (2017): Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. *Front. Physiol.* **8**: 1–10.

Salganik R.I., Albright C.D., Rodgers J., Kim J., Zeisel S.H., Sivashinskiy M.S., Dyke T.A. Van (2000): Dietary antioxidant depletion: Enhancement of tumor apoptosis and inhibition of brain tumor growth in transgenic mice. *Carcinogenesis* **21**: 909–914.

Schieber M., Chandel N.S. (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24**: .

Siegel D., Bolton E.M., Burr J.A., Liebler D.C., Ross D. (1997): The reduction of α -tocopherolquinone by human NAD(P)H: Quinone oxidoreductase: The role of α -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol. Pharmacol.* **52**: 300–305.

Siegel D., Gustafson D.L., Dehn D.L., Han J.Y., Boonchoong P., Berliner L.J., Ross D. (2004): NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: Role as a superoxide scavenger. *Mol. Pharmacol.* **65**: 1238–1247.

Sies H. (2017): Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **11**: 613–619.

Sørli T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., Rijn M. Van De, Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L. (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 10869–10874.

Storz P. (2005): Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* **10**: 1881–1896.

Szatrowski T.P., Nathan C.F. (1991): Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Res.* **51**: 794–798.

Tas F., Hansel H., Belce A., Ilvan S., Argon A., Camlica H., Topuz E. (2005): Oxidative Stress in Breast Cancer Carcinogenesis. *Med. Oncol.* **22**: 11–15.

Tietze F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**: 502–522.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350–4354.

Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **266**: 37–56.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 44–84.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**: 1–40.

Vara-Ciruelos D., Russell F.M., Hardie D.G. (2019): The strange case of AMPK and cancer: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Open Biol.* **9**: .

Wlassoff W.A., Albright C.D., Sivashinski M.S., Ivanova A., Appelbaum J.G., Salganik R.I. (2007): Hydrogen peroxide overproduced in breast cancer cells can serve as an anticancer prodrug generating apoptosis-stimulating hydroxyl radicals under the effect of tamoxifen-ferrocene conjugate. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**: 1549–1553.

Yang Y., Zhang Y., Wu Q., Cui X., Lin Z., Liu S., Chen L. (2014): Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **33**: 1–9.

8. PRILOZI

Popis priloga:

- I. Tablica s popisom korištenih kemikalija

Kemikalije korištene u ovom istraživanju nabrojane su u Tablica 3, kao i pripadajući kataloški brojevi te proizvođači.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

Proizvođači	Kemikalije	Kataloški brojevi
Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, SAD	Amonijev persulfat (APS)	1610700
	Reagens za bojanje proteina (5x)	5000006
	30 % akrilamid/bis- (29:1)	A124.1
Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka	Glicin	0079.3
	Mlijeko u prahu	T145.1
	NADPH	AE14.1
	TEMED	2367.3
	Tween 20	9127.1
	30 % vodikov peroksid	P159917
Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska	Metanol	P140500
	Natrijev klorid	P148590
Kemika, Zagreb, Hrvatska	Amonijev molibdat	0135508
	EDTA	1158510
	Glicerol	0711901
	Kalijev dihidrogenfosfat	1112408
Michrome, London, UK	Bromfenol plavo	
Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	BSA	A7030
	DCFH-DA	D6883
	Dimetil-sulfoksid (DMSO)	1.02952
	Ditiotreitol (DTT)	D0632
	DMEM (crveni)	D5648
	DMEM (bezbojni)	D1145
	DTNB	D8130
	FCS	F7524
	Glutation reduktaza (GR)	G3664
	Inhibitor proteaza	MSSAFE
	Ponceau S	P7170
	Reducirani glutation (GSH)	G-6529
	SDS	L-3771
	Tripansko modriilo	T6146
	Tripsin (1:250, iz svinjske gušterače)	T0646
	Tris-baza	T1503

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Monika Mlinarić

Datum rođenja: 24.09.1996. (Gospić, Hrvatska)

OBRAZOVANJE:

2018. – 2021. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek, sveučilišni diplomski studij Eksperimentalna biologija, modul: Fiziologija i imunobiologija

2015. – 2018. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek, sveučilišni preddiplomski studij Biologija

2011. – 2015. Srednja škola Otočac, Opća gimnazija

2003. – 2011. Osnovna škola Zrinskih i Frankopana Otočac

LABORATORIJSKA STRUČNA PRAKSA:

2019. Medicinski fakultet u Beču, Centar za fiziologiju i farmakologiju, Institut za vaskularnu biologiju i istraživanje tromboze (pod vodstvom dr. rer. nat. Ulrike Resch)

2018. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju (pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić)

TEČAJEVI:

2018. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka (kategorija A)

PROJEKTI:

2017. Istraživačko - edukacijski projekt "Insula Tilagus 2017", Sekcija za mikrobiologiju (BIUS)

2017. – 2019. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, manifestacija Noć Biologije

STIPENDIJE:

2019. Austrijska agencija za međunarodnu suradnju u području obrazovanja i istraživanja (OeAD-GmbH), CEEPUS (Srednjoeuropski program razmjene za sveučilišne studije) CIII-Free Mover

2018. – 2021. Grad Otočac, Gradska stipendija

2017. – 2018. Ministarstvo znanosti i obrazovanja, STEM stipendija