

Terapeutski potencijal resveratrola i cisplatine na rast tumora miša u hipertermalnim uvjetima

Prusina, Maria

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:927764>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Maria Prusina

**Terapeutski potencijal resveratrola i
cisplatine na rast tumora miša u
hipertermalnim uvjetima**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić i komentorici mr. sc. Dyani Odeh, univ. spec. techn. aliment. na neizmjernej pomoći, korisnim savjetima, izdvojenom vremenu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojim kolegicama i kolegama s PMF-a i FPMOZ-a koji su upotpunili ovo razdoblje mog života.

Najljepše hvala mojim dragim prijateljicama na podršci, razumijevanju, ohrabrivanju i komedijama tijekom svih ovih godina.

Također, hvala teti Blaži i ostalim članovima moje obitelji koji su me bodrili i željno iščekivali završetak mog studija.

Najveće HVALA tati, mami i Kiki bez kojih ništa od ovog ne bi bilo moguće. Hvala vam na bezuvjetnoj potpori, ljubavi, brizi i razumijevanju. Hvala vam na svemu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Terapeutski potencijal resveratrola i cisplatine na rast tumora u hipertermalnim uvjetima

Maria Prusina

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti terapeutski potencijal resveratrola u kombinaciji s cisplatinom na rast tumora u hipertermalnim uvjetima u miša, odnosno djelovanje ove kombinacije na inhibiciju angiogeneze i rasta tumora te na polarizaciju makrofaga. Uz to, istraženo je može li višemodalni pristup s hipertermijom i resveratrolom dokinuti otpornost tumorskih stanica na cisplatinu kroz modulaciju aktivnosti histonskih deacetilaza (HDAC) i proteina toplinskog stresa te tako doprinijeti izravnoj toksičnosti na tumorske stanice. Tumor je izazvan injiciranjem 1×10^6 stanica EAT subkutano (sc) u bedro miševima soja Swiss albino. Miševi su obrađeni davanjem resveratrola per os (po) u dozi od 50 mg/kg tijekom pet dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora i/ili cisplatinom koja je injicirana intraperitonealno (ip) u dozama od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te 5 mg/kg 15. dan. Neposredno nakon obrade miševi su izloženi sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Rezultati pokazuju da primjena resveratrola i cisplatine s hipertermijom jest učinkovit pristup u terapiji tumora. Uspješno inhibira angiogenezu i rast tumora te modulira polarizaciju makrofaga prema fenotipu M1. Također, dokida otpornost tumorskih stanica na cisplatinu kroz modulaciju aktivnosti HDAC-a i razine šaperona HSP-70 i HSP-90 te tako doprinosi povećanju životnog vijeka miševa.

Ključne riječi: EAT, resveratrol, hipertermija, cisplatina, protutumorski učinak (75 stranica, 16 slika, 5 tablica, 162 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Komentor: Dyana Odeh, *univ. spec. techn. aliment.*

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 08.09.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Therapeutic potential of resveratrol and cisplatin on mouse tumor growth in hyperthermal conditions

Maria Prusina

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to investigate the therapeutic potential of resveratrol in combination with cisplatin on mouse tumor growth in hyperthermal conditions, i.e. the effect of this combination on inhibition of angiogenesis and tumor development, and on macrophage polarization. In addition, it was investigated whether a multimodal approach with hyperthermia and resveratrol could abolish cisplatin resistance in tumor cells through modulation of histone deacetylases (HDAC) activity and heat shock proteins, contributing to direct toxicity on tumor cells. The tumor was induced by injecting 1×10^6 EAT cells subcutaneously (*sc*) into the thighs of Swiss albino mice. Mice were treated with resveratrol *per os* for five consecutive days beginning on day 2 after tumor injection and/or by injecting cisplatin intraperitoneally (*ip*) at a dose of 2.5 mg/kg on days 10 and 12 and a dose of 5 mg/kg on day 15. Immediately thereafter, mice were exposed to systematic hyperthermia for 15 min at a temperature of 41 °C. Results show that the administration of resveratrol and cisplatin with hyperthermia is an effective approach in tumor therapy. It successfully inhibits angiogenesis and tumor growth and modulates macrophage polarization to the M1 phenotype. Also, it abolishes tumor cells' cisplatin resistance through modulation of HDAC activity and concentration of HSP-70 and HSP-90 chaperones, contributing to the increased lifespan of mice.

Keywords: EAT, resveratrol, hyperthermia, cisplatin, antitumor effect
(75 pages, 16 figures, 5 tables, 162 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD
Co-mentor: Dyana Odeh, *univ. spec. techn. aliment.*

Reviewers: Prof. Nada Oršolić, PhD
Assoc Prof. Jasna Lajtner, PhD
Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted: 08.09.2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumori	1
1.1.2. Širenje tumora	2
1.1.3. Epigenetske promjene tumora	8
1.1.3.1. Histonske deacetilaze	8
1.1.4. Polarizacija makrofaga	9
1.2. Kemoterapija	12
1.2.1. Cisplatina	12
1.3. Resveratrol	14
1.4. Hipertermija	16
1.5. Proteini toplinskog stresa	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Pokusne životinje	20
3.1.2. Tumorske stanice	20
3.1.3. Laboratorijska oprema	20
3.1.4. Resveratrol	21
3.1.5. Cisplatina	21
3.1.6. Hipertemija	21
3.2. Metode	22
3.2.1. Obrada životinja	22
3.2.3. Praćenje promjene volumena tumora i inhibicije rasta tumora	22
3.2.4. Preživljavanje	23

3.2.5. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima tumorskog tkiva metodom po Lowryju	23
3.2.6. Određivanje koncentracije VEGF-a	24
3.2.7. Određivanje koncentracije matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2).....	24
3.2.8. Određivanje koncentracije matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9).....	25
3.2.9. Mjerenje dušikovog oksida metodom prema Griessu	25
3.2.10. Mjerenje aktivnosti arginaze	26
3.2.11. Određivanje koncentracije proteina toplinskog stresa HSP-70 i HSP-90	26
3.2.11.1. Određivanje koncentracije HSP-70	27
3.2.11.2. Određivanje koncentracije HSP-90	27
3.2.12. Nuklearna ekstrakcija.....	28
3.2.13. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	28
3.2.14 Kolorimetrijsko mjerenje aktivnosti HDAC	29
3.2.15. Statistička obrada podataka	30
4. REZULTATI.....	31
4.1. Promjena tjelesne mase	31
4.2. Promjena volumena tumora	33
4.3. Inhibicija rasta tumora.....	34
4.4. Preživljavanje životinja	36
4.5. Koncentracija krvožilnog endotelnog čimbenika rasta u tumorskom tkivu.....	38
4.6. Koncentracija matriksne metaloproteinaze 2 (MMP-2) u tumorskom tkivu	39
4.7. Koncentracija matriksne metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tumorskom tkivu	40
4.8. Aktivnost dušikova oksida (NO) u tumorskom tkivu	42
4.9. Aktivnost arginaze (Arg-1) u tumorskom tkivu.....	43
4.10. Koncentracija proteina toplinskog stresa HSP-70 (engl. <i>HSP - heat shock protein</i>) u tumorskom tkivu	45

4.11. Koncentracija proteina toplinskog stresa HSP-90 (engl. <i>HSP - heat shock protein</i>) u tumorskom tkivu	46
4.12. Aktivnost histonskih deacetilaza u tumorskom tkivu	48
5. RASPRAVA.....	50
6. ZAKLJUČAK	56
7. LITERATURA.....	57
8. ŽIVOTOPIS	1

1. UVOD

1.1. Tumori

Tumor (lat. *tumor*, *-oris*, *m.*- oteklina), neoplazma (lat. *neoplasia*, *-ae*, *f.* – novotvorenina) ili blastom (grč. *blastos*, *-u*, *m.* klica + sufiks *-oma* što označava novotvoreninu) nakupina je promijenjenih stanica određenog tkiva u obliku izraslina ili oteklina. Značajke takvih stanica su gubitak normalnih mehanizama regulacije rasta što uzrokuje nekontroliranu, autonomnu, nesvrhovitu diobu (Taradi, 2010; Jiang i sur., 2015). Dva osnovna dijela tumora su parenhim i potporna stroma. Parenhim tumora je građen od promijenjenih stanica po kojem tumor dobiva svoje ime i određuje biološko ponašanje tumora. Potporna stroma je građena od vezivnog tkiva i krvnih žila koje su presudne za rast i razvoj tumora (De Wever i Mareel, 2003; Jiang i sur., 2015).

Proces nastanka tumora se naziva tumorigenezom, a započinje nastankom tumorske stanice iz koje će se razviti tumorski čvor, kao rezultat dugotrajnih i postupnih genetskih i epigenetskih promjena koje mogu biti stečene ili nasljedne, a koje se nakupe u samoj stanici čime ona poprima nove biološke osobine odnosno maligni fenotip (Pecorino, 2012; Jiang i sur., 2015). Tri glavne skupine gena u kojima se događaju promjene koje dovode do malignosti su onkogeni, tumorsupresorski geni te geni proteina koji sudjeluju u popravku oštećenja DNA (Kingston 2002). U prvoj fazi tumorigeneze, inicijaciji, dolazi do nastanka trajnih i ireverzibilnih mutacija kao posljedica izlaganja stanice određenoj dozi nekog karcinogena. Druga faza tumorigeneze je promocija, koju karakterizira stimulacija proliferacije prethodno promijenjenih stanica te dolazi do promjena koje su kronične i reverzibilne. Treću fazu tumorigeneze, progresiju, karakterizira genska nestabilnost, nekontroliran rast, invazivnost, metastatski potencijal, jača angiogenska aktivnost, smanjena imunogenost te aktivacija telomeraze (Hanahan i Weinberg, 2011). Inicijatori tumorigeneze mogu biti fizički, biološki (endogena i infektivna) i kemijski (Pecorino 2012).

Tumori se prema biološkom ponašanju mogu podijeliti u 3 skupine: benigni, maligni i semimaligni tumori. Benigni tumori su u pravilu oštro ograničeni na tkiva u kojima se razvijaju, rastu ekspanzivno i ne stvaraju metastaze. Maligni tumori nisu oštro graničeni, rastu infiltrativno i metastaziraju u okolna tkiva i organe šireći se krvlju, limfom ili šupljinama organa. Semimaligni (granični) tumori imaju nizak maligni potencijal i ponekad ih je teško razlikovati od malignih tumora niskog histološkog gradusa (Jukić i sur., 2002).

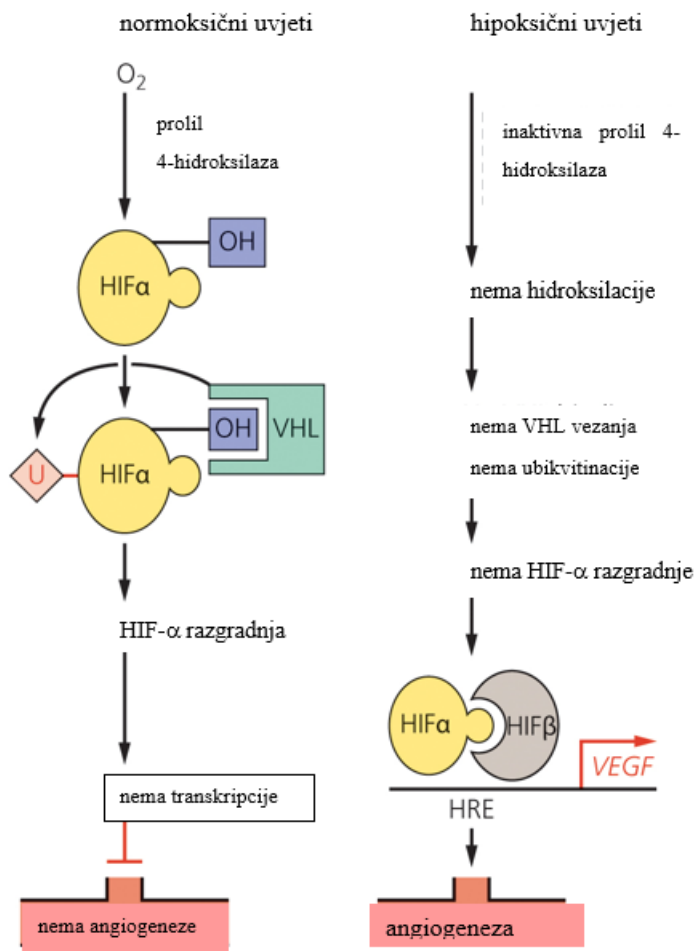
1.1.2. Širenje tumora

Kako tumor raste, dolazi do stanja hipoksije (niske koncentracije kisika). Inducibilni čimbenik hipoksije 1α (HIF- 1α , engl. *hypoxia-inducible factor 1- α*) se ne razgrađuje te heterodimerizira s podjedinicom HIF- 1β (engl. *hypoxia-inducible factor 1- β*) u transkripcijski čimbenik HIF koji potiče ekspresiju gena čimbenika rasta krvožilnog endotela (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*). U normalnim uvjetima razine kisika, aktivna je prolil-4-hidroksilaza koja hidroksilira podjedinicu HIF- 1α , na čiju se OH skupinu veže protein VHL (von Hippel-Lindau) te označava HIF- 1α za ubikvitinaciju i razgradnju stoga nema vezanja s podjedinicom HIF- 1β u transkripcijski čimbenik HIF. Pri niskim koncentracijama kisika inaktivna je prolil-4-hidroksilaza i nema označavanja HIF- 1α za razgradnju (Slika 1).

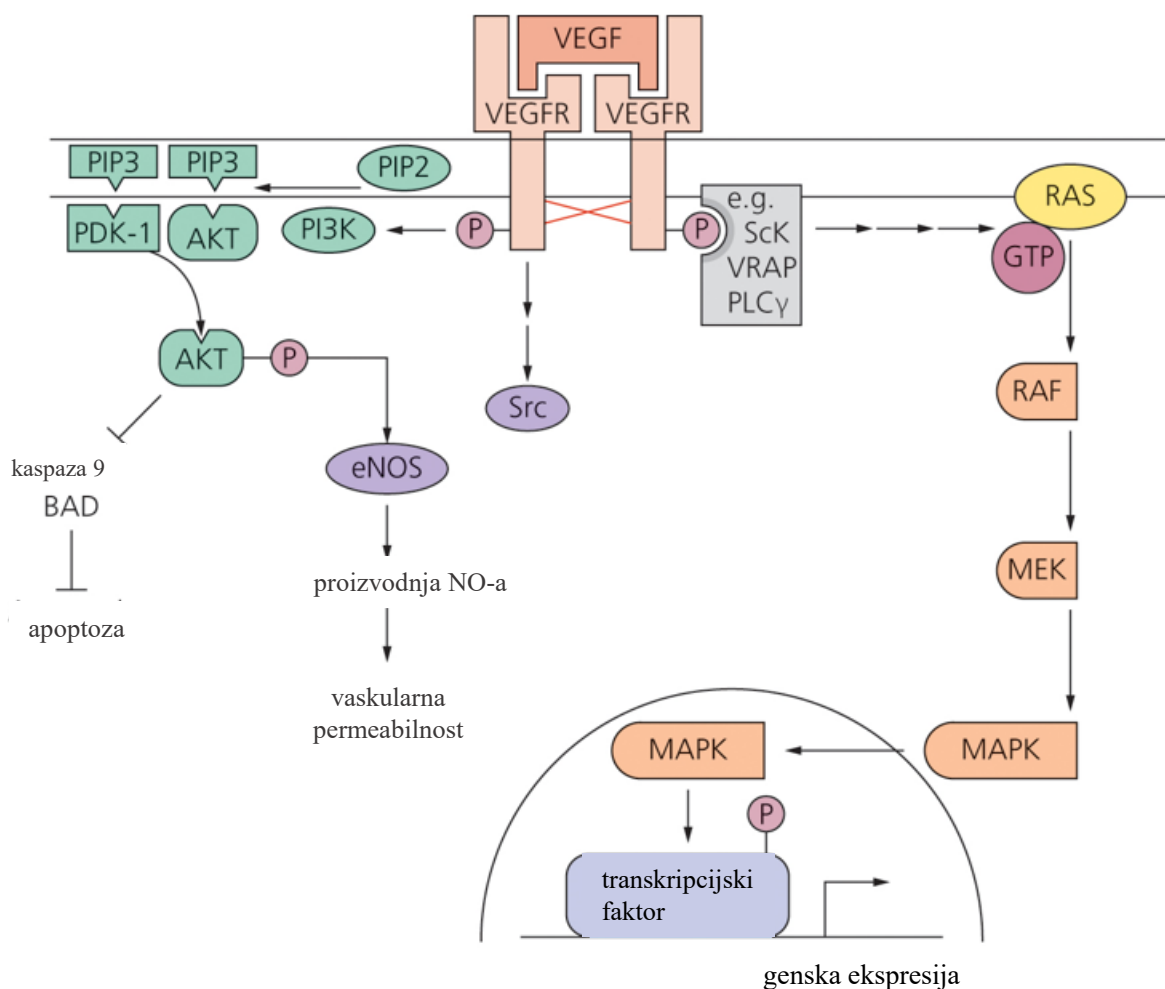
VEGF potiče nastajanje novih krvnih žila u procesu koji se naziva angiogeneza. Da bi stanice mogle dobivati hranjive tvari i kisik, moraju biti udaljene od najbliže krvne žile oko 100-200 μm , što odgovara difuzijskom kapacitetu kisika. Rastom tumora, određene tumorske stanice se mogu naći u stanju hipoksije i dolazi do ekspresije VEGF, kao što je već opisano. VEGF je početni igrač u iniciranju angiogeneze, a brojni angiopoetini i efrini su bitni za daljnje sazrijevanje.

Vezanjem VEGF za receptore VEGF (VEGFR) dolazi do njihove dimerizacije i autofosforilacije te se aktivira signalni put RAS-Raf-MAP kao i PI3K (engl. *Phosphatidylinositol-3-kinase*) (Slika 2). Osim hipoksije, kao angiogeni „okidač“ mogu djelovati i onkoproteini i gubitak tumor-supresora. Primjerice, transkripcijski čimbenik p53 u normalnim uvjetima veže i aktivira promotor gen *trombospondin-1*, čiji protein trombospondin-1 djeluje kao antiangiogeni čimbenik, a mutacije u *p53* genu rezultiraju smanjenjem tog inhibitora angiogeneze (Pecorino, 2012).

Porodicu VEGF proteina čini 5 članova (VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VGFE) koji su odgovorni za prenošenje signala preko tri receptora VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3). Proizvodnja VEGF-a u tumorskim stanicama je povećana. Indukcija promotora VEGF u nepromijenjenim stanicama koje okružuju tumorske pokazuje da postoji suradnja normalnih (nepromijenjenih) i tumorskih (promijenjenih) stanica (Pecorino, 2012).



Slika 1. Indukcija angiogeneze hipoksijom (preuzeto i prilagođeno prema Pecorino, 2012).



Slika 2. Signalni put VEGFA. Jedna molekula VEGFA se veže za dva receptora VEGFR2 koji dimeriziraju i autofosforiliraju. Proteini s domenama SH2 (siva boja) se vežu za fosforilirani receptor i aktiviraju kaskadu RAS-Raf-MAP. Također, aktivira se i PI3K. AKT dovodi do inhibicije apoptoze. AKT stimulira i endotelnu sintazu dušikovog oksida (eNOS) na proizvodnju NO što vodi krvožilnoj permeabilnosti (preuzeto i prilagođeno prema Pecorino, 2012).

Sam proces angiogeneze sastoji se od vazodilatacije, razgradnje bazalne membrane proteolitičkim enzimima, migracije endotelnih stanica prema angiogenom stimulatoru, proliferacije i sazrijevanja endotelnih stanica te mobilizacije pericita (Pecorino, 2012; Viallard i Larrivé, 2017). Osim što omogućava prožiljenost rastućeg primarnog tumora, angiogeneza je također bitna u procesu metastaziranja, gdje na isti način omogućava prožiljenost metastaza.

Metastaziranje je proces u kojem tumorske stanice napuštaju mjesto nastanka (primarno mjesto), invadiraju i šire se po tijelu stvarajući metastaze. Koraci u procesu metastaziranja su invazija, intravazacija, transport, ekstravazacija, metastatska kolonizacija te angiogeneza. Da bi invazija tumora i metastaziranje bili mogući, potrebna je proteolitička razgradnja izvanstaničnog matriksa (ECM, engl. *extracellular matrix*). Dolazi i do promjena u reakcijama između stanica i između stanica i ECM te migracije tumorskih stanica kroz bazalnu membranu. Tumorska stanica epitelnog fenotipa poprima fenotip mezenhimske stanice.

Proteini koji razgrađuju bazalnu membranu i ECM zovu se matriksne metaloproteinaze (MMP, engl. *matrix metalloproteinases*) (Pecorino, 2012). MMP su endopeptidaze koje sadrže cink (Zn^{2+}) ovisan o kalciju (Ca^{2+}). Supstrati za MMP mogu biti različiti prekursori i receptori čimbenika rasta, adhezijskih receptora, citokina i njihovih receptora (Pittayapruek i sur., 2016). Na temelju specifičnosti svojih supstrata i funkcije, mogu se razlikovati gelatinaze, stromelizini, kolagenaze, matrilizini, membranske (MT) vrste MMP-a te ostale (skupina neimenovanih) (Tablica 1) (Sbardella i sur., 2012).

Tablica 1. Skupine ljudskih MMP*

Skupina MMP	Naziv MMP	Alternativno ime	Supstrati
Gelatinaze	MMP-2	gelatinaza A	gelatin, kolagen I, II, III, IV, V, VII, X, elastin, osteonektin, agrekan, laminin, fibronektin
	MMP-9	gelatinaza B	gelatin, kolagen III, IV, V, VII, X, XI, elastin, agrekan, fibronektin, vitronektin,
Stromelizini	MMP-3	stromelizin-1	kolagen III, IV, V, IX, X, XI, gelatin, agrekan, osteonektin, tenascin, fibronektin, laminin, perlekan
	MMP-10	stromelizin-2	kolagen III, IV, V, IX, X, XI laminin, fibronektin, elastin, gelatin, agrekan, tenascin
	MMP-11	stromelizin-3	fibronektin, laminin, agrekan, gelatin
Kolagenaze	MMP-1	intersticijska kolagenaza	kolagen I, II, III, VII, VIII, X, gelatin, entaktin (nidogen-1), agrekan, tenascin, perlekan
	MMP-8	neutrofilna kolagenaza	kolagen I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatin, entaktin (nidogen-1), agrekan, tenascin, fibronektin

	MMP-13	kolagenaza-3	kolagen I, II, III, IV, VII, IX, X, XIV; agrekan, gelatin, osteonektin, fibronektin, laminin, perlekan, tenascin
Matrilizini	MMP-7	matrilizin-1	fibronektin, laminin, kolageni III, IV, V, IX, X, XI; gelatin, elastin, agrekan, tenascin, vitronektin
	MMP-26	matrilizin-2	fibrinogen, fibronektin, kolagen IV, gelatin, vitronektin
MT-MMP	MT1-MMP	MMP-14	kolageni I, II, III; gelatin, agrekan, fibronektin, fibrin, laminin, proteoglikani, vitronektin
	MT2-MMP	MMP-15	fibronektin, tenscin, nidogen, agrekan, kolagen, gelatin, perlekan, vitronektin
	MT3-MMP	MMP-16	kolagen III, agrekan, gelatin, fibronektin, vitronektin
	MT4-MMP	MMP-17	gelatin, fibrinogen
	MT5-MMP	MMP-24	gelatin, fibronektin, vitronektin, agrekan
	MT6-MMP	MMP-25	kolagen IV, fibronektin, fibrin, gelatin, laminin
	MMP-23A	femalizin	nepoznato
	MMP-23B	/	gelatin
Ostale	MMP-12	makrofag-metaloelastaza	elastin, fibronektin, kolagen IV, gelatin, agrekan, nidogen, osteonektin
	MMP-19	RASI-1	agrekan, elastin, fibrilin, kolagen IV, gelatin
	MMP-20	enamelizin	agrekan, amelogenin, gelatin
	MMP-21	/	/
	MMP-27	/	/
	MMP-28	epilizin	/

*preuzeto i prilagođeno prema Sbardella i sur., 2012

Matriksna metaloproteinaza 2 (MMP-2) poznata je još i pod imenom gelatinaza A ili kolagenaza tipa IV. MMP-2 specifično cijepa kolagen tipa IV, glavnu strukturnu komponentu bazalne membrane (Nagase i Woessner, 1999). MMP-2 ima bitnu ulogu u stvaranju prikladnog mikrookoliša za proliferaciju tumorskih stanica i u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji (EMT, engl. *epithelial–mesenchymal transition*). Matriksna metaloproteinaza 9 (MMP-9) poznata je još kao

gelatinaza B (GELB) ili također, kolagenaza tipa IV (Pittayapruek i sur., 2016). Ekspresija MMP-9 je povećana u različitim tipovima malignih tumora, uključujući karcinom dojke (Yan i sur., 2022). Povećana razina MMP-2 i MMP-9 je povezana s invazivnim i metastatskim potencijalom malignog tumora jajnika (Stack i sur., 1998). Osim toga, u istraživanju metastaziranja malignog tumora jajnika pokazalo se da je potaknuta ekspresija MMP-2 nakon vezanja kancerogenih stanica jajnika za mezotelium (Kenny i sur., 2008).

1.1.3. Epigenetske promjene tumora

Stanice tumora u cijelom genomu imaju promjene koje se očituju u nizu epigenetičkih biljega, kao što su globalna hipometilacija, specifična promotorska hipermetilacija, smanjenje aktivnosti malih nekodirajućih miRNA (mikro RNA) te histonska deacetilacija (Taby i Issa, 2010).

1.1.3.1. Histonske deacetilaze

Kovalentne modifikacije histonskih repova moduliraju strukturu kromatina. Lizin pri neutralnom pH nosi pozitivno nabijenu amonijevu skupinu. Dodatak acetilne skupine stvara nenabijenu amidnu skupinu. Pri takvoj promjeni, afinitet histonskog repa za DNA se drastično smanjuje, olabavljujući kompleks histona i DNA (Berg i sur., 2007). Histonske acetilaze (HAT, engl. *histone acetyltransferases*) dodaju acetilne grupe na lizine histona. Acetiliranje histona može aktivirati transkripciju smanjenjem afiniteta histona za DNA, privlačenjem sastavnica sustava za transkripciju i poticanjem remodeliranja strukture kromatina. Deacetiliranje histona pridonosi prigušivanju transkripcije. Histonske deacetilaze (HDAC, engl. *histone deacetylases*) uklanjaju acetilne grupe i uzrokuju zbijanje kromatina, što otežava vezanje sastavnica sustava za transkripciju na DNA i ne dolazi do transkripcije (Berg i sur., 2007; Pecorino, 2012). Osim regulacije razine acetilacije histona u kromatinu, HDAC mogu modificirati i nehistske proteine, kao što su NF- κ B, p53 i STAT3 (Singh i sur., 2010).

HDAC su grupirane u 4 razreda (I, II, III i IV). Razredi I, II i IV se nazivaju i „klasičnim“ HDAC i broje ukupno 11 članova. Razred III HDAC čine enzimi poznatiji pod nazivom sirtuini. Klasične HDAC i sirtuini se razlikuju u katalitičkim mehanizmima (klasične HDAC su ovisne o Zn^{+} , dok je sirtuinima bitan kofaktor NAD^{+}) (Witt i sur., 2009). Sirtuini mogu imati i tumor-supresorsku i onkoproteinsku ulogu, ovisno o tipu i stadiju tumora (Chalkiadaki i Guarente, 2015). Tumorske stanice imaju povećane koncentracije (klasičnih) HDAC. Hipoksija, koja je česta u tumorskim tkivima, odgovorna je za prekomjernu ekspresiju razreda I HDAC-a, što uzrokuje aktivaciju HIF-1 α i promovira angiogenezu (Liang i sur., 2006). Prekomjerna ekspresija HDAC1 posreduje smanjenju ekspresije p53 i pVHL što rezultira povećanjem ekspresije HIF-1 α , odnosno HDAC1 induciraju angiogenezu negativnom regulacijom tumor-supresorskih gena (Kim i sur., 2001). HDAC stimuliraju proliferaciju stanica i njihovo preživljavanje te su prekomjerno eksprimirane u karcinomu dojke, prostate, želuca i debelog crijeva (Kulka i sur., 2020). Inhibitori HDAC-a potiču apoptozu stanica raka jajnika otpornih na cisplatinu (Muscolini i sur., 2008). Kim

i njegovi suradnici (2012) su potvrdili korelaciju prekomjerne ekspresije HDAC i smanjene osjetljivosti na cisplatinu na staničnim linijama karcinoma jajnika SKOV3 i OVCAR3.

Antiangiogeni učinak inhibitori HDAC-a- postižu utišavanjem proangiogenih gena poput gena za čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF) i/ili gena za endotelnu sintazu dušikovog oksida (eNOS) (Zupkovitz i sur., 2006). Jedan od mogućih mehanizama djelovanja je hiperacetilacija podjedinice HIF-la i posljedično degradacija te podjedinice, pa nema ekspresije VEGF-a (Jeong i sur., 2002). Lijekovi inhibitori dokazano smanjuju količinu receptora VEGF na stanicama neuroblastoma (Deroanne i sur., 2002). Smanjena aktivnost HDAC povećava ekspresiju glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, engl. *Major Histocompatibility Complex*) i kostimulirajućih molekula što rezultira aktivacijom stanica T (Woan i sur., 2015). Izlaganje stanica karcinoma dojke, prostate i gušterača inhibitorima HDAC- povećava osjetljivost na lizu posredovanu T-stanicama (Gameiro i sur., 2016).

1.1.4. Polarizacija makrofaga

Makrofagi su široko rasprostranjeni u organima i vezivnom tkivu, a imaju središnju ulogu u urođenoj i adaptivnoj imunosti. Stanice makrofagne loze potječu od usmjerenih prastanica u koštanoj srži, a njihov nastanak je potaknut čimbenikom rasta monocita (M-CSF, engl. *Monocyte colony stimulating factor*). Sazrijevanjem prastanica nastaju monociti koji ulaze u krvni optjecaj i cirkuliraju, te se premještaju u tkiva u kojima se razvijaju u makrofage. Makrofagi djelovanjem inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS, engl. *Inducible nitric oxide synthase*) stvaraju reaktivne radikale dušika. iNOS je citosolni enzim odsutan u mirujućim makrofagima, ali se može inducirati u odgovoru na IFN- γ . iNOS katalizira pretvorbu arginina u citrulin pri čemu se oslobađa NO.

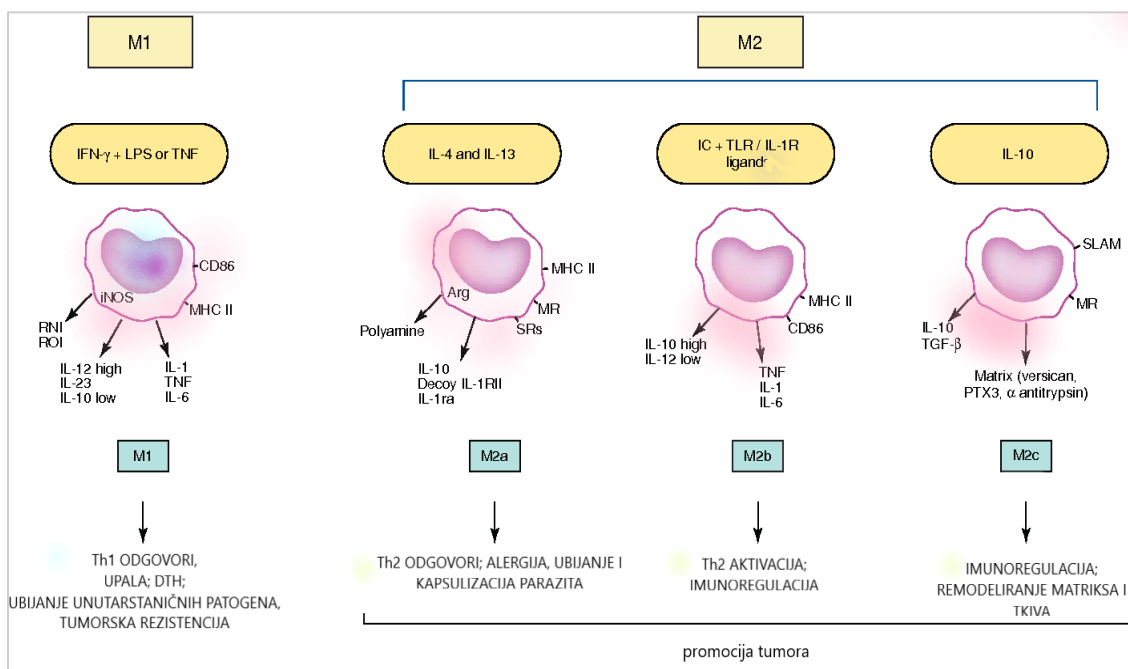
Ovisno o aktivacijskom stanju, makrofagi imaju sposobnost sprječavanja i poticanja rasta i širenja tumora. Makrofagi aktivirani na klasičan način ili M1 makrofagi mogu uništiti brojne tumorske stanice mehanizmima kojima i uobičajeno uništavaju zarazne mikroorganizme. Među tim mehanizmima uništavanja ističe se proizvodnja dušikova oksida (NO) za koji je u nekim mišjim modelima dokazano da može uništiti tumor *in vitro*, ali i *in vivo*. Klasična aktivacija makrofaga može biti inducirana interferonom γ (IFN- γ) ili mikrobnim podražajima kao što su primjerice, ligandi mikroorganizama vezani za receptor TLR te citokinima poput TNF- α . Makrofagi M1 su uspješne imunosne izvršne stanice akutnog upalnog fenotipa, sposobne u

ubijanju mikroorganizama i tumorskih stanica. Ove stanice luče visoke razine klasičnih proupalnih citokina kao što su TNF- α , interleukine IL-1, IL-6, IL-12 ili IL-23 te povećavaju koncentraciju dušikovog oksida (NO), superoksidnih aniona i slobodnih radikala kisika (Abbas i sur., 2015). M1 ekspimiraju visoke razine antigena glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) klase I i II, potrebnih za predočavanje tumorski specifičnih antigena (DeNardo i Ruffell, 2019).

Makrofagi aktivirani alternativnim načinom ili M2 makrofagi, izvor su VEGF-a, TGF- β , MMP-a čime pospješuju angiogenezu i uzrokuju promjene u izvanstaničnom okolišu. Alternativnu aktivaciju makrofaga potiču citokini IL-4 i IL-13 koje proizvode pomoćnički limfociti Th2 i drugi leukociti te djeluju kako bi obuzdali upalu. Oni također mogu poticati cijeljenje tkiva i fibrozu lučenjem čimbenika rasta koji potiču proliferaciju fibroblasta (PDGF), sintezu kolagena (IL-13, TGF- β) te angiogenezu (FGF) (Abbas i sur., 2015). Makrofagi M2 imaju slabu sposobnost predočavanja antigena. U mnogim tumorima prisutno je poticanje fenotipa M2 što pogoduje rastu tumora. Makrofagi M1 imaju citotoksična i antitumorska svojstva, a M2 imaju protumorska svojstva (Slika 3) (Mantovani i sur., 2004). Tumoru pridruženi makrofagi (TAM, engl. *tumor-associated macrophages*) održavaju fenotip sličan fenotipu M2 primanjem polarizacijskih signala iz malignih stanica. Imaju visoku ekspresiju lektinskih receptora tipa C, stabilina-1 i Arg-1 (Mantovani i sur., 2004). Izlučuju brojne čimbenike rasta (VEGF, PDGF, TGF- β), IL-8, MMP proteine, plazmin, urokinazni plazminogen aktivator i receptor, kemokine i dr. (Krecicki i sur, 2001; Balkwill, 2004; Giraudo i sur., 2004; Hagemann i sur, 2006), a sve to pogoduje napredovanju tumora. Prognoza pacijenata sa solidnim tumorima je loša u odnosu na gustoću TAM i njegovih biljega (Bingle i sur., 2002; Qian i Pollard, 2010), osim kod karcinoma ne-malih stanica pluća (NSCLC, engl. *non-small cell lung carcinoma*) (Kerr i sur., 1998; Kim i sur., 2008).

M1 makrofagi povećavaju regulaciju enzima iNOS koji katalizira pretvorbu L-arginina u NO i citrulin, dok M2 makrofagi povećavaju ekspresiju enzima Arg-1, a ta dva enzima su u kompeticiji za L-arginin (Rodríguez i Ochoa, 2008; Tugal i sur, 2013). Arginaza je krajnji enzim u ciklusu ureje koji pretvara L-arginin u ureu i L-ornitin te ima važnu ulogu u uklanjanju amonijevih iona iz tijela. Aktivno mjesto arginaze sadrži mangan, te se pojavljuje u dvije izoforme (Arg-1 i Arg-2) (Berg i sur., 2007). Promijenjeni metabolički putevi u tumorima, uključuju i promjene u koncentraciji L-arg. Primjerice, koncentracija L-arg u srži solidnih tumora može biti 5 puta niža nego u periferiji tumora (Pan i sur., 2016). Arginazu povećano ekspimiraju tumorske

stanice, ali i stromalne stanice tumora (Gannon i sur., 2010; Mussai i sur., 2013, 2015). Prekomjerna ekspresija Arg-1 je loš prognostički čimbenik u različitim tipovima raka, uključujući neuroblastom, akutnu mijeloidnu leukemiju (AML), karcinom gušterače, karcinom jajnika i kolorektalni karcinom (Ino i sur., 2013; Mussai i sur., 2013, 2015; Czystowska-Kuzmicz i sur., 2019; Ma i sur., 2019).



Slika 3. Induktori i odabrana funkcionalna svojstva različitih populacija polariziranih makrofaga. Makrofagi polariziraju i poprimaju različita funkcionalna obilježja kao odgovor na signale iz okoliša. Izlaganje signalima IFN- γ i LPS pokreću M1 polarizaciju s potencijalnim citotoksičnim i antitumorskim svojstvima. M2a (inducirani citokinima IL-4 i IL-13), Mb2 (inducirani kombiniranim izlaganjem imunokompleksima i TLR ili agonistima IL-1R), M2c (inducirani citokinom IL-10) općenito imaju protumorska svojstva. DTH - hipersenzitivnost odgođenog tipa (engl. *delayed-type hypersensitivity*); IC- imunokompleksi; IFN- γ - interferon- γ ; iNOS- inducibilna dušik sintaza; LPS- lipopolisaharid; MR – receptor za manožu; PTX3 – dugi pentraksin PTX3, RNI – reaktivne vrste dušika (engl. *reactive nitrogen intermediates*; ROI – reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen intermediate*); SLAM- signalna molekula aktivacije limfocita (engl. *signaling lymphocytic activation molecule*; SR – receptori čistači (engl. *scavenger receptors*); TLR -Toll-like receptor (preuzeto i prilagođeno prema Mantovani i sur., 2004).

1.2. Kemoterapija

Lijekovi koji se koriste u kemoterapiji dijele se na citostatike i citotoksike. Djeluju neselektivno, odnosno ciljaju sve stanice koje imaju ubranu stopu proliferacije neovisno radi li se o zdravom ili tumorskom tkivu. U kemoterapiju se ubrajaju alkilirajući spojevi i lijekovi bazirani na platini, antimetaboliti i organski spojevi (biljni alkaloidi).

Alkilirajući spojevi mogu stvarati adukte DNA kovalentno se vežući preko alkilne grupe. Mogu djelovati tijekom svih faza staničnog ciklusa. Takvi su primjerice klorambucil i ciklofosamid. Lijekovi bazirani na platini, kao što su cisplatin i karboplatin, stvaraju kovalentne veze preko atoma platine.

Antimetaboliti su spojevi strukturno slični endogenim molekulama, npr. dušičnim bazama u DNA, stoga mogu imitirati njihovu ulogu i inhibirati sintezu nukleinskih kiselina. Florodeoksiuridilat (F-dUMP) i metotreksat djeluju kao antimetaboliti.

Biljni alkaloidi vinkristin i vinblastin se vežu za tubulin i sprječavaju formiranje mikrotubula, dok paklitaksel (taksol) se veže za β -tubulinsku podjedinicu polimera i stabilizira mikrotubule tako da se ne mogu depolimerizirati. Na taj način se koriste dvije suprotne strategije kako bi se destabiliziralo mitotsko vreteno i izazvala mitotska katastrofa (Pecorino, 2012).

1.2.1. Cisplatina

Michele Peyrone je 1845. godine otkrio cisplatinu, a 1985. godine biofizičar Barnett Rosenberg njeno inhibirajuće djelovanje na staničnu diobu (Trimmer i Essigmann, 1999). Cisplatina pripada skupini lijekova baziranih na platini koji se koriste kao konvencionalna kemoterapija.

Cisplatina je molekula topljiva u vodi. Sadrži atom platine (Pt) vezan s 4 funkcionalne grupe. Veza Pt-N je kovalentna veza i ireverzibilna je, a veza Pt-Cl je nešto slabija. Kloridni ion (Cl^-) se zamijeni s vodom u plazmi i citosolu prije nego što se molekula veže na N7 gvanina i adenina na ciljnoj DNA (Pecorino, 2012). Ovaj proces zamjene kloridnih iona molekulama vode, čime se molekula cisplatine zapravo aktivira, događa se zbog niske koncentracije kloridnih iona u citosolu i zato što su kloridni ioni jaki elektrofilni (Dasari i Tchounwou, 2014). Može nastati molekula cisplatine koja ima zamijenjen jedan ili oba kloridna iona molekulama vode. Istraživanja

in vitro su pokazala da je produkt s jednom molekulom vode reaktivniji od produkta s dvije molekule vode što se tiče DNA vezanja (Davies i sur., 2000). Stvaraju se adukti GG, AG i GXG (gdje X predstavlja bilo koju bazu) i takvo oštećenje DNA potiče apoptozu (Pecorino, 2012). Mehanizam djelovanja cisplatine je i induciranje oksidacijskog stresa stvarajući reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *reactive oxygen species*) kao što su hidroksil radikali i superoksid, što ovisi o koncentraciji cisplatine i vremenu izlaganja (Brozovic i sur., 2010). ROS uzrokuje lipidnu peroksidaciju, depleciju sulfhidrilnih grupa, mijenja različite signalne puteve što dovodi do oštećenja DNA i posljedično apoptoze stanice (Florea i Büsselberg, 2011). ROS djeluje i na mitohondrijsku funkciju. Zajedno s Bax i Ca^{2+} , ROS uzrokuje oštećenje mitohondrijske DNA (mtDNA) te dolazi do puknuća mitohondrija. Puknućem mitohondrija oslobađaju se citokrom c i prokaspaza 9 koji se onda u citosolu vežu s Apaf-1 i ATP-om u apoptosmom, kompleks koji aktivira kaspazu 9 i započinje kaspazna kaskadna reakcija, a rezultat je smrt stanica (Fuentes i sur., 2003). Cisplatina može uzrokovati i vanjski put apoptoze aktiviranjem receptora Fas (Fuentes i sur., 2002). Glavna meta cisplatine je genomska DNA (gDNA) iako se samo 1% količine cisplatine veže na nju (Lin i sur., 2002).

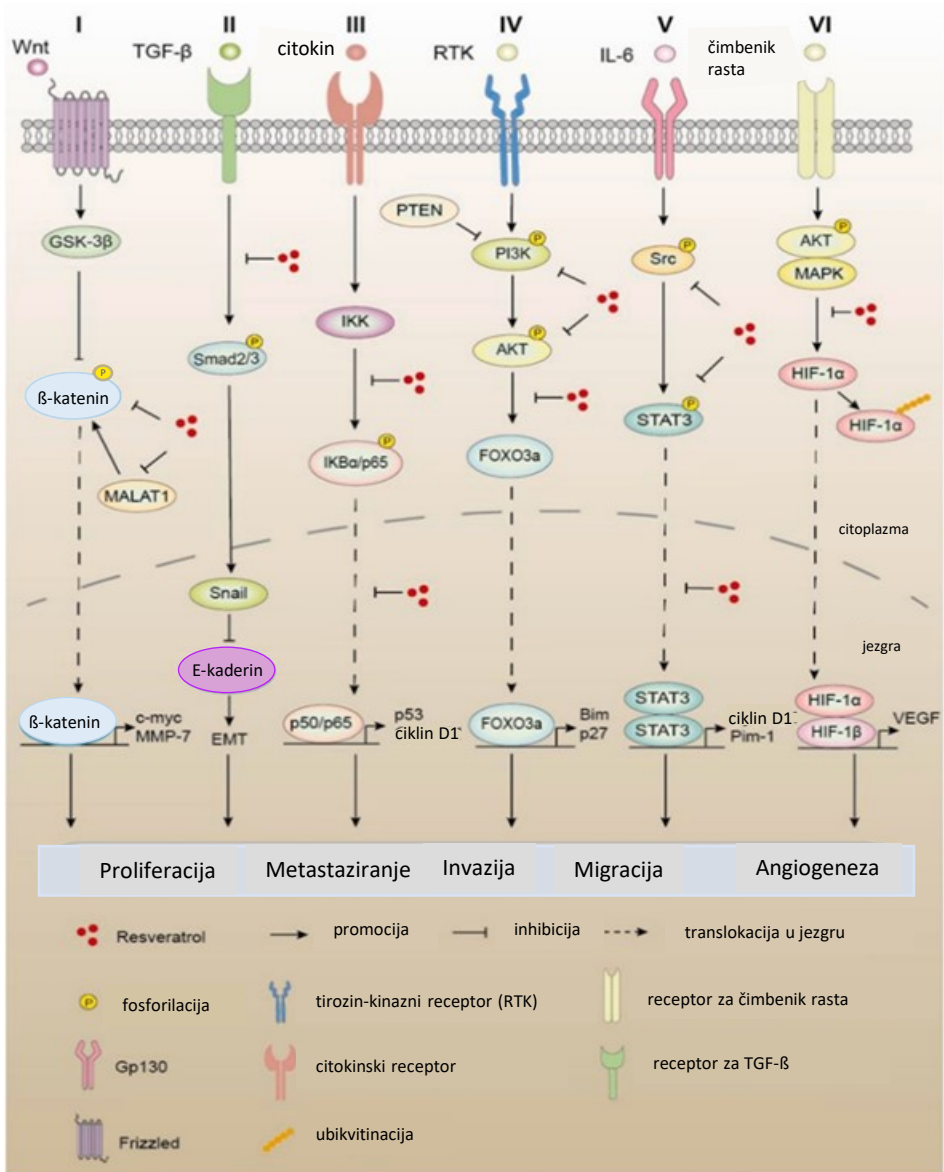
Cisplatina se već dugo vremena koristi kao kemoterapeutik uglavnom u liječenju solidnih tumora (Xu i Gewirtz, 2022). Međutim, primjena cisplatine je ograničena zbog nuspojava kao što je primjerice nefrotoksičnost (Arany i Safirstein, 2003; Kong i sur., 2018, 2019). Najveća mana cisplatine je stvaranje otpornosti kod nekih tipova malignih tumora (Fuentes i sur., 2003). Djelovanjem cisplatine stvara se oksidacijski stres, pa se u kombinaciji koriste i antioksidansi kako bi se smanjio štetan učinak (Conklin, 2004; Longchar i Prasad, 2015).

1.3. Resveratrol

Biljke proizvode resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben), prirodni fitoaleksin, koji im služi za zaštitu od okolišnog stresa i invazije patogena. Resveratrol se može izolirati iz više od 70 biljaka (Aggarwal i sur., 2004). Pripada skupini stilbena, ne-flavoidnih polifenola. Prisutan je u kikirikiju, pistacijama, borovnicama, bijeloj murvi, grožđu, a posebno je ovojnica bobice grožđa bogata resveratrolom (Burns i sur., 2002; Li i sur., 2021). Također, resveratrol se može pronaći i u svježem soku od brusnice, kakau, tamnoj čokoladi i drugim namirnicama (Hurst i sur., 2008). Čaša crvenog vina (u dozi 0,15-0,2 L za žene i 0,3-0,4 L za muškarce) konzumirana uz obrok dnevno ima zaštitni učinak na ljudsko zdravlje (Nelson i Kolls, 2002). Resveratrol aktivira enzim sirtuin SIRT-1 koji promovira preživljenje u uvjetima stresa (Penumathsa i Maulik, 2009; Huber i Superti-Furga, 2011). Međureakcijom s ciklooksigenazama COX-1 i COX-2, resveratrol suprimira proupalne čimbenike (Yar i sur., 2010; Kutil i sur., 2014). Brojna istraživanja su pokazala protutumorski učinak resveratrola djelovanjem u raznim signalnim putevima (Cao i sur., 2004; Kotha i sur., 2006; Su i sur., 2007; Ji i sur., 2013, 2015; Buhrmann i sur., 2019; Ashrafizadeh i sur., 2020), što je sažeto prikazano na Slici 4.

Resveratrol se pojavljuje u obliku dva različita izomera, *cis*-izoformi i *trans*-izoformi. *Cis*-izoforma resveratrola je nestabilna, stoga nije komercijalno dostupna. *Trans*-izoforma resveratrola (*trans*-resveratrol) je stabilnija, ali se pretvara u *cis*-izoformu kada je izložena visokom pH ili UV svjetlu (Vian i sur., 2005). *Trans*-resveratrol ima antitumorska svojstva i brojne pogodnosti za zdravlje, stoga su brojna istraživanja usmjerena na terapijsko djelovanje *trans*-resveratrola (Ren i sur., 2021).

Zbog svojih antioksidacijskih, protutumorskih, protuupalnih i kardioprotektivih svojstava, resveratrol ima veliki potencijal kao komplementarno djelotvorno svojstvo konvencionalnoj kemoterapiji (Trimmer i Essigmann, 1999; Harikumar i sur., 2010). Antioksidacijski učinci resveratrola temelje se na uklanjanju slobodnih radikala te regulaciji funkcije mitohondrija (Huo i sur., 2022). Primjena resveratrola u nižim koncentracijama utječe na zaustavljanje ranih faza razvoja tumora. Resveratrol može imati prooksidacijsko djelovanje ako se primjenjuje u višim koncentracijama te može potaknuti apoptozu malignih stanica (Shaito i sur., 2020).



Slika 4. Shematski prikaz različitih signalnih puteva ciljanih resveratrolom kao strategija u liječenju tumora. Resveratrol: (I) smanjuje ekspresiju β-katenina i blokira nuklearnu translokaciju β-katenina tako što inhibira lncRNA MALAT1; (II) suprimira epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT) induciranu putem TGF-β/Smad ; (III) smanjuje DNA-vezujuću aktivnost čimbenika κB (NF-κB) te inhibira proliferaciju tumorskih stanica; (IV) inhibira posredovanu p-PI3K/p-AKT nuklearnu akumulaciju transkripcijskog čimbenika FOXO3a; (V) suprimira fosforilaciju Src-STAT3 i inducira apoptozu tumorskih stanica; (VI) inhibira aktivaciju HIF-1α induciranu putem AKT/MAPK i ubrzava razgradnju HIF-1α (preuzeto i prilagođeno prema Ren i sur., 2021).

1.4. Hipertermija

Hipertermija se može koristiti u terapiji tumora zbog citotoksičnih učinaka povišenih temperatura na tumorske stanice (Youssef i Amin, 2022). Hipertermija se pokazala uspješnom u poboljšanju učinkovitosti kemoterapija i radioterapija koje se koriste u liječenju solidnih tumora. Poboljšava akumulaciju, raspodjelu i učinkovitost kemoterapeutika (Dunne i sur., 2020).

Istraživanja su pokazala da temperature između 41 °C i 44 °C povećavaju toksični učinak na tumorske stanice. Stanične promjene izazvane hipertermijom uključuju:

- povećanje stanične permeabilnosti što povećava unos Ca^{2+} , iona koji stimuliraju proteine uključene u signalnu kaskadu apoptoze, te povećavanje prijenosa lijeka u stanicu;
- razaranje citoskeleta; povećanje pora tumorskih stanica što olakšava dostavu lijeka;
- promjene mitotskog vretena, promjene u organizaciji centrosoma, denaturaciju proteina što dovodi do stvaranja višejezgrenih neklonogenih stanica;
- stvaranje dvolančanih lomova DNA zbog denaturacije i disfunkcije proteina potrebnih za popravak oštećenja DNA;
- poticanje apoptoze stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i povećanom ekspresijom pro-apoptotskog gena *BAX* (Youssef i Amin, 2022).

Osim što izravno ubija tumorske stanice, hipertermija aktivira i antitumorsku imunost kao neizravni učinak. Hipertermija povećava klastogeni učinak cisplatine (Oršolić i Car, 2014).

1.5. Proteini toplinskog stresa

Proteini toplinskog stresa (HSP, engl. *heat shock proteins*) su molekularni šaperoni koji održavaju homeostazu pravilnim smatanjem i aktivacijom proteina u stanici. Ekspresija HSP se povećava izlaganjem stanica fiziološkim i okolišnim stimulatorima, kao što su hipertermija, anoksija, UV svjetlo, toksini, kemijski agensi ili neka druga sredstva koja narušavaju homeostazu (Jäättelä, 1999; Hartl i sur., 2011; Kim i sur., 2013). Superporodica HSP podijeljena je u nekoliko porodica koje su dobile ime prema njihovim približnim molekulskim masama: mali proteini HSP, HSP-60, HSP-70, HSP-90 i HSP-110 (Pockley 2003). HSP imaju ulogu u regulaciji apoptoze, autofagiji, matičnosti tumorskih stanica, EMT-u, metabolizmu lipida, angiogenezi, tumorskoj imunosti, podržavaju tumorski rast i razvoj (Mosser i sur., 1997; Ciocca i Calderwood, 2005; Cook i sur., 2016; Ono i sur., 2020; Albakova i sur., 2020). Izvanstanični HSP mogu djelovati kao okidači imunskog odgovora, što je uvjetovalo razvoju imunoterapija baziranih na HSP (Stangl i sur., 2011; Albakova i sur., 2021). Tablica 2 sažeto prikazuje poveznicu imunomodulatornih puteva i patoloških stanja u koja su uključeni HSP-70 i HSP-90 (Gross i sur., 2003; Borges i sur., 2012; Mbofung i sur., 2017).

Tablica 2. Imunomodulatorna uloga HSP-70 i HSP-90 u kroničnim upalnim stanicama i tumorima

HSP	Patološka stanja	Imunomodulatorna funkcija
HSP-70	Kronične upalne bolesti	Potiče stvaranje protupalnih citokina. Reagira s dendritičkim stanicama i monocitima, vezujući se za endocitne receptore što rezultira otpuštanjem protuupalnih citokina IL-10 i imunosupresijom.
HSP-70	Tumori	Vezanje HSP-70 sa receptorom CD94 na stanicama NK rezultira citolitičkim razaranjem stanica tumora.
HSP-90	Tumori	Povezan s protutumorskim odgovorom posredovanim T-limfocitima.

Otpušten izvan stanica, HSP-70 se može nalaziti u slobodnom i topljivom obliku, u kompleksu s antigenskim peptidima tumora te u obliku eksosoma (Vostakolaei i sur., 2021). HSP-70, čija je koncentracija u malignim stanicama jako visoka, suprimira apoptozu, dopuštajući progresiju tumora (Mosser i sur., 1997). Prekomjerna koncentracija HSP-70 povezana je i s

otpornošću na kemoterapiju (Garrido i sur., 2003; Jego i sur., 2013). Smanjenje koncentracije HSP-70 je povezano sa staničnom smrću tumorskih stanica (Davies i sur., 2000). Smanjena ekspresija HSP-70 u stanicama može poboljšati učinkovitost terapija u liječenju tumora (Saenz-Santamaría i sur., 1995; van Iersel i sur., 1996).

Prekomjerna ekspresija HSP-90 je povezana s brojnim bolestima, različitim tipovima tumora, virusnim infekcijama, upalom i neurodegenerativnim bolestima (Whitesell i Lindquist, 2005; Luo i sur., 2010; Geller i sur., 2012). Ekspresija HSP-90 je povezana s aktivacijom HIF-1 α i NF- κ B te time s EMT-om, invazijom i migracijom tumorskih stanica (Nagaraju i sur., 2015). Razine HSP-90 imaju potencijal kao biomarkeri loše prognoze u raku pluća, karcinomu jednjaka, raku mjehura, melanomu i leukemijama (McCarthy i sur., 2008; Žáčková i sur., 2013; Huang i sur., 2014). Blokiranje ili neutraliziranje proteina HSP-90 inhibira pokretljivost tumorskih stanica *in vitro* i metastaziranje tumora *in vivo* (Tsutsumi i sur., 2008).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada jest istražiti združeno djelovanje cisplatine i otopine resveratrola u hipertermalnim uvjetima na inhibiciju brzo rastućeg Ehrlichovog solidnog tumora (EAT) praćenjem razine VEGF-a, MMP-2 i MMP-9 te polarizacije makrofaga. Nadalje, cilj je utvrditi može li višemodalni pristup s hipertermijom i resveratrolom dokinuti otpornost tumorskih stanica na cisplatinu kroz modulaciju aktivnosti HDAC-a i razine HSP-70 i HSP-90 te tako doprinijeti direktnoj toksičnosti na stanice tumora, inhibiciji angiogeneze i rasta tumora, te posljedičnom povećanju životnog vijeka miševa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Pokusne životinje

Za istraživanje su korišteni Swiss albino miševi. Korišteni miševi su bili stari 2-3 mjeseca, teški 20-25 g te su uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno na ukupno 80 miševa podijeljenih u 4 pokusne skupine po 20 miševa s obzirom na obradu (1. kontrolna skupina: fiziološka otopina + hipertermija; 2. skupina: cisplatina + hipertermija; 3. skupina: resveratrol + hipertermija i 4. skupina: cisplatina + resveratrol + hipertermija). Miševi su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje (4RF 21 Mucedola S.R.L., Settimo Milanese, Italija) uz stalnu dostupnost vode. Uzgajani su u standardnim uvjetima: dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati mraka, temperatura 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka.

Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima Republike Hrvatske prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Narodne Novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja te Narodne novine br. 102/17) te sukladno Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) # 86-23, 1985).

3.1.2. Tumorske stanice

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) se pojavljuje kod miševa kao spontani karcinom mliječne žlijezde. EAT je brzorastući, agresivni, maligni tumor slabe diferenciranosti.

U svrhu izazivanja solidnog tumora EAT za ovo istraživanje, miševima je injicirano 1×10^6 stanica EAT subkutano (*sc*) u bedro.

3.1.3. Laboratorijska oprema

- spektrofotometar: Libra S22, Biochrom,UK

- homogenizator: Bandelin Sonoplus, Bochem Laborbedarf, Njemačka
- centrifuge: TermoFisher Scientific; MIKRO 200R, Hettich, Njemačka
- analitička vaga: Kern i Sohn GmbH ABS 220-4, Njemačka
- mikrotitarski čitač: Infinite M Plex, TECAN, Švicarska
- vorteks: Vortex Genius 3, IKA, SAD

3.1.4. Resveratrol

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

3.1.5. Cisplatina

Cisplatina (Pliva, Zagreb, Hrvatska) je mješavina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg desetog i dvanaestog dana te u dozi od 5 mg/kg petnaestog dana.

3.1.6. Hipertemija

Sve 4 pokusne skupine miševa su izlagane sustavnoj hipertermiji koja je provedena prema protokolu uz promjene u vremenu i temperaturi izlaganja (Duhan i sur., 2012).

Neposredno nakon davanja cisplatine ili resveratrola, 0,5 mL fiziološke otopine koja je prethodno zagrijana u vodenoj kupelji na 41 °C, injicirana je intraperitonealno (*ip*) mješavina kako bi se izazvala intraperitonealna hipertermija. Nakon primjene intraperitonealne hipertermije, životinje su izložene sustavnoj hipertermiji u inkubatoru pri 41 °C tijekom 15 minuta.

3.2. Metode

3.2.1. Obrada životinja

Nakon mjerenja tjelesne težine, miševi su podijeljeni u 4 pokusne skupine po 20 jedinki te je u njih subkutano (*sc*) u bedro injicirano 1×10^6 EAT stanica što označava 0. dan pokusa. Od drugog (2.) dana pokusa miševima je dan resveratrol u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu. Miševima je injicirana cisplatina u dozi od 2,5 mg/kg (*ip*) 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 15. dana. Neposredno nakon davanja cisplatine i/ili resveratrola, miševi su izloženi sustavnoj hipertermiji. Kontrolna skupina obrađena je *ip* s fiziološkom otopinom i izložena sustavnoj hipertermiji. Doza 50 mg/kg odabrana je sukladno literaturi (Carter i sur., 2014; Alobaedi i sur., 2017; Davatgaran-Taghipour i sur., 2017; Kim i sur., 2017).

Miševi su žrtvovani 16. dan pokusa (24 h nakon zadnje obrade). Iz svake skupine je žrtvovano po 10 životinja. Životinje su anestetizirane i analgezirane *ip* primjenom Narketana® (Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska) i Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska) u dozi od 25 mg/kg nakon čega su prikupljena tumorska tkiva za daljnje analize. Skladištena su na -80 °C, a nakon vaganja u epice ili obrade tkiva su čuvana na -20 °C.

Drugi dio životinja (10 po skupini) ostavljen je za praćenje veličine tumora i preživljavanja.

3.2.2. Praćenje promjene mase životinja

Prije početka izvođenja pokusa, obavljena su mjerenja tjelesne mase za svaku životinju pojedinačno pomoću digitalne vage. Zatim su životinje, sukladno sličnim masama (± 3 g), podijeljene u skupine. Na temelju mase životinja za pojedinu skupinu određena je količina pojedinačnih pripravka koje su davane tijekom obrade životinja. Promjene mase životinja su praćene tijekom izvođenja pokusa.

3.2.3. Praćenje promjene volumena tumora i inhibicije rasta tumora

Pomoću kalipera mjerene su dužine i širine tumora, potrebne za izračun volumena tumora:

$$\text{Volumen tumora (mm}^3\text{)} = \frac{\text{širina tumora}^2 \times \text{dužina tumora}}{2}$$

Nadalje, iz dobivenih podataka računa se postotak inhibicije tumora (%TVI) prema formuli:

$$\%TVI = \frac{\text{sred. vrij. vol. tumora}_{(kontr.)} - \text{sred. vrij. vol. tumora}_{(tret.grupa)} \times 100}{\text{sred. vrij. vol. tumora}_{(kontr.)}}$$

3.2.4. Preživljavanje

Za praćenje preživljavanja pokusnih miševa pratili su se spontani slučajevi smrti nakon obrade miševa. Dan uginuća i broj uginulih miševa unutar svake tretirane skupine su se bilježili od 0. dana pokusa.

3.2.5. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima tumorskog tkiva metodom po Lowryju

Metoda po Lowryju se temelji na stvaranju kompleksa dvovalentnog iona bakra Cu^{2+} s peptidnim vezama u lužnatim uvjetima. Pritom se reducira u monovalentni ion bakra Cu^{+} . Cu^{+} i ostaci tirozina, triptofana i cisteina iz proteina reagiraju s Folinovim reagensom, pri čemu nastaje nestabilni produkt koji se zatim reducira do molibden/volfram plavog (Lowry i sur., 1951).

Za metodu po Lowryju pripremila sam 30 uzoraka. Izvagala sam 50 mg tumorskog tkiva za svaku epruvetu. U svaku epruvetu sam dodala 500 μL 0,1 M PBS-a, homogenizirala te centrifugirala 15 minuta na 15000 rpm. Supernatant sam prebacila u nove epruvete.

Homogenate tumorskog tkiva sam razrijedila 10x. U staklene epruvete sam stavila 100 μL uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 3) te ih inkubirala 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodala sam 200 μL otopine D (Tablica 3), vorteksirala i inkubirala u mraku 30 min na sobnoj temperaturi. Absorbanciju uzoraka sam izmjerila spektrofotometrom na $\lambda = 600 \text{ nm}$. Kao standard koristila sam albumin goveđeg seruma BSA (engl. *bovine serum albumin*) koji sam prethodno pripremila u poznatim koncentracijama (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156 mg/mL).

Pomoću baždarnog pravca izračunate su koncentracije proteina. Koncentracija proteina je izražena kao mg proteina/mL uzorka.

Tablica 3. Priprema otopina za određivanje koncentracije proteina metodom prema Lowryju

Otopina	Priprema otopine
Otopina A	9,6 g Na ₂ CO ₃ + 480 mL 0,1 M NaCl
Otopina B	0,1 g natrij-kalij tartarat + 10 mL dH ₂ O
Otopina C	0,05 g CuSO ₄ × 5H ₂ O + 10 mL dH ₂ O
Otopina D	pomiješati otopine u omjeru A:B:C=48:1:1
Otopina E	pomiješati Folin & Ciocalteu's phenol reagens i dH ₂ O u omjeru 2:1 (npr. 14 mL Folin & Ciocalteu's phenol reagens + 7 mL dH ₂ O)

3.2.6. Određivanje koncentracije VEGF-a

Za određivanje koncentracije čimbenika VEGF koristio se mišji komplet *VEGF Quantikine*[®] *ELISA kit* (R&D Systems, Inc., SAD).

Sve otopine, standardi, kontrole i uzorci su pripremljeni prema uputama u kompletu. U svaku jažicu dodala sam 50 µL otopine RD1N. Zatim sam u odgovarajuće jažice nanijela standard, kontrolu ili odgovarajući uzorak, u volumenu od 50 µL. Inkubacija je trajala 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, dodala sam 100 µL mišjeg konjugata VEGF u jažice i ponovno inubirala 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, dodala sam 100 µL otopine supstrata i inkubirala 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Zatim sam dodala 100 µL otopine za zaustavljanje reakcije. Apsorbancije sam očitala pomoću čitača mikrotitarskih pločica na $\lambda=450$ nm te sam pomoću standardne krivulje izračunala koncentracije VEGF-a.

3.2.7. Određivanje koncentracije matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2)

Za određivanje koncentracije MMP-2 korišten je mišji komplet MMP2 ELISA kit proizvođača Biospes (BEK1157, Chongqing Biospes Co., Kina). Komplet je baziran na metodi ELISA *sendvič*-test. Poliklonsko antitijelo anti-MMP2 je vezano na dno jažica, a za detekciju MMP-2 korišteno je poliklonsko obilježeno s biotinom anti-MMP2 antitijelo. Standardi, uzorci i biotin-obilježeno antitijelo su u jažice dodavani pravovremeno prema uputama i ispirani puferom za ispiranje. Dodan je Avidin-Biotin-Peroksidaza kompleks, a nevezani konjugati su isprani. Za vizualizaciju enzimske reakcije hrenove peroksidaze (HRP) korišteni su supstrati TMB. HRP

katalizira supstrat TMB pri čemu se stvara plava boja koja prelazi u žutu kada se doda kisela otopina za zaustavljanje reakcije (*stop solution*). Jačina žute boje je razmjerna količini MMP-2 u uzorku. Apsorbancije su očitane na valnoj duljini od 450 nm u čitaču mikrotitarskih pločica i izračunate su koncentracije MMP-2.

3.2.8. Određivanje koncentracije matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9)

Za određivanje koncentracije MMP-9 korišten je mišji komplet MMP9 ELISA kit proizvođača Biospes (BEK1163, Chongqing Biospes Co., Kina). Princip je isti kao što je opisano u 3.2.7., samo su korištena poliklonska anti-MMP9 antitijela vezana za dno jažice i poliklonsko obilježeno s biotinom anti-MMP9 antitijelo. Apsorbancije su očitane na valnoj duljini od 450 nm pomoću čitača za mikrotitarske pločice i izračunate su koncentracije MMP-9.

3.2.9. Mjerenje dušikovog oksida metodom prema Griessu

Dušikov oksid (NO) je bitan fiziološki prijenosnik i izvršna molekula u brojnim biološkim sustavima, uključujući tkiva imunološkog, živčanog i kardiovaskularnog sustava (Dawson i Dawson, 1995). Kako bi se ispitalo stvaranje NO, mjeri se razina nitrita (NO_2^-), a analiza se temelji na reakciji diazotacije koju je prvi opisao Griess 1879. godine.

Korišten je komplet *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD) koji se temelji na kemijskoj reakciji koja koristi sulfanimid i N-1-naftiletilediamin dihidroklorid (NED) u kiselim uvjetima (fosforna kiselina). Ovaj sustav otkriva ione nitrita u različitim biološkim i eksperimentalnim tekućinama (plazma, serum, urin, medij za kulturu tkiva) pri čemu osjetljivost nitrita ovisi o vrsti tekućine. Granica detekcije je 2,5 μL nitrita (u jako čistoj, deioniziranoj, destiliranoj vodi). Otopine sulfanilamida i NED-a se međusobno natječu za ione nitrita u Griessovoj reakciji, stoga se bolja osjetljivost postiže kada se dva reaktanta dodaju odvojeno (Fiddler 1977). Za bolju kvantifikaciju iona nitrita potrebno je pripremiti referentne krivulje standardne otopine nitrita, koristeći pri tom isti pufer ili otopinu u kojoj su ispitivani uzorci.

Dodala sam 50 μL uzorka u odgovarajuće jažice mikrotitarske pločice. Zatim sam dodala 50 μL otopine sulfanilamida i pločicu inkubirala 10 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, dodala sam 50 μL otopine NED i ponovila inkubaciju 10 min u mraku na sobnoj

temperaturi. U ovom koraku pojavljuje se ružičasto obojenje uzoraka u jažicama. Očitane su vrijednosti apsorbancija na mikročitaču s filterom $\lambda = 540$ nm. Kao standard korišten je 0,1 M natrijev nitrit otopljen u puferu u koncentracijama 100; 50; 25; 12,5, 6,25, 3,13; 1,56 μM). Pomoću referentne krivulje, odredila sam koncentracije nitrita u uzorcima.

3.2.10. Mjerenje aktivnosti arginaze

Za mjerenje razine aktivnosti arginaze (Arg-1) korišten je komplet proizvođača Sigma-Aldrich (*Arginase Activity Assay Kit*, MAK112, Sigma-Aldrich Co. LLC, SAD). Ovaj komplet se temelji na katalitičkoj sposobnosti arginaze u konverziji arginina do ureje i ornitina. Ureja specifično reagira s reagensom za razvoj boje pri čemu nastaje obojenje razmjerno aktivnosti arginaze. Jedna jedinica arginaze predstavlja količinu enzima dovoljnu za konverziju 1,0 μmola L-arginina do ornitina i ureje u minuti pri pH = 9,5 i 37 °C.

Uzorke, standard ureje, 5x supstratni pufer i ureja reagens sam pripremila prema uputama iz kompleta. U odgovarajuće jažice dodala sam 10 μL 5x supstratnog pufera. Zatim sam sve inkubirala 2 sata pri 37 °C. U svaku jažicu dodala sam 200 μL pripremljenog reagensa ureje (jažice sa standardom ureje, vodom, uzorkom i jažicu za slijepu probu). Za zaustavljanje reakcije prvo sam dodala 200 μL reagensa ureje u svaku jažicu, a potom još 10 μL 5x supstratnog pufera u jažice za slijepu probu. Inkubacija mikrotitarske pločice trajala je 60 min na sobnoj temperaturi. Apsorbancije sam izmjerila na valnoj duljini od 430 nm te sam aktivnost arginaze izračunala prema formuli:

$$Activity = \frac{A_{(430)uzorka} - A_{(430)blank}}{A_{(430)standarda} - A_{(430)vode}} \times \frac{(1 \text{ mM} \times 50 \times 10^3)}{(V \times T)}$$

gdje T označava reakcijsko vrijeme u minutama, V volumen uzorka u jažici (μL), 1 mM koncentraciju standarda uree, 50 reakcijski volumen (μL), 10^3 faktor pretvorbe mM do μM .

3.2.11. Određivanje koncentracije proteina toplinskog stresa HSP-70 i HSP-90

Za određivanje koncentracije proteina toplinskog stresa HSP-70 i HSP-90 korišteni su mišji komplet HSP-70 ELISA kit i mišji komplet HSP-90 ELISA kit proizvođača MyBioSource prema napatku proizvođača.

U ELISA *sendvič*-testu je poznata količina monoklonskog antitijela, koje je specifično za HSP-70/HSP-90, nanešena u jažice mikrotitarske pločice. Standardi i uzorci se dodaju u odgovarajuće jažice i inkubiraju određeno vrijeme kako bi se antigen (HSP), ako je prisutan, vezao za antitijelo. Nevezani antigeni se uklone ispiranjem, a u jažice se zatim doda sekundarno antitijelo za koje je vezan enzim ili radioizotop. Vezanje tog obilježenog antitijela, koje prepoznaje nepreklapajuću determinantu na antigenu, povećava se kako se povećava koncentracija antigena, što omogućuje njegovu kvantifikaciju (Abbas i sur., 2015).

3.2.11.1. Određivanje koncentracije HSP-70

Za određivanje koncentracije proteina toplinskog stresa HSP-70 korišten je mišji komplet HSP-70 ELISA (MyBioSource, SAD).

U odgovarajuće jažice sam dodala po 50 μ L standarda ili uzorka (homogenati tumora), a za negativnu kontrolu 50 μ L PBS-a. U jažice s uzorcima dodala sam i 5 μ L „balans“ otopine uz miješanje. Zatim sam dodala po 100 μ L konjugata u svaku jažicu (osim negativne kontrole). Mikrotitarsku pločicu sam poklopila i inkubirala 1 h na 37 °C. Uslijedilo je ispiranje, a nakon toga sam u jažice dodala po 50 μ L supstrata A i po 50 μ L supstrata B te inkubirala 20 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije dodala sam po 50 μ L stop otopine za zaustavljanje reakcije. Izmjerila sam apsorbancije ($\lambda=450$ nm) pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Pomoću standardne krivulje izračunala sam koncentracije HSP-70.

3.2.11.2. Određivanje koncentracije HSP-90

Za određivanje koncentracije HSP-90 korišten je mišji komplet HSP-90 ELISA (MyBioSource, SAD). Pripremila sam standarde i uzorke prema uputama u kompletu i dodala ih u odgovarajuće jažice po 100 μ L. Mikrotitarsku pločicu sam inkubirala 90 min na 37 °C. Zatim sam jažice ispirale 2 puta puferom za ispiranje. Dodala sam 100 μ L biotin-obilježenog antitijela i inkubirala 60 min na 37 °C. Zatim, nakon što sam jažice isprala 3 puta, dodala sam 100 μ L otopine SABC (sadrži HRP-streptavidin) te sam pločicu inkubirala 30 min na 37 °C. Jažice sam potom ispirala 5 puta, te dodala 90 μ L supstrata TMB i ostavila na inkubaciju u mraku na 37 °C 15-ak

minuta. Po završetku inkubacije, dodala sam 50 μL stop otopine za zaustavljanje reakcije. Izmjerila sam apsorbancije na $\lambda=450$ nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica.

3.2.12. Nuklearna ekstrakcija

Za nuklearnu ekstrakciju koristila sam komplet *Nuclear Extraction Kit* (ab113474, Abcam, SAD). Prvo sam pripremila 1X pre-ekstrakcijski pufer tako što sam razrijedila 10X ekstrakcijski pufer u omjeru 1:10 (za 40 mL 1X pre-ekstrakcijskog pufera se 4 mL 10X ekstrakcijskogpufera razrijedi s 36 mL dH_2O). Zatim sam dodala 40 μL DTT-a. Otopine DTT i PIC sam dodala u ekstrakcijski pufer u omjeru 1:1000 (po 10 μL)

U epruvete s uzorcima tumorskog tkiva sam dodala po 500 μL pre-ekstrakcijskog pufera te ih homogenizirala. Homogenate tumora sam inkubirala 15 minuta na ledu, a zatim centrifugirala 10 min pri 12 000 rpm na 4 °C. Nakon toga sam uklonila supernatant iz epruveta.

U epruvete sam dodala po 250 μL pripremljenog ekstrakcijskog pufera s DTT-om i PIC-om, inkubirala na ledu 15 min uz vorteksiranje (5 sekundi) svake 3 minute. Ekstrakt tkiva sam dodatno sonicirala 3 puta po 10 sekundi. Zatim sam uzorke centrifugirala 10 min pri 14 000 rpm na 4 °C i prebacila supernatant u nove obilježene epruvete. Uzorke sam razrijedila 100x. Uslijedilo je mjerenje koncentracije proteina nuklearnog ekstrakta.

3.2.13. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradford-u temelji se na izravnom vezanju boje Coomassie brilliant blue (CBB) G-250 na proteine na bočnim skupinama arginina, triptofana, tirozina, histidina i fenilalanina. Vezanjem anionske boje dolazi do brzog pomaka maksimuma apsorbancije boje, od 465 nm do 595 nm. Hidrofobne međureakcije i elektrostatske sile nastaju između sulfonatnih skupina boje i proteina, što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu (Garret i Grisham, 2013).

Za pripremu Bradfordovog reagensa otopila sam 100 mg CBB G-250 u 50 mL etanola (95%). Kada se boja potpuno otopila dodala sam 100 mL fosforne kiseline te dH_2O do 1 L.

U jažice sam dodala po 20 μL uzorka i 40 μL Bradfordova reagensa. Kao standard koristila sam otopinu BSA ($\gamma = 1 \text{ mg/mL}$) pomoću koje je pripremljena serija otopina koje sadrže različite količine proteina (od 2 mg/mL do 1,953 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Nakon inkubacije u trajanju od 20 min na sobnoj temperaturi izmjerila sam apsorbanciju uzoraka pri valnoj duljini od 595 nm. Izračunala sam koncentracije proteina pomoću kalibracijske krivulje i izrazila ih u $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.2.14 Kolorimetrijsko mjerenje aktivnosti HDAC

Za mjerenje aktivnosti HDAC koristila sam komplet *HDAC Activity Colorimetric Assay Kit* (BioVision, USA), metodi koja se zasniva na dva koraka. Prvo se kolorimetrijski HDAC supstrat (koji sadrži acetilirani lizinski bočni lanac) inkubira s uzorkom koji ima aktivnost HDAC. Deacetilacijom supstrat postaje osjetljivijim, pa u drugom koraku tretman s lizinskim razvijanjem (*Lysine Developer*) proizvodi kromofor, koji se onda lako može analizirati mikrotitarskim čitačem ili spektrofotometrom.

Za standardnu krivulju koristila sam deacetilirani standard iz kompleta razrijeđen u koncentracijama 100 μM , 50 μM , 25 μM (Tablica 4), a za 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ pripremila sam 90 μL dH_2O i 10 μL 10x pufera HDAC.

Tablica 4. Priprema standardnih otopina za standardnu krivulju u svrhu mjerenja HDAC

Koncentracija	Priprema
100 μM	2 μL 10 mM standarda + 198 μL dH_2O
50 μM	100 μL 100 μM standarda + 100 μL dH_2O
25 μM	100 μL 50 μM standarda + 100 μL dH_2O

U odgovarajuće jažice sam dodala 10 μL uzorka i 75 μL dH_2O . Za pozitivnu kontrolu sam razrijedila 10 μL nuklearnog ekstrakta HeLa u 75 μL ddH_2O , a za negativnu kontrolu razrijedila sam uzorak u 83 μL ddH_2O i dodala 2 μL trihostatina. Zatim sam u jažice dodala 10 μL 10x pufera HDAC te 5 μL kolorimetrijskog HDAC supstrata. Inkubirala sam pločicu 1 h na 37 $^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije dodala sam 10 μL lizinskog razvijanja te ponovno inkubirala na 37 $^\circ\text{C}$ 30 min.

Apsorbancije sam očitala pomoću čitača na $\lambda = 400$ nm te pomoću standardne krivulje dobila i izračunala koncentracije.

3.2.15. Statistička obrada podataka

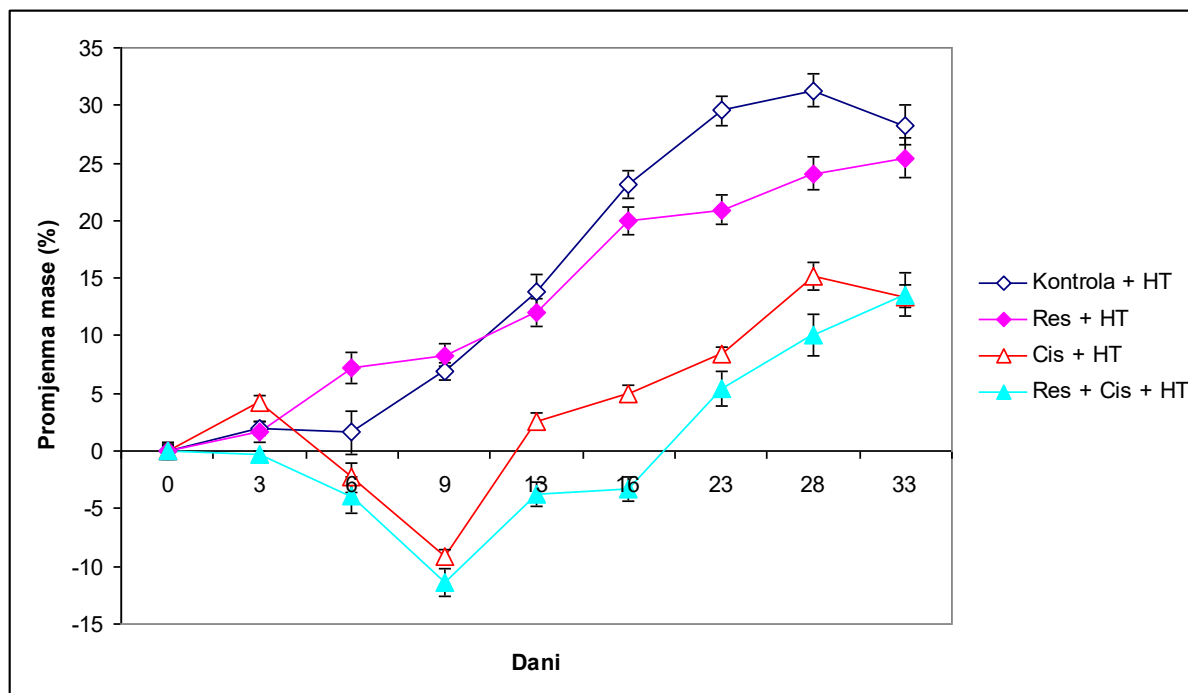
Statistička analiza je provedena pomoću programa STATISTICA 14 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička točnost određena je s $p < 0,05$. Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška (SV \pm SP). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Prema Kaplan-Meierovoj metodi napravljena je krivulja preživljavanja, a usporedba između krivulja preživljavanja određena je Log-Rank testom ($\alpha = 5\%$). Daljnja analiza razlika između skupina napravljena je višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina. Rezultati su prikazani tablično i grafički pomoću box-plot prikaza.

Za pripremu podataka i izračun koncentracija, korišten je računalni program Microsoft Excel 2016.

4. REZULTATI

4.1. Promjena tjelesne mase

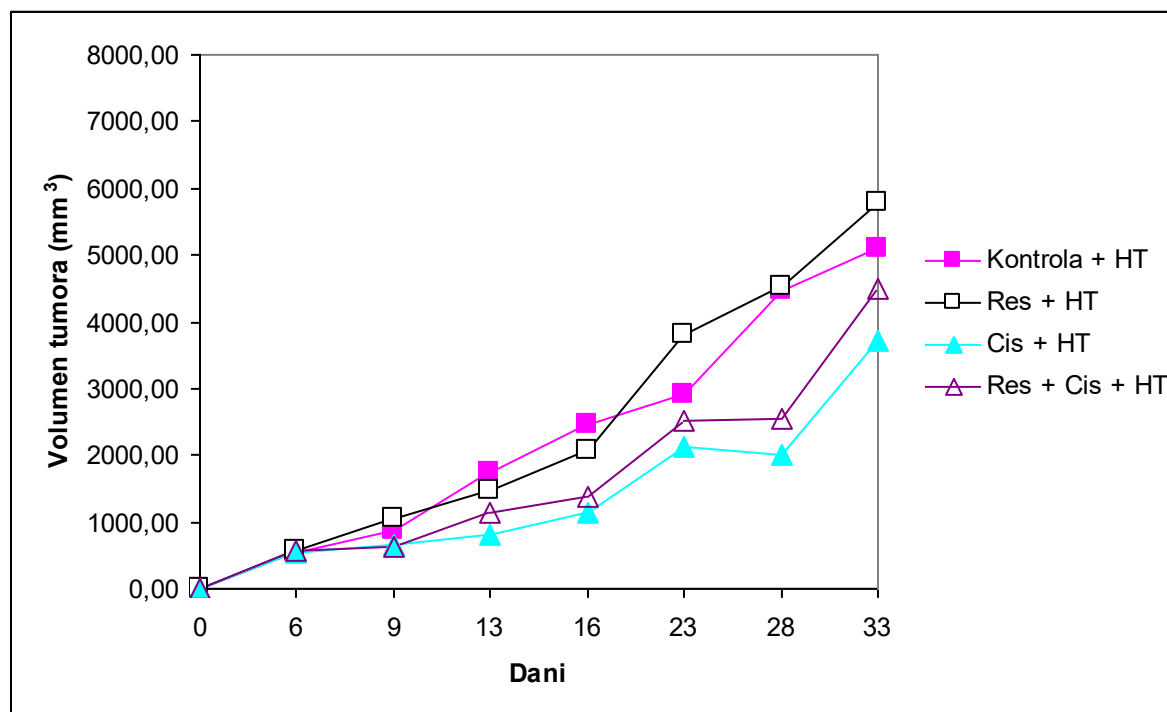
U osamdeset miševa injicirane su stanice EAT te su potom bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima. Tijekom obrade životinja pratila se promjena tjelesne mase miševa i rezultati promjene mase su prikazani na Slici 5. Dobiveni rezultati pokazuju da kontrolna skupina, kojoj su injicirane stanice EAT i koja je izložena hipertermiji, bilježi najveći porast tjelesne mase koji je gotovo linearan od 6. do 23. dana nakon čega slijedi stagnacija do 28. dana i blagi pad mase od 28. do 33. dana. Skupina injicirana stanicama EAT, a zatim obrađena resveratrolom u hipertermalnim uvjetima (Res + HT) pokazuje nagli porast mase od 3. do 6. dana, te stagnaciju mase do 9. dana nakon čega slijedi linearan porast mase do 16. dana. Od 16. do 33. dana je zabilježen blagi porast mase u navedenoj skupini. S druge strane, kod skupine injicirane stanicama EAT, a zatim obrađene cisplatinom u hipertermalnim uvjetima (Cis + HT) od 3. do 9. dana dolazi do naglog gubitka tjelesne mase, a onda od 9. do 28. dana dolazi do njenog povećanja. Skupina injicirana stanicama EAT, a zatim obrađena resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima (Res + Cis + HT) bilježi najveći gubitak tjelesne mase i to od 3. do 9. dana kad dolazi do blagog povećanja do 33. dana koje je, sveukupno gledajući, najmanje u usporedbi s ostalim skupinama. Sve obrađene skupine od 9. dana bilježe porast tjelesne mase, no vrijednosti tjelesne mase su i dalje ispod najviše postignute vrijednosti kontrolne skupine.



Slika 5. Promjene tjelesne mase u miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N= 10 po skupini) su nakon subkutanog (sc) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg po tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg ip 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP). Gubitak mase (%) izračunat je prema formuli: $(\text{masa prvog dana} - \text{masa tijekom ispitivanja}) / \text{masa prvog dana} \times 100$. **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg hipertermija; **sc** – subkutano; **po** - per os; **ip** – intraperitonealno.

4.2. Promjena volumena tumora

Kod miševa kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima pratila se promjena volumena tumora. Na Slici 6 su prikazani rezultati promjene volumena tumora. Rezultati pokazuju nagli porast volumena tumora kod svih skupina 13 dana od početka pokusa, ali ukazuju i na to da je volumen tumora bio smanjen kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom. Kod kontrole skupine s hipertermijom uočen je linearni porast volumena tumora koji je posebice izražen od 9. do 23. dana, nakon čega slijedi nagli porast volumena od 23 do 33. dana. U skupini obrađenoj Res + HT vidljiv je također linearni rast tumora od 6. do 16. dana, te nagli porast do 33. dana. Skupina obrađena Cis + HT pokazuje linearni porast od 9. do 23. dana od kojeg je volumen tumora u stagnaciji sve do 28. dana gdje ponovno počinje njegov nagli rast do 33. dana koji je, sveukupno gledajući, najmanji u odnosu na ostale obrađene skupine. Skupina obrađena Res + Cis + HT pokazuje blagi rast tumora do 23. dana, zatim stagnaciju između 23. i 28. dana, a onda od 28. do 33. njegovo povećanje.

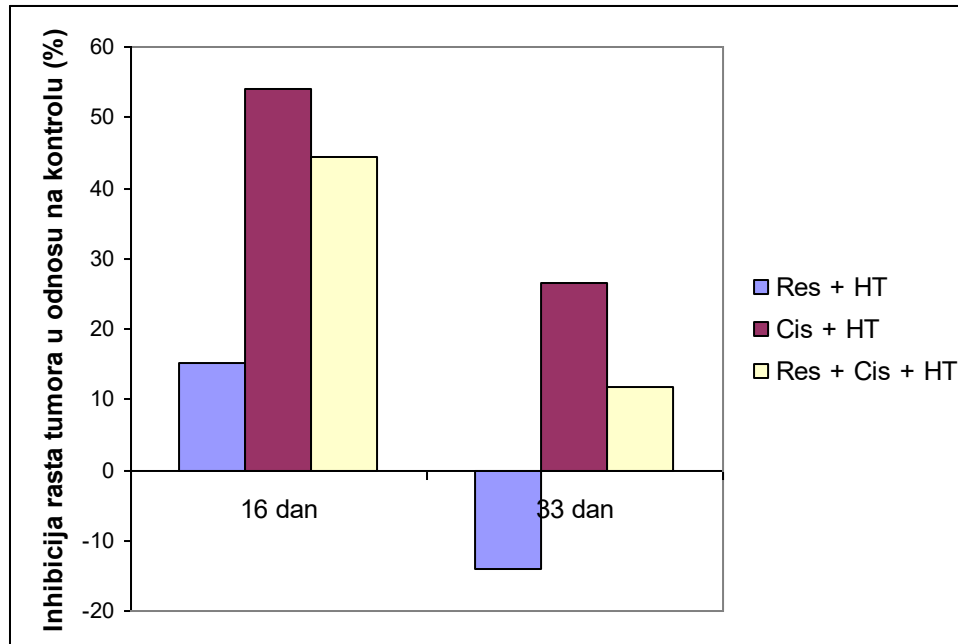


Slika 6. Promjena volumena tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *po* tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatin injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12.

dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP). Širina i dužina tumora su mjerene kaliperom, a volumen tumora je izračunat prema formuli: $Volumen\ tumora\ (mm^3) = \frac{\text{širina\ tumora}^2 \times \text{dužina\ tumora}}{2}$. **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg hipertermija; **sc** – subkutano; **po** - per os; **ip** – intraperitonealno.

4.3. Inhibicija rasta tumora

Veličina tumora kod miševa obrađenih resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima uspoređena je s kontrolnom skupinom te su rezultati prikazani na Slici 7 koja pokazuje viši postotak inhibicije rasta tumora kod sve tri obrađene skupine u odnosu na kontrolu 16. dana. Za skupinu obrađenu Res + HT 16. dana je uočena inhibicija rasta od 15% u odnosu na kontrolu, dok je obrada Res + HT 33. dana vodila povećanju tumora (preko 12%). Skupina obrađena Cis + HT 16. dana bilježi inhibiciju rasta od 54% u odnosu na kontrolu, a 33. dana bilježi inhibiciju od 27% u odnosu na kontrolu. Na temelju navedenog, skupina obrađena Cis + HT bilježi najveći postotak inhibicije u odnosu na ostale obrađene skupine. Za skupinu obrađenu Res + Cis + HT uočena je 16. dana inhibicija rasta tumora od 42% u odnosu na kontrolu, a 33. dana od 12%.



Slika 7. Postotak inhibicije rasta tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima u odnosu na kontrolu. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (sc) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *po* tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP). Iz dobivenih vrijednosti volumena tumora izračunat je postotak inhibicije tumora (%TVI) prema formuli: $\%TVI = \frac{\text{sred.vrij.vol.tumora}_{(\text{kontr.})} - \text{sred.vrij.vol.tumora}_{(\text{tret.grupa})} \times 100}{\text{sred.vrij.vol.tumora}_{(\text{kontr.})}}$. **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; *sc* – subkutano; *po* - per os; *ip* – intraperitonealno.

4.4. Preživljavanje životinja

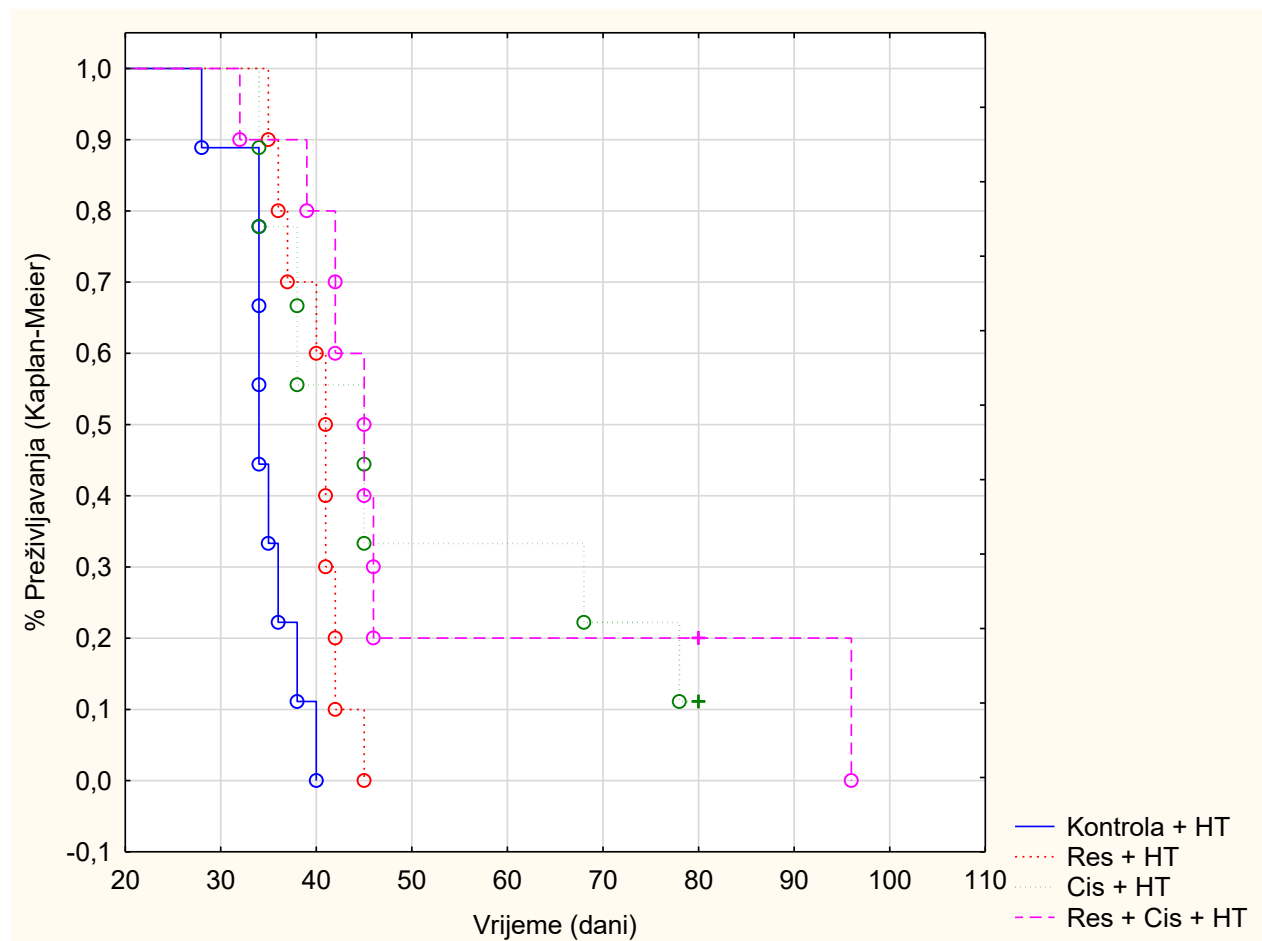
U Tablici 5 i Slici 8 prikazani su rezultati praćenja vremenskog perioda preživljavanja životinja nakon obrade s resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi obrađeni sa Res + Cis + HT i Cis + HT pokazuju najbolje rezultate povećanja životnog vijeka (%ILS) za 47,54% odnosno 46,99%, dok je najmanje povećanje životnog vijeka vidljivo kod skupine obrađene Res + HT i iznosi 15,04% u odnosu na kontrolnu skupinu. Kaplan-Meier krivulja preživljavanja miševa i rezultati Log-Rank testa pokazuju statistički značajnu razliku između slijedećih skupina: Kontrola + HT vs Res + HT ($p < 0,00659$); Kontrola + HT vs Cis + HT ($p < 0,01821$); Kontrola + HT vs Res + Cis + HT ($p < 0,00506$).

Tablica 5. Preživljavanje miševa s Ehrlichovim solidnim tumorom obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima.

Skupina ^a	Raspon preživljavanja (dani)	Srednja vrijednost preživljavanja (dani)	Median (dani)	% T/C ^b	% ILS ^c	Broj preživjelih životinja
Kontrola + HT	28 - 40	34,77 ± 1,10	34,00	/	/	0
Res + HT	35 - 45	40,00 ± 0,97	41,00	115,04	15,04	0
Cis + HT	34 - 80	51,11 ± 6,28	45,00	146,99	46,99	1
Res + Cis + HT	32 - 96	51,30 ± 6,37	45,00	147,54	47,54	1

^a Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *po* tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C.^b $\% \frac{T}{C} = \left(\frac{T}{C}\right) \times 100\%$; T - srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; C - srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja. ^c $\% ILS = \left(\frac{T-C}{C}\right) \times 100\%$; postotak povećanja životnog vijeka (% ILS); T - srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; C - srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja. **Kratice: Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg +

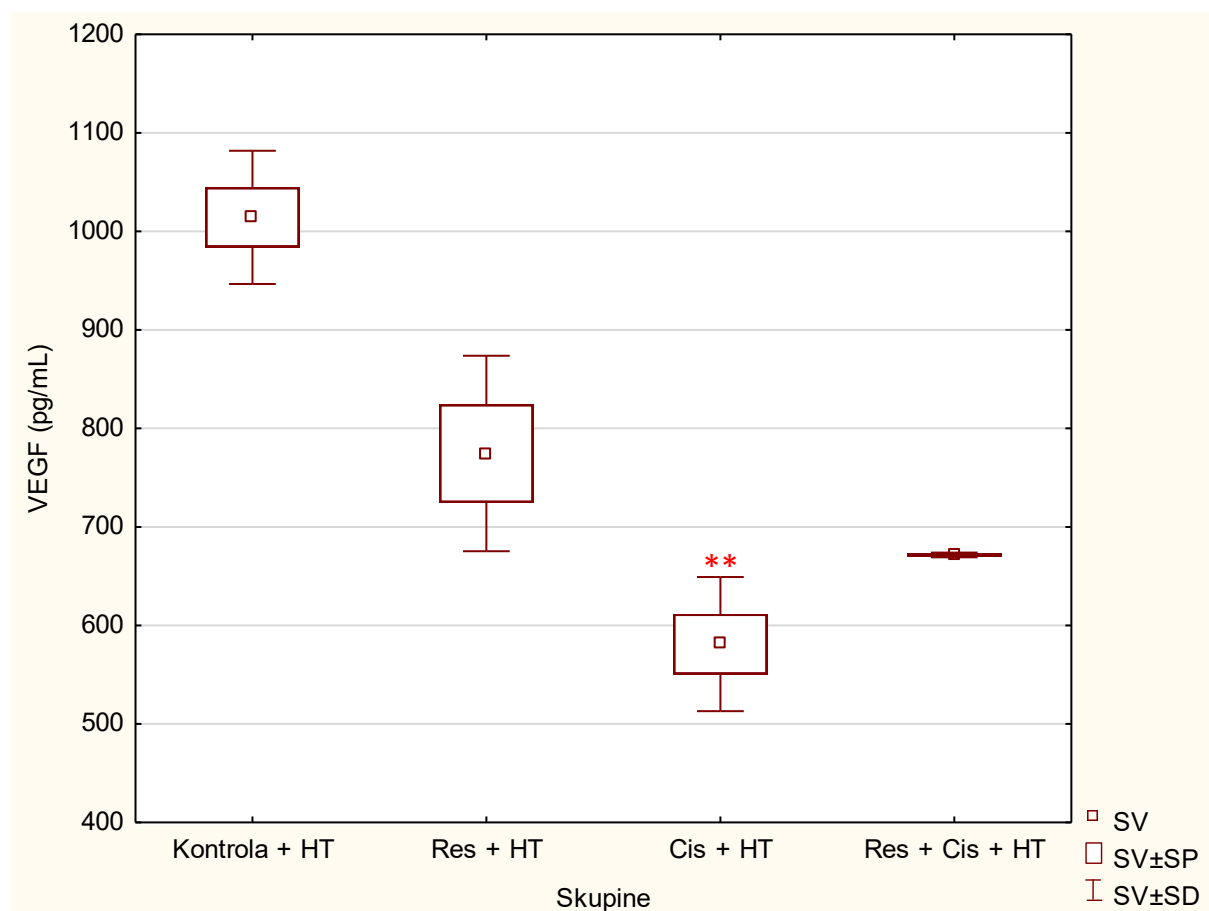
hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; *sc* – subkutano; *po* - per os; *ip* – intraperitonealno.



Slika 8. Kaplan-Meier krivulja preživljavanja miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *po* tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Rezultati Log-Rank testa pokazuju statistički značajnu razliku između slijedećih skupina: Kontrola + HT vs Res + HT ($p < 0,00659$); Kontrola + HT vs Cis + HT ($p < 0,01821$); Kontrola + HT vs Res + Cis + HT ($p < 0,00506$). **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; *sc* – subkutano; *po* - per os; *ip* – intraperitonealno.

4.5. Koncentracija krvožilnog endotelnog čimbenika rasta u tumorskom tkivu

Miševima, kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima, izmjerena je koncentracija VEGF-a u tumorskom tkivu ELISA *sandvič*-testom po završetku obrade. Iz rezultata prikazanih na Slici 9 vidljivo je smanjenje koncentracije kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu, a statistički značajno smanjenje razine VEGF-a uočeno je kod skupine obrađene Cis + HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$).

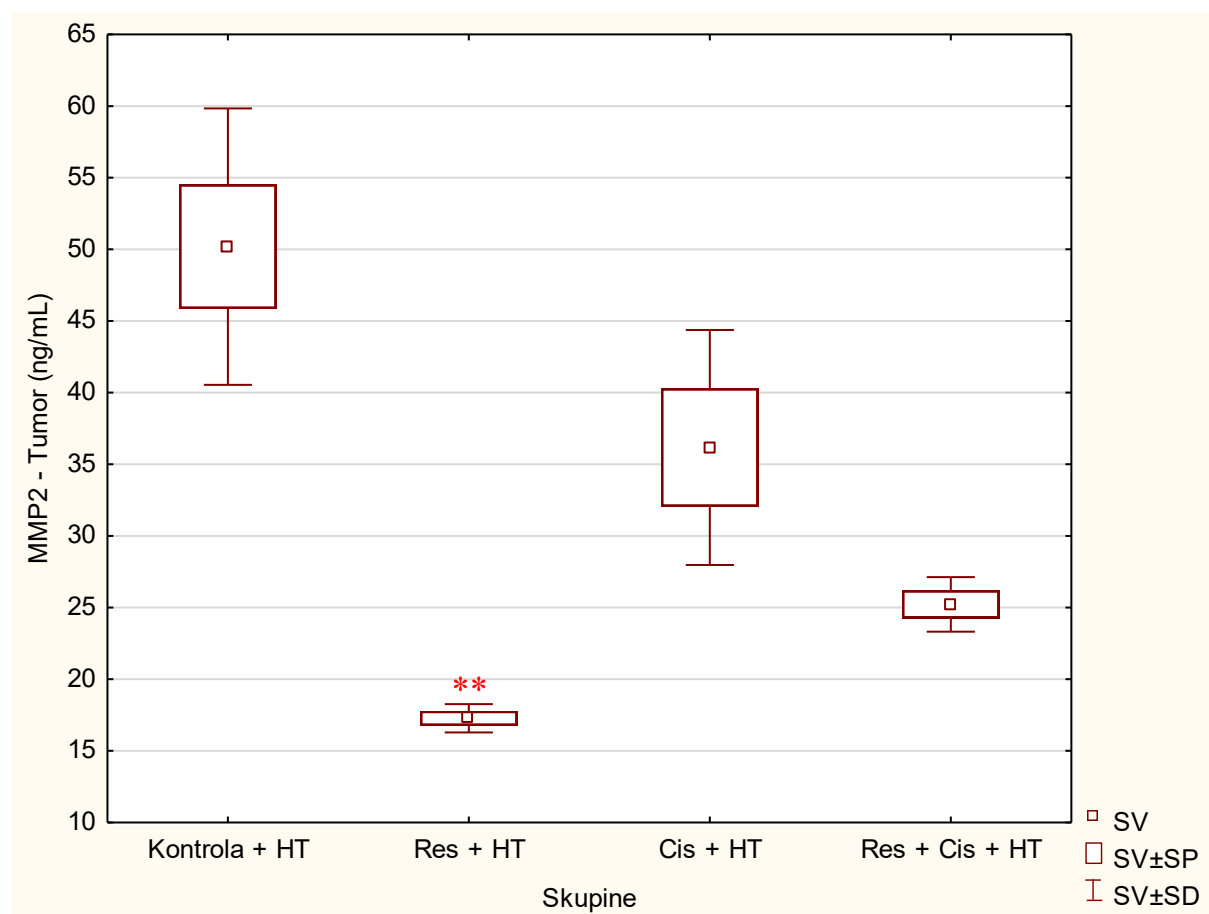


Slika 9. Koncentracija VEGF-a u tumorskom tkivu miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *po* tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatin injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP). *Statistički značajno u odnosu na

kontrolnu skupinu (** $p < 0,01$). **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **sc** – subkutano; **po** - per os; **ip** – intraperitonealno; **SV** - srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** - standardna devijacija.

4.6. Koncentracija matriksne metaloproteinaze 2 (MMP-2) u tumorskom tkivu

Miševima, kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima, izmjerena je koncentracija MMP-2 u tumorskom tkivu ELISA *sendvič*-testom po završetku obrade. Iz rezultata prikazanih na Slici 10 vidljivo je statistički značajno smanjenje koncentracije MMP-2 kod skupine obrađene Res + HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$).

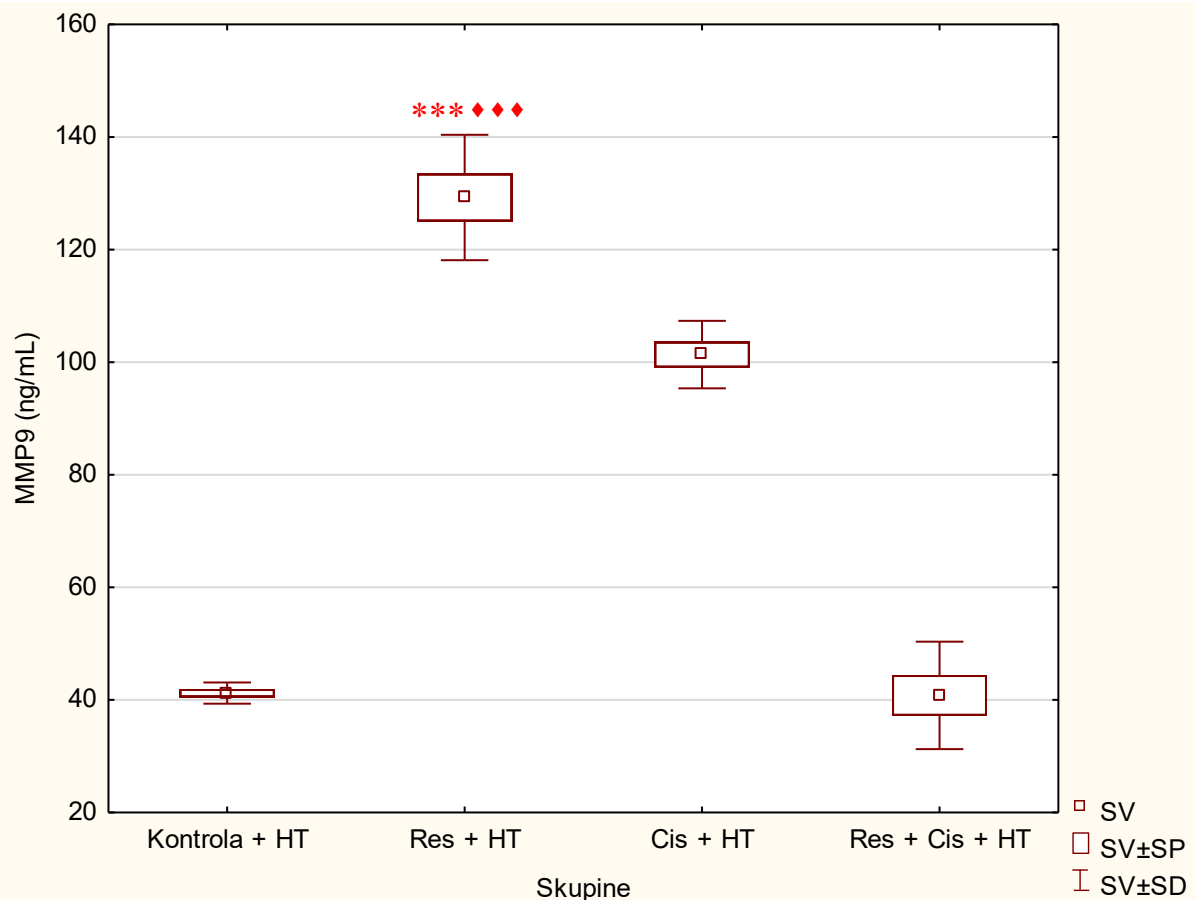


Slika 10. Koncentracija MMP-2 u tumorskom tkivumiševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su

nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *po* tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP). *Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (** $p < 0,01$). **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **sc** – subkutano; **po** - per os; **ip** – intraperitonealno; **SV** - srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** - standardna devijacija.

4.7. Koncentracija matriksne metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tumorsk om tkivu

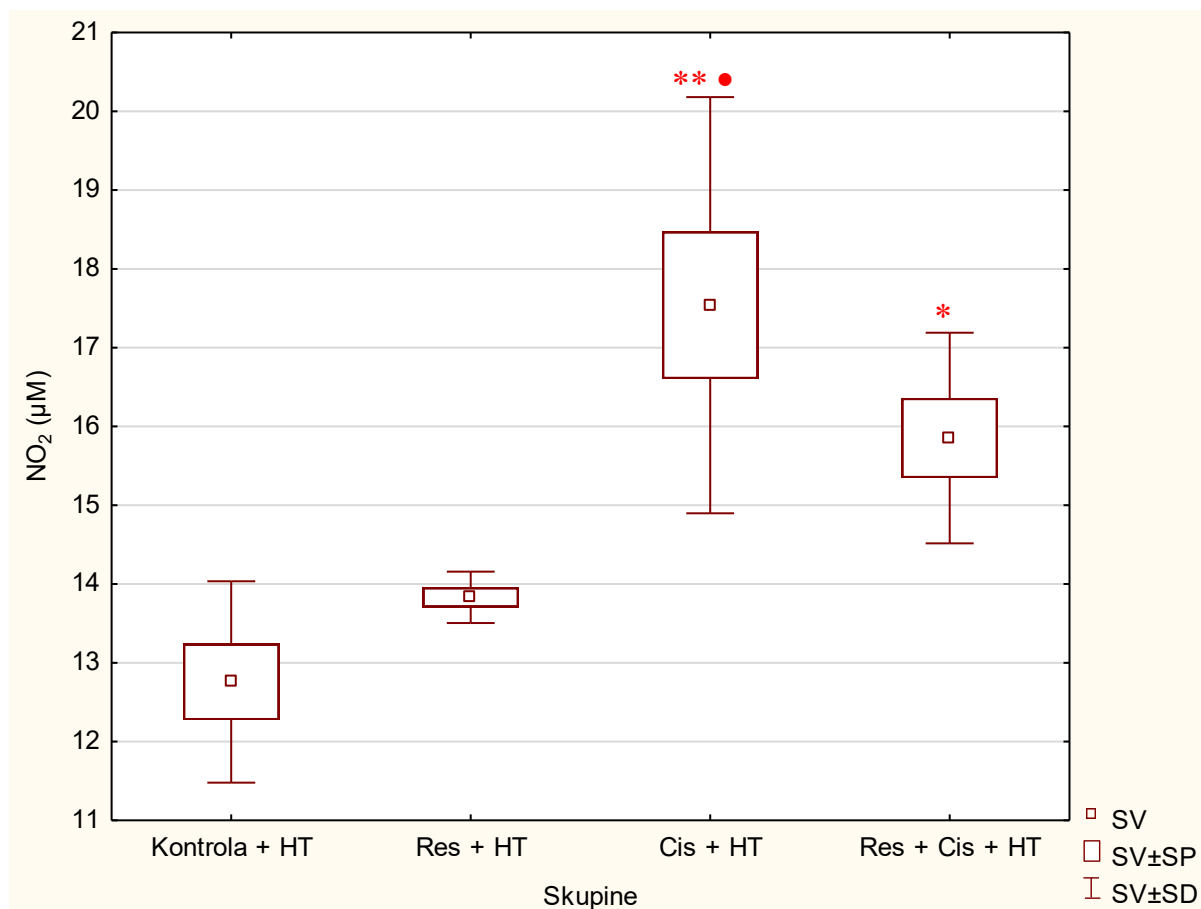
Miševima, kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima, izmjerena je koncentracija MMP-9 u om tkivu ELISA *sendvič*-testom po završetku obrade. Na Slici 11 vidljivo je statistički značajno povećanje koncentracije MMP-9 kod skupine obrađene Res + HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$) i skupinu obrađenu Res + Cis + HT ($p < 0,001$).



Slika 11. Koncentracija MMP-9 u tumorskom tkivu miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP). *Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (***) $p < 0,001$); ♦ Statistički značajno u odnosu na Res + Cis + HT (♦♦♦ $p < 0,001$). **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatin u dozi od 2,5 i 5 mg/kg hipertermija; *sc* – subkutano; *po* - per os; *ip* – intraperitonealno; **SV** - srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** - standardna devijacija.

4.8. Aktivnost dušikova oksida (NO) u tumorskom tkivu

Miševima, kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima, metodom prema Griessu izmjerena je aktivnost dušikova oksida u tumorskom tkivu po završetku obrade. Rezultati mjerenja dušikova oksida (NO) prikazani na Slici 12. pokazuju statistički značajno povećanu aktivnost NO kod skupine obrađene Cis + HT u odnosu na skupinu obrađenu Res + HT ($p < 0,05$) i na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$). Također, skupina obrađena Res + Cis + HT pokazuje statistički značajno povećanje aktivnosti NO u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$).

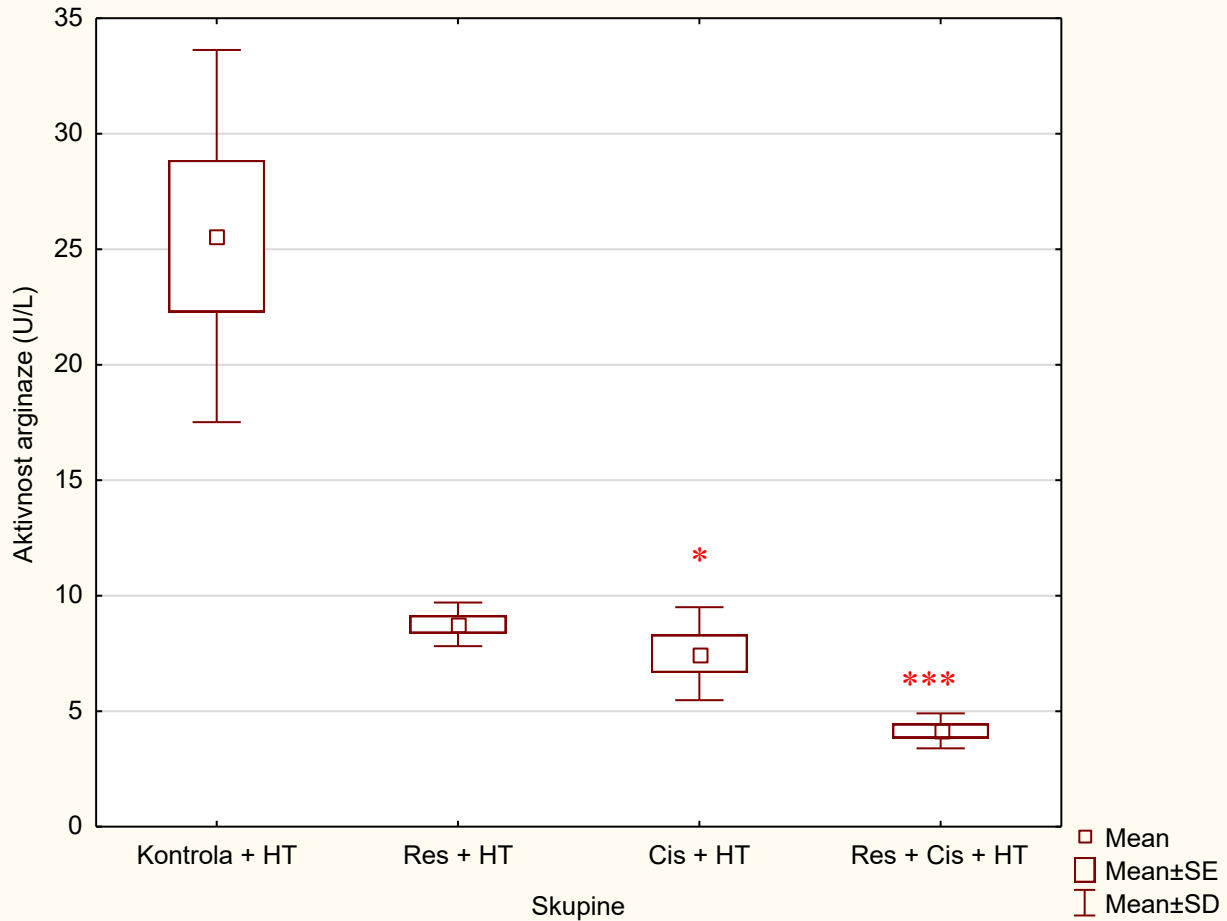


Slika 12. Aktivnost NO_2^- u tumorskom tkivu miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi ($N=10$) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatin injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ (SP). *Statistički značajno u odnosu

na kontrolnu skupinu ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$); \bullet Statistički značajno u odnosu na Res+ HT ($\bullet p < 0,05$).
Kratice: **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg hipertermija; **sc** – subkutano; **po** - per os; **ip** – intraperitonealno; **SV** - srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** - standardna devijacija.

4.9. Aktivnost arginaze (Arg-1) u tumorskom tkivu

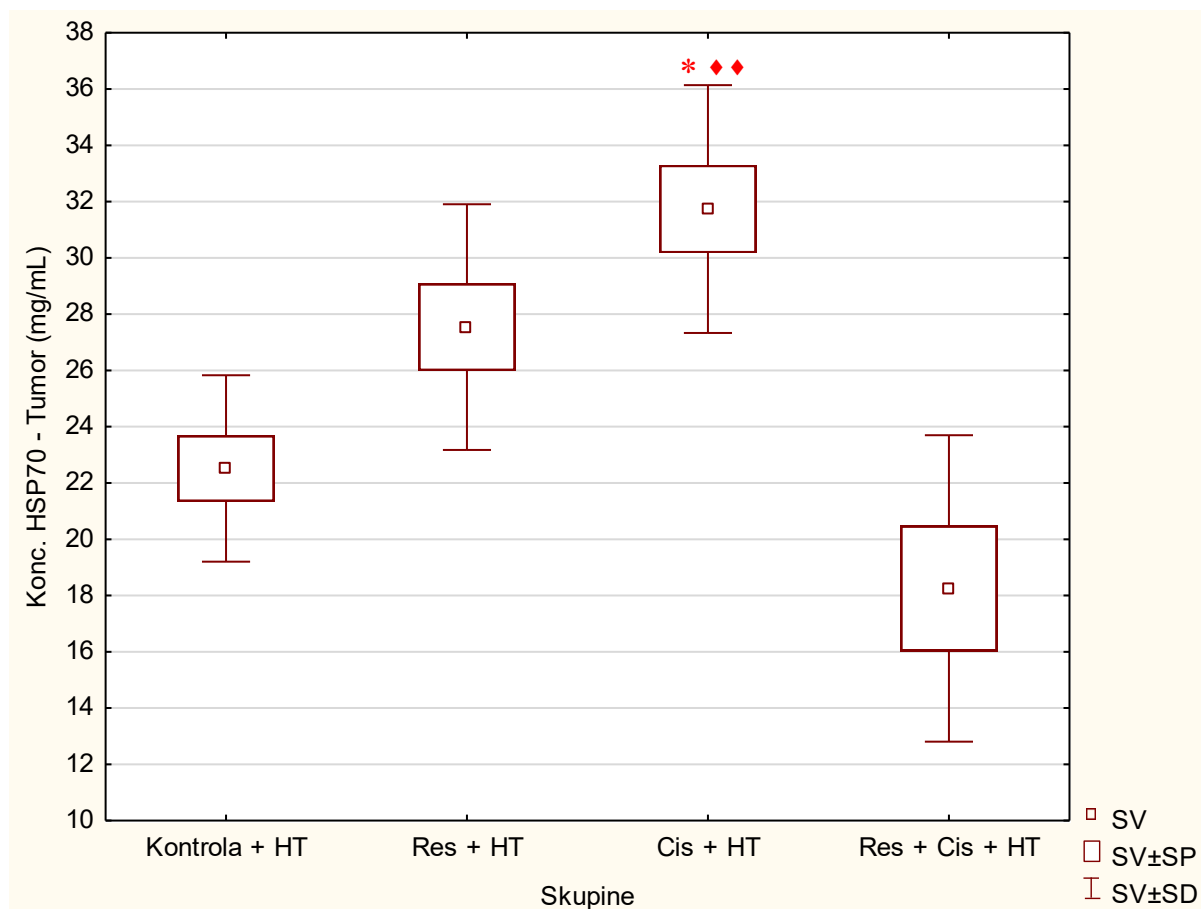
Miševima, kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima, izmjerena je aktivnost arginaze u tumorskom tkivu po završetku obrade. Rezultati mjerenja arginaze (Arg-1) prikazani na Slici 13 pokazuju statistički značajno smanjenu aktivnost Arg-1 kod skupine obrađene Cis + HT ($p < 0,05$) i Res + Cis + HT ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 13. Aktivnost Arg-1 u tumorskom tkivu miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatin injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP). *Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatin u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatin u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; *sc* – subkutano; *po* - per os; *ip* – intraperitonealno; **SV** - srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** - standardna devijacija.

4.10. Koncentracija proteina toplinskog stresa HSP-70 (engl. *HSP - heat shock protein*) u tumorskom tkivu

Miševima, kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima, ELISA *sendvič*-testom je izmjerena koncentracija HSP-70 u tumorskim stanicama po završetku obrade. Rezultati određivanja koncentracije HSP-70 prikazani na Slici 14 pokazuju statistički značajno višu koncentraciju HSP-70 kod skupine obrađene Cis + HT u odnosu na skupinu obrađenu Res + Cis + HT ($p < 0,01$) i kontrolnu skupinu ($p < 0,05$).

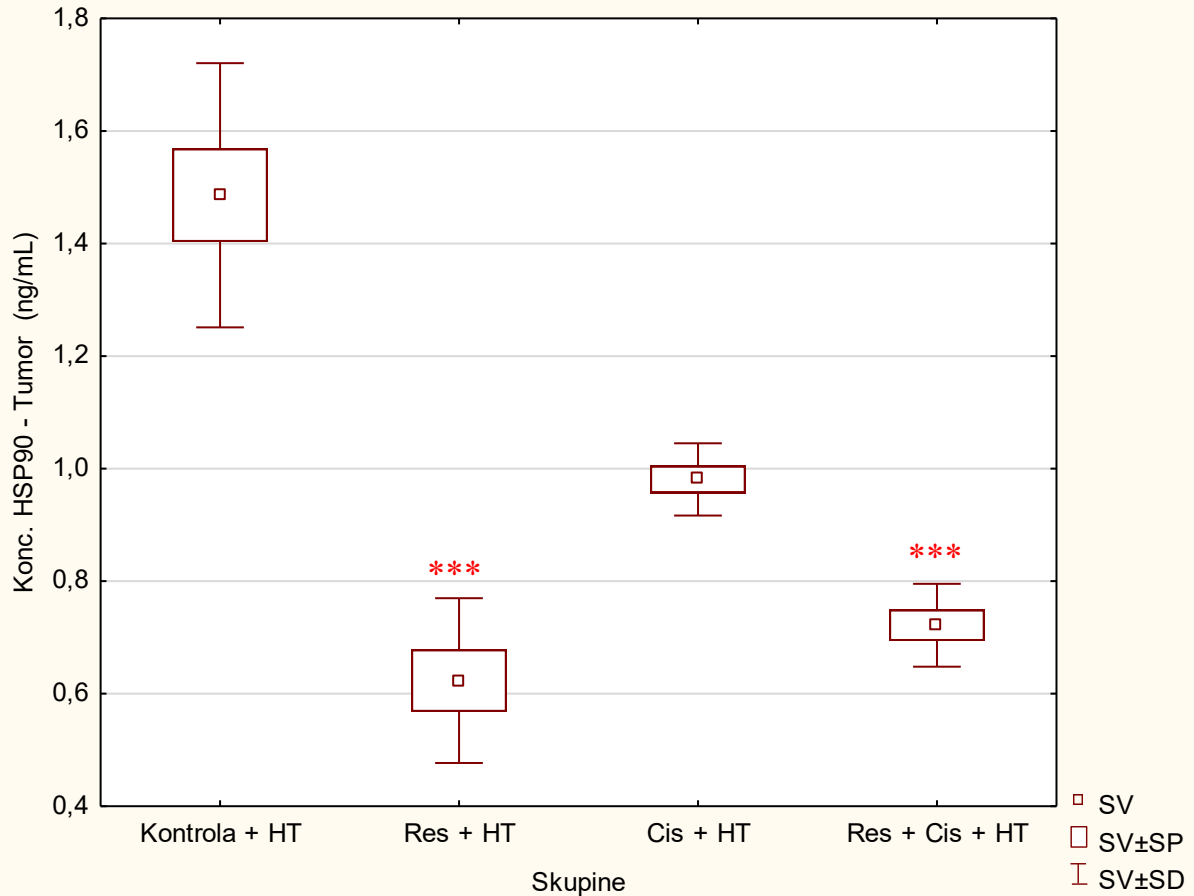


Slika 14. Koncentracija HSP-70 u tumorskom tkivu miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15

minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP). *Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ($*p < 0,05$); ♦Statistički značajno u odnosu na Res + Cis + HT (♦♦ $p < 0,01$).
Kratice: **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; *sc* – subkutano; *po* - per os; *ip* – intraperitonealno; **SV** - srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** - standardna devijacija.

4.11. Koncentracija proteina toplinskog stresa HSP-90 (engl. *HSP - heat shock protein*) u tumorskom tkivu

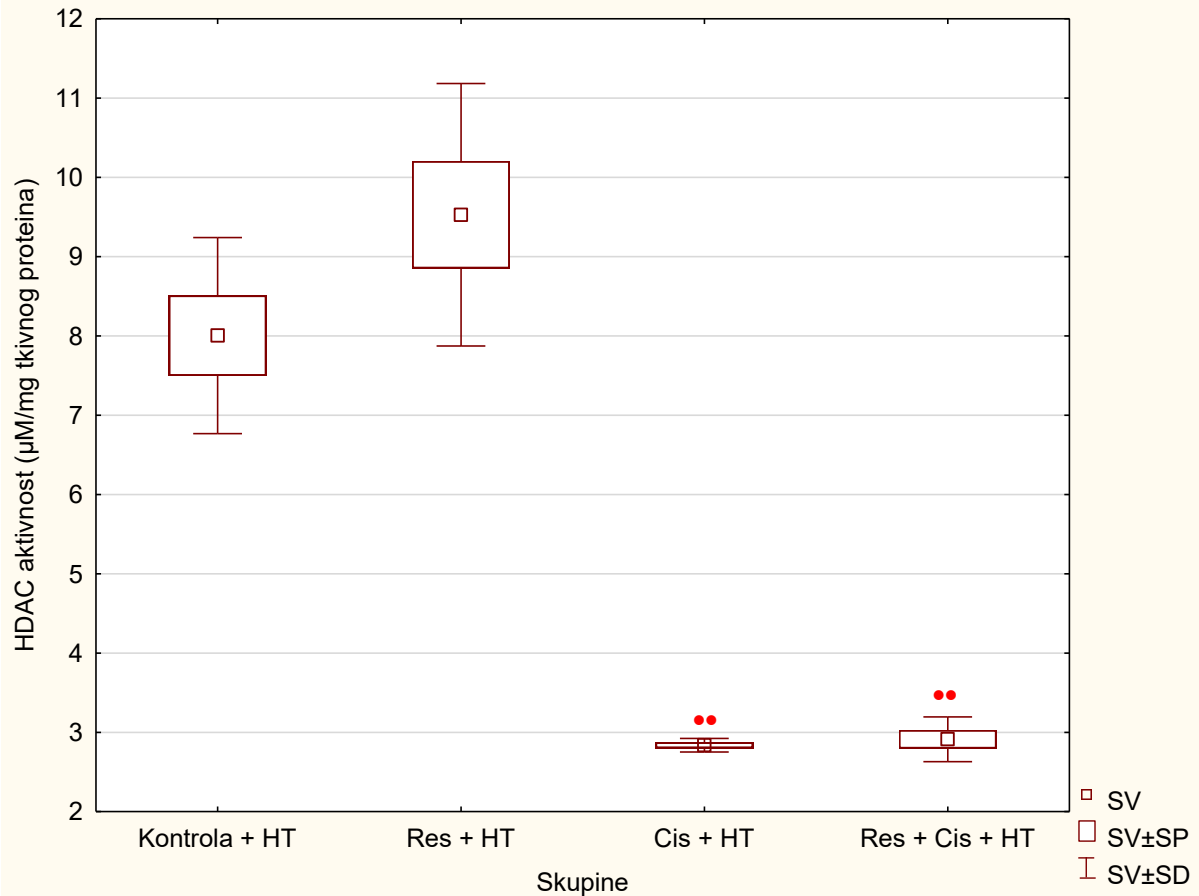
Miševima, kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima, ELISA *sendvič*-testom izmjerena je koncentracija HSP-90 u tumorskom tkivu po završetku obrade. Rezultati prikazani na Slici 15 pokazuju statistički značajno nižu koncentraciju HSP-90 kod skupine obrađene Res + HT ($p < 0,001$) i kod skupine obrađene Res + Cis + HT ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 15. Koncentracija HSP-90 u tumorskom tkivu miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SD (SP). *Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (***) $p < 0,001$). **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** - cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; *sc* - subkutano; *po* - per os; *ip* - intraperitonealno; **SV** - srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** - standardna devijacija.

4.12. Aktivnost histonskih deacetilaza u tumorskim stanicama

Miševima, kojima su injicirane stanice EAT i koji su bili obrađeni resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima, kolorimetrijskim mjerenjem izmjerena je aktivnost HDAC u tumorskom tkivu po završetku obrade. Rezultati mjerenja aktivnosti HDAC-a prikazani na Slici 16 pokazuju statistički značajno nižu razinu aktivnosti HDAC-a kod skupine obrađene Cis + HT ($p < 0,01$) i kod skupine obrađene Res + Cis + HT ($p < 0,01$) u odnosu na skupinu obrađenu Res + HT.



Slika 16. Aktivnost HDAC u tumorskom tkivu miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima. Miševi (N=10) su nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 stanica EAT obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *po* tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora, dok je cisplatina injicirana *ip* u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP). *Statistički značajno u odnosu na Res+ HT (** $p < 0,01$). **Kratice:** **Res + HT** - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg + hipertermija; **Cis + HT** – cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; **Res + Cis + HT** – otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od 2,5 i 5 mg/kg + hipertermija; *sc* – subkutano; *po* - per os; *ip* – intraperitonealno; **SV** - srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** - standardna devijacija.

5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu istražili smo terapijski potencijal resveratrola u kombinaciji s cisplatinom na rast tumora u hipertermalnim uvjetima u miša tako što smo miševima subkutano (*sc*) injicirali 1×10^6 stanica EAT što označava 0. dan pokusa te smo zatim miševe obradili različitim spojevima. Miševi su obrađeni resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2. dana od injiciranja tumora, a cisplatina je injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozama od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te 5 mg/kg 15. dan. Miševi su izloženi sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Praćenjem razine VEGF-a, MMP-2 i MMP-9 te polarizacije makrofaga istražen je potencijal resveratrola i cisplatine na inhibiciju brzorastućeg EAT-a u hipertermalnim uvjetima u miša. Također, istraženo je može li višemodalni pristup s hipertermijom i resveratrolom dokinuti otpornost tumorskih stanica na cisplatinu kroz modulaciju aktivnosti HDAC-a i razine HSP-70 i HSP-90 te tako doprinijeti direktnoj toksičnosti na stanice tumora, inhibiciji angiogeneze i rasta tumora, te posljedičnom povećanju životnog vijeka miševa.

Maligne tumorske stanice mogu cirkulirati i proliferirati unutar krvnih i limfnih žila te stvarati metastaze, a za razvoj metastaza ključna je angiogeneza (Nishida i sur., 2006). VEGF je bitan pro-angiogenetski čimbenik, a proizvodnja VEGF-a u tumorskim stanicama je povećana (Pecorino, 2012). Brojni biljni pripravci sadrže sastavnice koje učinkovito djeluju u kontroli rasta tumora i inhibiciji angiogeneze, uključujući resveratrol, kvercetin i kurkumin. Kombinacija kvercetina i cisplatine ima sinergistički učinak s hipertermijom (43 °C) i inhibira rast EAT-a *in vivo* te povećava životni vijek miševa (Oršolić i sur., 2020). Analog kurkumina H-4073 poboljšava terapijski učinak cisplatine u liječenju tumora glave i vrata. H-4073 blokira stvaranje VEGF-a i tako inhibira angiogenezu u tumorskim stanicama (Kumar i sur. 2014). El-Azab i suradnici (2011) su pokazali da resveratrol i kurkumin ostvaraju antiangiogeni učinak smanjenjem mikrožilne gustoće. U istraživanju koje su oni proveli, koncentracije VEGF-a u plazmi su bile značajno smanjene u skupinama miševa nositelja EAT-a obrađenim resveratrolom ili kurkuminom i njihovom kombinacijom s karboplatinom 7. dana nakon unosa. Obje fitokemikalije djeluju antiangiogeno tako što inhibiraju VEGF i njegov receptor tipa 2 Flk-1 u ranim fazama rasta tumora (El-Azab i sur., 2011). Rezultati našeg istraživanja su pokazali smanjenje koncentracije VEGF-a u tumorskim stanicama kod svih obrađenih skupina, a statistički značajno je smanjenje koncentracije VEGF-a kod skupine obrađene Cis + HT ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu (Slika 9).

Također, skupina obrađena Cis + HT bilježi najmanji rast tumora uspoređujući ostale skupine (Slika 6) i najveći postotak inhibicije tumora u odnosu na ostale obrađene skupine (Slika 7), a nakon nje skupina obrađena Res + Cis + HT. Skupine obrađene s Res + Cis + HT i Cis + HT pokazuju i najbolje rezultate povećanja životnog vijeka (%ILS) za 46,99%, odnosno 47,54% (Slika 8). Dobiveni rezultati jasno ukazuju na veću antitumorsku učinkovitost cisplatine te kombinacije resveratrola i cisplatine na rast tumora miša u hipertermalnim uvjetima.

Vežanjem za VEGFR endotelnih stanica, VEGF stimulira lučenje matriks metaloproteinaza (MMP) koje uzrokuju razaranje izvanstaničnog matriksa (Nishida i sur., 2006). Supstrati za MMP mogu biti različiti prekursori i receptori čimbenika rasta, adhezijskih receptora, citokina i njihovih receptora (Pittayapruek i sur., 2016). Povećana razina MMP-2 i MMP-9 povezana je s invazivnim i metastatskim potencijalom malignog tumora jajnika (Stack i sur., 1998). Potvrđeno je da resveratrol dokazano smanjuje ekspresijsku razinu proteina MMP-2 i MMP-9 u MDA-MB-231 stanicama (Sun i sur., 2019). Smanjena razina MMP-2 i MMP-9 uvjetuje smanjenje invazivnosti i metastaziranja te posljedično bolju prognozu (Reunanen i Kähäri, 2013). Naši rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje koncentracije MMP-2 kod skupine obrađene Res + HT u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$), a kod ostalih obrađenih skupina koncentracija MMP-2 je također niža u odnosu na kontrolu, ali bez značajnosti (Slika 10). Smanjenje koncentracije MMP-2 u tumorskim stanicama nakon obrade resveratrolom je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Gagliano i sur. (2005) i dokazali sposobnost resveratrola da smanji ekspresiju MMP-2 u primarnoj kulturi stanica glioblastoma. Također, Xiong i sur. (2016) su pokazali da resveratrol može inhibirati pokretljivost i invazivnost stanica glioblastoma smanjenjem ekspresije MMP-2.

Resveratrol inhibira migraciju i invaziju karcinoma prostate, promovirajući demetilaciju i povećanje ekspresije tkivnih inhibitora metaloproteinaza, TIMP2 i TIMP3 (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*) te suprimiranjem ekspresije MMP-2 i MMP-9 (Wang i sur., 2020). Suprotno navedenim rezultatima, naši rezultati pokazuju statistički značajno veću koncentraciju MMP-9 kod skupine obrađene Res + HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$) (Slika 11). Također, skupina Res + HT ima statistički značajno povećanu koncentraciju u odnosu na skupinu obrađenu Res + Cis + HT ($p < 0,001$) (Slika 11). Dobiveni rezultati mogu se objasniti dvostrukom ulogom MMP-a. Točnije, MMP su uključene u brojne procese, uključujući rast, preživljavanje,

angiogenezu, invaziju i imunost, ali njihova dvojna uloga ukazuje i na njihovu uključenost u kontroli stanične smrti, upale, infekcije i angiogeneze. Iako su niže razine MMP-9 povezane s boljom prognozom u liječenju tumora, više razine ne moraju značiti suprotni učinak s obzirom na ulogu MMP-9 u kontroli angiogeneze i njihovoj sposobnosti cijepanja antiangiogenih prekursora i aktiviranja angiostatina i drugih antiangiogenih čimbenika kao što su endostatin i tumstatin što posljedično vodi smanjenju tumorskog rasta i gustoće krvožilja (Folgueras i sur., 2004). Angiostatin, kao antiangiogeni čimbenik reducira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica, oslobađa se iz plazminogena djelovanjem plazmina, plazmin reduktaze, te MMP (MMP-12, MMP-9, MMP-7 i MMP-3) (Reunanen i Kähäri 2013). Skupina obrađena Res + HT pokazala je najmanje povećanje životnog vijeka od 15,04% (Tablica 5; Slika 8) te je za istu skupinu 16. dana pokusa uočena inhibicija rasta od 15% u odnosu na kontrolu, dok je 33. dana uočeno povećanje tumora preko 12% (Slika 7). Povećana razina MMP-9, u ovoj skupini (Res + HT), očito je posljedica kratkotrajne biodostupnosti resveratrola i nemogućnosti dugoročne kontrole angiogeneze. Dugoročno bolje rezultate inhibicije rasta tumora i preživljenja životinja imaju skupine obrađene s Res + Cis + HT i Cis + HT (Slika 7, Slika 8).

Rezultati mjerenja dušikova oksida (NO) prikazani na Slici 12 pokazali su statistički značajno povećanu aktivnost NO kod skupine obrađene Cis + HT u odnosu na skupinu obrađenu Res + HT ($p < 0,05$) i na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$). Također, skupina obrađena Res + Cis + HT pokazuje statistički značajno povećanje aktivnosti NO u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$) (Slika 12). Uloga NO-a u tumorima ovisi o koncentraciji NO-a, trajanju izloženosti u stanicama, osjetljivosti stanice, izvanstaničnim uvjetima i smještaju iNOS-a u tkivima (Mocellin i sur., 2007; Khan i sur., 2020; McGinity i sur., 2021). Niže i srednje koncentracije NO-a potiču angiogenezu, metastaziranje, veću invazivnost i koče procese apoptoze. Pri višim koncentracijama, NO postaje citotoksičan za tumorske stanice i potiče apoptozu (Fukumura i sur., 2006). NO može modulirati apoptozu i preživljavanje brojnih stanica uključenih u imunski odgovor među kojima su i makrofagi (Bogdan 2001). M1 makrofagi povećavaju regulaciju iNOS enzima koji katalizira pretvorbu L-arginina u NO i citrulin, dok M2 makrofagi povećavaju ekspresiju enzima Arg-1, a ta dva enzima su u kompeticiji za L-arginin (Rodríguez i Ochoa, 2008; Tugal i sur., 2013). M1 makrofagi su proupalni i inhibiraju staničnu proliferaciju i uništavaju oštećena tkiva izlučivanjem proupalnih citokina (IL-12 i IL-23) i dušikovog oksida (NO) te imaju veliku sposobnost predočavanja antigena (Verreck i sur., 2004; Fujiwara i Kobayashi, 2005; Wynn i sur., 2013; Wang

i sur., 2014). M2 makrofagi se karakteriziraju kao anti-upalni, sa slabom sposobnošću predočavanja antigena, luče visoke koncentracije citokina IL-10, IL-4 i IL-13 i imaju immunosupresivan učinak (Allavena i sur., 2008). Ekstrizična polarizacija makrofaga je posredovana citokinima koje luče stanice poput CD4+ Th1 i Th2 ili putevima koji ne uključuju citokine, primjerice hipoksija i produkcija laktata u tumorskim stanicama koji vode prema M2 polarizaciji (Murray, 2017). U tumorskom mikrookolišu, tumoru-pridruženi makrofagi se najčešće nalaze u fenotipu M2 (Mantovani i sur., 2002; Allavena i Mantovani, 2012). Kao što je već navedeno M2 makrofagi povećano eksprimiraju Arg-1, a prekomjerna ekspresija Arg-1 je loš prognostički čimbenik u različitim tipovima raka, uključujući neuroblastom, akutnu mijeloidnu leukemiju (AML), karcinom gušterače, karcinom jajnika i kolorektalni karcinom (Ino i sur., 2013; Mussai i sur., 2013, 2015; Czystowska-Kuzmicz i sur., 2019; Ma i sur., 2019). Arginaza je ključna hidrolaza u ciklusu uree koja hidrolizira L-arginin u ureu i L-ornitin. Sve veći broj istraživanja posljednjih godina pokazuje da arginaza 1 i 2 ima ključnu ulogu u regulaciji rasta tumora i metastaza kroz različite mehanizme kao što je reguliranje metabolizma L-arginina, promjene u signalnim putevima, utjecaj na tumorsko imunološko mikrookruženje (TME, engl. *Tumor microenvironment*), itd. Stoga, arginaza dobiva sve veći značaj kao atraktivna meta za terapiju raka. Arginaza regulira imunološki bijeg stanica raka na različite načine u TME kroz nekoliko mehanizama: (i) visoko izražene Arg-1 i Arg-2 u stanicama raka izravno oštećuju funkciju T stanica iscrpljivanjem L-arginina u TME; (ii) izlučena Arg-1 ili izvanstanične vezikule koji sadrže Arg-1 iz mijeloidnih dendritičkih supresorskih stanica (MDSC, engl. *Myeloid-derived suppressor cells*) i TAM iscrpljuju L-arginin u TME, što dovodi do supresije aktivacije i proliferacije T-stanica, što u konačnici uzrokuje imunološki bijeg tumorskih stanica; (iii) konačno, visoka ekspresija Arg-2 u stanicama Treg pojačava supresivni kapacitet i nakupljanje stanica Treg putem inhibicije signalnog puta mTOR, što zauzvrat uzrokuje imunološki bijeg tumorskih stanica (Zea i sur., 2005; Rodríguez i Ochoa 2008; Delgoffe i sur., 2009; Sahin i sur., 2014; Wang i sur., 2016; Nan i sur., 2018; Lowe i sur., 2019). Naši rezultati mjerenja arginaze Arg-1 prikazani na Slici 13 su pokazali statistički značajno smanjenu aktivnost Arg-1 kod skupine obrađene Cis + HT i Res + Cis + HT ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Manja aktivnost Arg-1 u ovim skupinama ukazuje na polarizaciju makrofaga M2 prema M1 fenotipu, što ukazuje na bolje antitumorsko djelovanje primjenom kombinacije Cis + HT i Res + Cis + HT. Čini se da je ovaj mehanizam uključen u smanjenje volumena tumora i u značajno preživljavanje životinja. Cisplatin, kao jedan

od najvažnijih i najviše primjenjivanih kemoterapeutika inhibicijom stanica Treg i MDSC može pojačati efektornu aktivnost citotoksičnih stanica T na tumor.

Izlaganjem stanica fiziološkim i okolišnim stimulatorima, kao što su hipertermija, anoksija, UV svjetlo, toksini, kemijski agensi ili neka druga sredstva koja narušavaju homeostazu, povećava se ekspresija proteina toplinskog stresa HSP (Jäättelä, 1999; Hartl i sur., 2011; Kim i sur., 2013). Stresni uvjeti kao što su hipoksija i gladovanje, čine tumorske stanice podložne apoptozi (Hanahan i Weinberg, 2011), a HSP-70, koji je prekomjerno zastupljen u tumorima, suprimira apoptozu i dovodi do progresije tumora (Mosser i sur., 1997; Albakova i sur., 2020). HSP-70 može vezati i stabilizirati HIF-1 α u tumorskim stanicama (Zhou i sur., 2004). Neka istraživanja su pokazala da HSP-70 stabilizira lizosomsku membranu dopuštajući tumorskim stanicama izbjegavanje stanične smrti (Nylandsted i sur., 2004; Bivik i sur., 2007; Daugaard i sur., 2007). Imunogena priroda HSP-70 proizlazi iz sposobnosti vezanja antigenskih tumorskih peptida (Srivastava 2002). Kompleks HSP-70-peptid rezultira staničnim odgovorom specifičnim za antigen CD8⁺ T (Blachere i sur., 1997). Prekomjerna koncentracija HSP-70 povezana je s otpornošću na kemoterapiju (Garrido i sur., 2003; Jegu i sur., 2013). Osim HSP, rezistencija na cisplatinu može biti urođena i stečena, a neki od mehanizama rezistencije najčešće su promjene u staničnom unosu i izbacivanju lijeka, povećanoj detoksikaciji lijeka, inhibiciji apoptoze i povećanim mehanizmima popravka DNA (Shen i sur., 2012). U istraživanju koje su proveli Li i sur. (2021) na tkivima pacijenata oboljelih od karcinoma jajnika EOC, ekspresija HSP-70 je značajno veća bila u tkivu otpornom na kemoterapiju nego u tkivu osjetljivom na kemoterapiju. Naši rezultati određivanja koncentracije HSP-70 su pokazali da je koncentracija HSP-70 u skupini obrađenoj Res + Cis + HT bila značajno niža ($p < 0,01$) u odnosu na skupinu obrađenu Cis + HT (Slika 14). Smanjena koncentracija HSP-70 pogoduje smrti tumorskih stanica.

Prekomjerna ekspresija HSP-90 je povezana s brojnim bolestima, različitim tipovima tumora, virusnim infekcijama, upalom i neurodegenerativnim bolestima (Whitesell i Lindquist, 2005; Luo i sur., 2010; Geller i sur., 2012). Visoke razine HSP-90 povezane su i sa slabijim odgovorom na liječenje malignih bolesti (Pick i sur., 2007). Ekspresija HSP-90 je povezana s aktivacijom HIF-1 α i NF- κ B te time s EMT-om, invazijom i migracijom tumorskih stanica (Nagaraju i sur., 2015). Pojačana invazivnost je povezana sa sekrecijom HSP-90 α iz invazivnih tumorskih stanica putem egzosoma pri čemu dolazi do aktivacije MMP-2 (McCready i sur., 2010). Blokiranjem ili

neutraliziranjem proteina HSP-90 inhibira se pokretljivost tumorskih stanica *in vitro* i metastaziranje tumora *in vivo* (Tsutsumi i sur., 2008). Naši rezultati su pokazali statistički značajno nižu koncentraciju HSP-90 kod skupine obrađene Res + HT ($p < 0,001$) i kod skupine obrađene Res + Cis + HT ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 15). Smanjene koncentracije HSP-90 mogu ukazivati na dokidanje mehanizama otpornosti i smanjene toksičnosti citostatika primjenom resveratrola.

U hipoksičnim uvjetima brojne stanične linije (maligne i primarne) *in vitro* imaju povećane razine mRNA i proteina HDAC1, HDAC2 i HDAC3. Supresijom p53 i pVHL dolazi do prekomjerne ekspresije HIF-1 α i VEGF, a suprotan učinak se dobije primjenom trihostatina A (TSA), inhibitora HDAC-a, *in vitro* i *in vivo*. HDAC reguliraju aktivnost HIF-1 α neizravno u hipoksičnim uvjetima (Kim i sur., 2001). U liječenju tumora inhibitorima HDAC-a, antiangiogeni učinak postiže se utišavanjem proangiogenih gena poput gena za čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF) i/ili gena za endotelnu sintazu dušikovog oksida (eNOS) (Zupkovitz i sur., 2006). Inhibitori HDAC-a potiču apoptozu stanica raka jajnika otpornih na cisplatinu (Muscolini i sur., 2008). Kim i suradnici (2012) su potvrdili korelaciju prekomjerne ekspresije HDAC i smanjene osjetljivosti na cisplatinu na SKOV3 i OVCAR3 staničnim linijama karcinoma jajnika. HDAC reguliraju gen *HtrA1*, koji ima ulogu u razvijanju otpornosti na cisplatinu, a ciljanjem puta HDAC/RXR/HtrA1 može se dokinuti otpornost na cisplatinu (Wang i sur., 2020). Naši rezultati su pokazali statistički značajno nižu razinu aktivnosti HDAC-a kod skupine obrađene Cis + HT ($p < 0,01$) i kod skupine obrađene Res + Cis + HT ($p < 0,01$) u odnosu na skupinu obrađenu Res + HT (Slika 16).

Najbolje rezultate je dala primjena resveratrola i cisplatine u hipertemalnim uvjetima i možemo zaključiti da ova kombinacija ima dobar terapijski potencijal.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata iznosimo zaključke kako slijedi:

- Cisplatina povećava preživljenje miševa u odnosu na kontrolu, s i bez treatmenta resveratrolom, u hipertermalnim uvjetima.
- Najveća inhibicija rasta tumora postignuta je kod miševa obrađenih cisplatinom u hipertermalnim uvjetima.
- Smanjena koncentracija MMP-2 ukazuje na mogući antiangiogeni učinak resveratrola dok povećana razina MMP-9 vjerojatno ukazuje na nastanak angiostatina koji vodi inhibiciji čimbenika angiogeneze VEGF.
- Tumori obrađeni cisplatinom, s ili bez resveratrola, pokazuju povećanu koncentraciju NO i smanjenu koncentraciju Arg-1 što ukazuje na polarizaciju makrofaga prema fenotipu M1 i povećanu citotoksičnu i tumorocidnu aktivnost makrofaga na tumorske stanice.
- Smanjene koncentracije HSP-70 i HSP-90 u skupini obrađenoj resveratrolom i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima pogoduju smrti tumorskih stanica i dokidanju rezistencije te jačanju imunskog odgovora efektorskih T i NK stanica.
- Primjena resveratrola i cisplatine te cisplatine u hipertermalnim uvjetima učinkovito inhibira aktivnost Arg-1, reaktivira imunski sustav i povećava preživljavanje miševa.
- Višemodalni pristup s hipertermijom, resveratrolom i cisplatinom jest učinkovit pristup u terapiji tumora; uspješno inhibira rast tumora te dokida otpornost tumorskih stanica na cisplatinu kroz modulaciju aktivnosti HDAC-a i razine HSP-70 i HSP-90 te tako doprinosi povećanju životnog vijeka miševa.

7. LITERATURA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.H., Pillai, S. (2015): Cellular and Molecular Immunology Elsevier, Saunders.
- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y. (2004): Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* 24: 2783–2840.
- Albakova, Z., Armeev, G.A., Kanevskiy, L.M., Kovalenko, E.I., Sapozhnikov, A.M. (2020): HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells* 9: E587.
- Albakova, Z., Mangasarova, Y., Sapozhnikov, A. (2021): Heat Shock Proteins in Lymphoma Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 12.
- Allavena, P., Mantovani, A. (2012): Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical and Experimental Immunology* 167: 195–205.
- Alobaedi, O.H., Talib, W.H., Bashedi, I.A. (2017): Antitumor effect of thymoquinone combined with resveratrol on mice transplanted with breast cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10: 400–408.
- Arany, I., Safirstein, R.L. (2003): Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology* 23: 460–464.
- Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Farkhondeh, T., Samarghandian, S. (2020): Resveratrol targeting the Wnt signaling pathway: A focus on therapeutic activities. *Journal of Cellular Physiology* 235: 4135–4145.
- Balkwill, F. (2004): Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer* 4: 540–550.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2007): *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York.

- Bingle, L., Brown, N.J., Lewis, C.E. (2002): The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of Pathology* 196: 254–265.
- Bivik, C., Rosdahl, I., Ollinger, K. (2007): Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis* 28: 537–544.
- Blachere, N.E., Li, Z., Chandawarkar, R.Y., Suto, R., Jaikaria, N.S., Basu, S., Udono, H., Srivastava, P.K. (1997): Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 186: 1315–1322.
- Bogdan, C. (2001): Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2: 907–916.
- Borges, T., Wieten, L., van Herwijnen, M., Broere, F., Van Der Zee, R., Bonorino, C., Van Eden, W. (2012): The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Frontiers in Immunology* 3.
- Brozovic, A., Ambriović-Ristov, A., Osmak, M. (2010): The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology* 40: 347–359.
- Buhrmann, C., Yazdi, M., Popper, B., Shayan, P., Goel, A., Aggarwal, B.B., Shakibaei, M. (2019): Evidence that TNF- β induces proliferation in colorectal cancer cells and resveratrol can down-modulate it. *Experimental Biology and Medicine* 244: 1–12.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2002): Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3337–3340.
- Cao, Z., Fang, J., Xia, C., Shi, X., Jiang, B.-H. (2004): trans-3,4,5'-Trihydroxystibene Inhibits Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Ovarian Cancer Cells. *Clinical Cancer Research* 10: 5253–5263.
- Carter, L.G., D'Orazio, J.A., Pearson, K.J. (2014): Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer* 21: R209–R225.

- Chalkiadaki, A., Guarente, L. (2015): The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nature Reviews Cancer* 15: 608–624.
- Ciocca, D.R., Calderwood, S.K. (2005): Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones* 10: 86–103.
- Conklin, K.A. (2004): Cancer chemotherapy and antioxidants. *The Journal of Nutrition* 134: 3201S-3204S.
- Cook, K.L., Soto-Pantoja, D.R., Clarke, P.A.G., Cruz, M.I., Zwart, A., Wärrri, A., Hilakivi-Clarke, L., Roberts, D.D., Clarke, R. (2016): Endoplasmic Reticulum Stress Protein GRP78 Modulates Lipid Metabolism to Control Drug Sensitivity and Antitumor Immunity in Breast Cancer. *Cancer Research* 76: 5657–5670.
- Czystowska-Kuzmicz, M., Sosnowska, A., Nowis, D., Ramji, K., Szajnik, M., Chlebowska-Tuz, J., Wolinska, E., Gaj, P., Grazul, M., Pilch, Z., Zerrouqi, A., Graczyk-Jarzynka, A., Soroczynska, K., Cierniak, S., Koktysz, R., Elishaev, E., Gruca, S., Stefanowicz, A., Blaszczyk, R., Borek, B., Gzik, A., Whiteside, T., Golab, J. (2019): Small extracellular vesicles containing arginase-1 suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma. *Nature Communications* 10: 3000.
- Dasari, S., Tchounwou, P.B. (2014): Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740: 364–378.
- Daugaard, M., Kirkegaard-Sørensen, T., Ostensfeld, M.S., Aaboe, M., Høyer-Hansen, M., Orntoft, T.F., Rohde, M., Jäättelä, M. (2007): Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer. *Cancer Research* 67: 2559–2567.
- Davatgaran-Taghipour, Y., Masoomzadeh, S., Farzaei, M.H., Bahramsoltani, R., Karimi-Soureh, Z., Rahimi, R., Abdollahi, M. (2017): Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. *International Journal of Nanomedicine* 12: 2689–2702.

- Davies, M.S., Berners-Price, S.J., Hambley, T.W. (2000): Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of monoaquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA. *Inorganic Chemistry* 39: 5603–5613.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L. (1995): Review ■ Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles. *The Neuroscientist* 1: 7–18.
- De Wever, O., Mareel, M. (2003): Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *The Journal of Pathology* 200: 429–447.
- Delgoffe, G.M., Kole, T.P., Zheng, Y., Zarek, P.E., Matthews, K.L., Xiao, B., Worley, P.F., Kozma, S.C., Powell, J.D. (2009): The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* 30: 832–844.
- DeNardo, D.G., Ruffell, B. (2019): Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology* 19: 369–382.
- Deroanne, C.F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clause, N., Blacher, S., Verdin, E., Foidart, J.-M., Nusgens, B.V., Castronovo, V. (2002): Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* 21: 427–436.
- Duhan, V., Joshi, N., Nagarajan, P., Upadhyay, P. (2012): Protocol for long duration whole body hyperthermia in mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*: e3801.
- Dunne, M., Regenold, M., Allen, C. (2020): Hyperthermia can alter tumor physiology and improve chemo- and radio-therapy efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 163–164: 98–124.
- El-Azab, M., Hishe, H., Moustafa, Y., El-Awady, E.-S. (2011): Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *European Journal of Pharmacology* 652: 7–14.
- Fiddler, R.N. (1977): Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 60: 594–599.

- Florea, A.-M., Büsselberg, D. (2011): Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 3: 1351–1371.
- Folgueras, A.R., Pendás, A.M., Sánchez, L.M., López-Otín, C. (2004): Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *The International Journal of Developmental Biology* 48: 411–424.
- Fuertes, M.A., Alonso, C., Pérez, J.M. (2003): Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews* 103: 645–662.
- Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., Pérez, J.M. (2002): Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents* 2: 539–551.
- Fujiwara, N., Kobayashi, K. (2005): Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy* 4: 281–286.
- Fukumura, D., Kashiwagi, S., Jain, R.K. (2006): The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer* 6: 521–534.
- Gagliano, N., Moscheni, C., Torri, C., Magnani, I., Bertelli, A.A., Gioia, M. (2005): Effect of resveratrol on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) on human cultured glioblastoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 59: 359–364.
- Gameiro, S.R., Malamas, A.S., Tsang, K.Y., Ferrone, S., Hodge, J.W. (2016): Inhibitors of histone deacetylase 1 reverse the immune evasion phenotype to enhance T-cell mediated lysis of prostate and breast carcinoma cells. *Oncotarget* 7: 7390–7402.
- Gannon, P.O., Godin-Ethier, J., Hassler, M., Delvoe, N., Aversa, M., Poisson, A.O., Péant, B., Alam Fahmy, M., Saad, F., Lapointe, R., Mes-Masson, A.-M. (2010): Androgen-Regulated Expression of Arginase 1, Arginase 2 and Interleukin-8 in Human Prostate Cancer. *PLoS ONE* 5: e12107.
- Garret, R.H., Grisham, C.M. (2013): *Biochemistry*. Belmont, Brooks/Cole, Cengage Learning.

- Garrido, C., Schmitt, E., Candé, C., Vahsen, N., Parcellier, A., Kroemer, G. (2003): HSP27 and HSP70: Potentially Oncogenic Apoptosis Inhibitors. *Cell Cycle* 2: 578–583.
- Geller, R., Taguwa, S., Frydman, J. (2012): Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823: 698–706.
- Giraud, E., Inoue, M., Hanahan, D. (2004): An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 114: 623–633.
- Griess, P. (1879): Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“.: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 12: 426–428.
- Gross, C., Schmidt-Wolf, I.G.H., Nagaraj, S., Gastpar, R., Ellwart, J., Kunz-Schughart, L.A., Multhoff, G. (2003): Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress & Chaperones* 8: 348–360.
- Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N.F., Plüddemann, A., Charles, K., Gordon, S., Balkwill, F.R. (2006): Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176: 5023–5032.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.
- Harikumar, K.B., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G., Diagaradjane, P., Anand, P., Pandey, M.K., Gelovani, J., Krishnan, S., Guha, S., Aggarwal, B.B. (2010): Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *International Journal of Cancer* 127: 257–268.
- Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324–332.

- Huang, T., Chen, S., Han, H., Li, H., Huang, Z., Zhang, J., Yin, Q., Wang, X., Ma, X., Dai, P., Duan, D., Zou, F., Chen, X. (2014): Expression of Hsp90 α and cyclin B1 were related to prognosis of esophageal squamous cell carcinoma and keratin pearl formation. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7: 1544–1552.
- Huber, K., Superti-Furga, G. (2011): After the grape rush: sirtuins as epigenetic drug targets in neurodegenerative disorders. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 3616–3624.
- Huo, Y., Yang, D., Lai, K., Tu, J., Zhu, Y., Ding, W., Yang, S. (2022): Antioxidant Effects of Resveratrol in Intervertebral Disk. *Journal of Investigative Surgery: The Official Journal of the Academy of Surgical Research* 35: 1135–1144.
- Hurst, J.W., Glinski, J.A., Miller, K.B., Davey, M.H., Stuart, D.A. (2008): Survey of the trans-Resveratrol and trans-Piceid Content of Cocoa-Containing and Chocolate Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(18):8374-8378
- van Iersel, M.L.P.S., Ploemen, J.-P.H.T.M., Struik, I., van Amersfoort, C., Keyzer, A.E., Schefferlie, J.G., van Bladeren, P.J. (1996): Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by α,β -unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal. *Chemico-Biological Interactions* 102: 117–132.
- Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Oguro, S., Shimada, K., Kosuge, T., Zavada, J., Kanai, Y., Hiraoka, N. (2013): Arginase II expressed in cancer-associated fibroblasts indicates tissue hypoxia and predicts poor outcome in patients with pancreatic cancer. *PloS One* 8: e55146.
- Jäättelä, M. (1999): Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of Medicine* 31: 261–271.
- Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R., Garrido, C. (2013): Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters* 332: 275–285.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., Kim, K.W. (2002): Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111: 709–720.

- Ji, Q., Liu, X., Fu, X., Zhang, L., Sui, H., Zhou, L., Sun, J., Cai, J., Qin, J., Ren, J., Li, Q. (2013): Resveratrol Inhibits Invasion and Metastasis of Colorectal Cancer Cells via MALAT1 Mediated Wnt/ β -Catenin Signal Pathway. *PLOS ONE* 8: e78700.
- Ji, Q., Liu, X., Han, Z., Zhou, L., Sui, H., Yan, L., Jiang, H., Ren, J., Cai, J., Li, Q. (2015): Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer* 15: 97.
- Jiang, W.G., Sanders, A.J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S.K., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P., Sliva, D., Subbarayan, P.R., Sarkar, M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A.G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S.S., Ye, L., Helferich, W.G., Yang, X., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Azmi, A.S., Keith, W.N., Bilsland, A., Bhakta, D., Halicka, D., Newshean, S., Pantano, F., Santini, D. (2015): Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology* 35 Suppl: S244–S275.
- Jukić, S., Jukić, D., Nola, M. (2002): Neoplazme (novotvorine). U: Jukić S, Damjanov I, ur. Opća patologija, Zagreb, Medicinska naklada, 129-161
- Kenny, H.A., Kaur, S., Coussens, L.M., Lengyel, E. (2008): The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 1367–1379.
- Kerr, K.M., Johnson, S.K., King, G., Kennedy, M.M., Weir, J., Jeffrey, R. (1998): Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? *Histopathology* 33: 55–63.
- Khan, F.H., Dervan, E., Bhattacharyya, D.D., McAuliffe, J.D., Miranda, K.M., Glynn, S.A. (2020): The Role of Nitric Oxide in Cancer: Master Regulator or NOt? *International Journal of Molecular Sciences* 21: 9393.
- Kim, D.-W., Min, H.S., Lee, K.-H., Kim, Y.J., Oh, D.-Y., Jeon, Y.K., Lee, S.-H., Im, S.-A., Chung, D.H., Kim, Y.T., Kim, T.-Y., Bang, Y.-J., Sung, S.W., Kim, J.H., Heo, D.S. (2008): High tumour islet macrophage infiltration correlates with improved patient survival but not with

- EGFR mutations, gene copy number or protein expression in resected non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 98: 1118–1124.
- Kim, M.-G., Pak, J.H., Choi, W.H., Park, J.-Y., Nam, J.-H., Kim, J.-H. (2012): The relationship between cisplatin resistance and histone deacetylase isoform overexpression in epithelial ovarian cancer cell lines. *Journal of Gynecologic Oncology* 23: 182–189.
- Kim, M.S., Kwon, H.J., Lee, Y.M., Baek, J.H., Jang, J.E., Lee, S.W., Moon, E.J., Kim, H.S., Lee, S.K., Chung, H.Y., Kim, C.W., Kim, K.W. (2001): Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Medicine* 7: 437–443.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U. (2013): Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* 82: 323–355.
- Kim, Y.J., Chung, S.O., Kim, J.K., Park, S.U. (2017): Recent studies on resveratrol and its biological and pharmacological activity. *EXCLI Journal* 16: 602–608.
- Kingston, H.M. (2002): *ABC of Clinical Genetics*, Hoboken, Blackwell Publishing Ltd.
- Kong, M.J., Bak, S.H., Han, K.-H., Kim, J.I., Park, J.-W., Park, K.M. (2019): Fragmentation of kidney epithelial cell primary cilia occurs by cisplatin and these cilia fragments are excreted into the urine. *Redox Biology* 20: 38–45.
- Kong, M.J., Han, S.J., Kim, J.I., Park, J.-W., Park, K.M. (2018): Mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase deficiency increases cisplatin-induced oxidative damage in the kidney tubule cells. *Cell Death & Disease* 9: 488.
- Kotha, A., Sekharam, M., Cilenti, L., Siddiquee, K., Khaled, A., Zervos, A.S., Carter, B., Turkson, J., Jove, R. (2006): Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 621–629.

- Krecicki, T., Zalesska-Krecicka, M., Jelen, M., Szkudlarek, T., Horobiowska, M. (2001): Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* 26: 469–472.
- Kulka, L.A.M., Fangmann, P.-V., Panfilova, D., Olzscha, H. (2020): Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
- Kumar, B., Yadav, A., Hideg, K., Kuppusamy, P., Teknos, T.N., Kumar, P. (2014): A novel curcumin analog (H-4073) enhances the therapeutic efficacy of cisplatin treatment in head and neck cancer. *PloS One* 9: e93208.
- Kutil, Z., Temml, V., Maghradze, D., Pribylova, M., Dvorakova, M., Schuster, D., Vanek, T., Landa, P. (2014): Impact of Wines and Wine Constituents on Cyclooxygenase-1, Cyclooxygenase-2, and 5-Lipoxygenase Catalytic Activity. *Mediators of Inflammation* 2014 1–8.
- Li, X.-F., Hua, T., Li, Y., Tian, Y.-J., Huo, Y., Kang, S. (2021): The HSP70 gene predicts prognosis and response to chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Annals of Translational Medicine* 9: 806.
- Li, Z., Chen, X., Liu, G., Li, J., Zhang, J., Cao, Y., Miao, J. (2021): Antioxidant Activity and Mechanism of Resveratrol and Polydatin Isolated from Mulberry (*Morus alba* L.). *Molecules (Basel, Switzerland)* 26: 7574.
- Liang, D., Kong, X., Sang, N. (2006): Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on HIF-1. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5: 2430–2435.
- Lin, X., Okuda, T., Holzer, A., Howell, S.B. (2002): The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Pharmacology* 62: 1154–1159.
- Longchar, A., Prasad, S.B. (2015): Biochemical changes associated with ascorbic acid–cisplatin combination therapeutic efficacy and protective effect on cisplatin-induced toxicity in tumor-bearing mice. *Toxicology Reports* 2: 489–503.

- Lowe, M.M., Boothby, I., Clancy, S., Ahn, R.S., Liao, W., Nguyen, D.N., Schumann, K., Marson, A., Mahuron, K.M., Kingsbury, G.A., Liu, Z., Munoz Sandoval, P., Rodriguez, R.S., Pauli, M.L., Taravati, K., Arron, S.T., Neuhaus, I.M., Harris, H.W., Kim, E.A., Shin, U.S., Krummel, M.F., Daud, A., Scharschmidt, T.C., Rosenblum, M.D. (2019): Regulatory T cells use arginase 2 to enhance their metabolic fitness in tissues. *JCI insight* 4: 129756.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- Luo, W., Sun, W., Taldone, T., Rodina, A., Chiosis, G. (2010): Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration* 5: 24.
- Ma, Z., Lian, J., Yang, M., Wuyang, J., Zhao, C., Chen, W., Liu, C., Zhao, Q., Lou, C., Han, J., Zhang, Y. (2019): Overexpression of Arginase-1 is an indicator of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Pathology, Research and Practice* 215: 152383.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25: 677–686.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. (2002): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23: 549–555.
- Mbofung, R.M., McKenzie, J.A., Malu, S., Zhang, Min, Peng, W., Liu, C., Kuiatse, I., Tieu, T., Williams, L., Devi, S., Ashkin, E., Xu, C., Huang, L., Zhang, Minying, Talukder, A.H., Tripathi, S.C., Khong, H., Satani, N., Muller, F.L., Roszik, J., Heffernan, T., Allison, J.P., Lizee, G., Hanash, S.M., Proia, D., Amaria, R., Davis, R.E., Hwu, P. (2017): HSP90 inhibition enhances cancer immunotherapy by upregulating interferon response genes. *Nature Communications* 8: 451.
- McCarthy, M.M., Pick, E., Kluger, Y., Gould-Rothberg, B., Lazova, R., Camp, R.L., Rimm, D.L., Kluger, H.M. (2008): HSP90 as a marker of progression in melanoma. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 19: 590–594.

- McCready, J., Sims, J.D., Chan, D., Jay, D.G. (2010): Secretion of extracellular hsp90 α via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10: 294.
- McGinity, C.L., Palmieri, E.M., Somasundaram, V., Bhattacharyya, D.D., Ridnour, L.A., Cheng, R.Y.S., Ryan, A.E., Glynn, S.A., Thomas, D.D., Miranda, K.M., Anderson, S.K., Lockett, S.J., McVicar, D.W., Wink, D.A. (2021): Nitric Oxide Modulates Metabolic Processes in the Tumor Immune Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 7068.
- Mocellin, S., Bronte, V., Nitti, D. (2007): Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Medicinal Research Reviews* 27: 317–352.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C., Massie, B. (1997): Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 17: 5317–5327.
- Murray, P.J. (2017): Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology* 79: 541–566.
- Muscolini, M., Cianfrocca, R., Sajeve, A., Mozzetti, S., Ferrandina, G., Costanzo, A., Tuosto, L. (2008): Trichostatin A up-regulates p73 and induces Bax-dependent apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 1410–1419.
- Mussai, F., De Santo, C., Abu-Dayyeh, I., Booth, S., Quek, L., McEwen-Smith, R.M., Qureshi, A., Dazzi, F., Vyas, P., Cerundolo, V. (2013): Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood* 122: 749–758.
- Mussai, F., Egan, S., Hunter, S., Webber, H., Fisher, J., Wheat, R., McConville, C., Sbirkov, Y., Wheeler, K., Bendle, G., Petrie, K., Anderson, J., Chesler, L., De Santo, C. (2015): Neuroblastoma Arginase Activity Creates an Immunosuppressive Microenvironment That Impairs Autologous and Engineered Immunity. *Cancer Research* 75: 3043–3053.
- Nagaraju, G.P., Long, T.-E., Park, W., Landry, J.C., Taliaferro-Smith, L., Farris, A.B., Diaz, R., El-Rayes, B.F. (2015): Heat shock protein 90 promotes epithelial to mesenchymal

- transition, invasion, and migration in colorectal cancer: Functional inhibition of HSP90 inhibits EMT. *Molecular Carcinogenesis* 54: 1147–1158.
- Nagase, H., Woessner, J.F. (1999): Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 21491–21494.
- Nan, J., Xing, Y., Hu, B., Tang, J., Dong, H., He, Y., Ruan, D., Ye, Q., Cai, J., Ma, X., Chen, J., Cai, X., Lin, Z., Wu, X., Li, X. (2018): Endoplasmic reticulum stress induced LOX-1+ CD15+ polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma. *Immunology* 154: 144–155.
- Nelson, S., Kolls, J.A. (2002): Alcohol, host defence and society. *Nature Reviews Immunology* 2: 205-209
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., Kojiro, M. (2006): Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* 2: 213–219.
- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Høyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., Jäättelä, M. (2004): Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of Experimental Medicine* 200: 425–435.
- Ono, K., Sogawa, C., Kawai, H., Tran, M.T., Taha, E.A., Lu, Y., Oo, M.W., Okusha, Y., Okamura, H., Ibaragi, S., Takigawa, M., Kozaki, K.-I., Nagatsuka, H., Sasaki, A., Okamoto, K., Calderwood, S.K., Eguchi, T. (2020): Triple knockdown of CDC37, HSP90-alpha and HSP90-beta diminishes extracellular vesicles-driven malignancy events and macrophage M2 polarization in oral cancer. *Journal of Extracellular Vesicles* 9: 1769373.
- Oršolić, N., Car, N. (2014): Quercetin and hyperthermia modulate cisplatin-induced DNA damage in tumor and normal tissues in vivo. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35: 6445–6454.
- Oršolić, N., Odeh, D., Jembrek, M.J., Knežević, J., Kučan, D. (2020): Interactions between Cisplatin and Quercetin at Physiological and Hyperthermic Conditions on Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25: E3271.

- Pan, M., Reid, M.A., Lowman, X.H., Kulkarni, R.P., Tran, T.Q., Liu, X., Yang, Y., Hernandez-Davies, J.E., Rosales, K.K., Li, H., Hugo, W., Song, C., Xu, X., Schones, D.E., Ann, D.K., Gradinaru, V., Lo, R.S., Locasale, J.W., Kong, M. (2016): Regional glutamine deficiency in tumours promotes dedifferentiation through inhibition of histone demethylation. *Nature Cell Biology* 18: 1090–1101.
- Pecorino, L. (2012): *Molecular biology of cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press, Oxford
- Penumathsa, S.V., Maulik, N. (2009): Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 87: 275–286.
- Pick, E., Kluger, Y., Giltane, J.M., Moeder, C., Camp, R.L., Rimm, D.L., Kluger, H.M. (2007): High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Research* 67: 2932–2937.
- Pittayapruerk, P., Meephanan, J., Prapapan, O., Komine, M., Ohtsuki, M. (2016): Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 17: E868.
- Pockley, A.G. (2003): Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet* 362: 469–476.
- Qian, B.-Z., Pollard, J.W. (2010): Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141: 39–51.
- Ren, B., Kwah, M.X.-Y., Liu, C., Ma, Z., Shanmugam, M.K., Ding, L., Xiang, X., Ho, P.C.-L., Wang, L., Ong, P.S., Goh, B.C. (2021): Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Letters* 515: 63–72.
- Reunanen, N., Kähäri, V. (2013): *Matrix metalloproteinases in cancer cell invasion*. Landes Bioscience.

- Rodríguez, P.C., Ochoa, A.C. (2008): Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews* 222: 180–191.
- Saenz-Santamaría, C.M., McNutt, S.N., Bogdany, J.K., Shea, C.R. (1995): p53 Expression Is Rare in Cutaneous Melanomas. *The American Journal of Dermatopathology* 17: 344–349.
- Sahin, E., Haubenwallner, S., Kuttke, M., Kollmann, I., Halfmann, A., Dohnal, A.M., Dohnal, A.B., Chen, L., Cheng, P., Hoesel, B., Einwallner, E., Brunner, J., Kral, J.B., Schrottmaier, W.C., Thell, K., Saferding, V., Blüml, S., Schabbauer, G. (2014): Macrophage PTEN regulates expression and secretion of arginase I modulating innate and adaptive immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193: 1717–1727.
- Sbardella, D., Fasciglione, G.F., Gioia, M., Ciaccio, C., Tundo, G.R., Marini, S., Coletta, M. (2012): Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular Aspects of Medicine* 33: 119–208.
- Shaito, A., Posadino, A.M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Al-Mohannadi, A., Abdel-Rahman, W.M., Eid, A.H., Nasrallah, G.K., Pintus, G. (2020): Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences* 21: E2084.
- Shen, D.-W., Pouliot, L.M., Hall, M.D., Gottesman, M.M. (2012): Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews* 64: 706–721.
- Singh, B.N., Zhang, G., Hwa, Y.L., Li, J., Dowdy, S.C., Jiang, S.-W. (2010): Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Review of Anticancer Therapy* 10: 935–954.
- Srivastava, P. (2002): Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annual Review of Immunology* 20: 395–425.

- Stack, M.S., Ellerbroek, S.M., Fishman, D.A. (1998): The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Oncology* 12: 569–576.
- Stangl, S., Gehrman, M., Riegger, J., Kuhs, K., Riederer, I., Sievert, W., Hube, K., Mocikat, R., Dressel, R., Kremmer, E., Pockley, A.G., Friedrich, L., Vigh, L., Skerra, A., Multhoff, G. (2011): Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 733–738.
- Su, J.-L., Yang, C.-Y., Zhao, M., Kuo, M.-L., Yen, M.-L. (2007): Forkhead Proteins Are Critical for Bone Morphogenetic Protein-2 Regulation and Anti-tumor Activity of Resveratrol *. *Journal of Biological Chemistry* 282: 19385–19398.
- Sun, Y., Zhou, Q.-M., Lu, Y.-Y., Zhang, H., Chen, Q.-L., Zhao, M., Su, S.-B. (2019): Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecules* 24: 1131.
- Taby, R., Issa, J.-P.J. (2010): Cancer epigenetics. *CA: a cancer journal for clinicians* 60: 376–392.
- Taradi, M. (2010): Imunoreakcija na tumor. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, ur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 362–387.
- Trimmer, E.E., Essigmann, J.M. (1999): Cisplatin. *Essays in Biochemistry* 34: 191–211.
- Tsutsumi, S., Scroggins, B., Koga, F., Lee, M.-J., Trepel, J., Felts, S., Carreras, C., Neckers, L. (2008): A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. *Oncogene* 27: 2478–2487.
- Tugal, D., Liao, X., Jain, M.K. (2013): Transcriptional control of macrophage polarization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33: 1135–1144.
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T.H.M. (2004): Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert

- immunity to (myco)bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4560–4565.
- Viallard, C., Larrivée, B. (2017): Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* 20: 409–426.
- Vian, M.A., Tomao, V., Gallet, S., Coulomb, P.O., Lacombe, J.M. (2005): Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using chromolith columns. *Journal of Chromatography. A* 1085: 224–229.
- Vostakolaei, M.A., Hatami-Baroogh, L., Babaei, G., Molavi, O., Kordi, S., Abdolalizadeh, J. (2021): Hsp70 in cancer: A double agent in the battle between survival and death. *Journal of Cellular Physiology* 236: 3420–3444.
- Wang, K., Chen, Z., Shi, J., Feng, Y., Yu, M., Sun, Y., Zhuang, Q., Liang, B., Luo, G., Xu, X., Fan, M. (2020): Resveratrol inhibits the tumor migration and invasion by upregulating TET1 and reducing TIMP2/3 methylation in prostate carcinoma cells. *The Prostate* 80: 977–985.
- Wang, N., Liang, H., Zen, K. (2014): Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in Immunology* 5: 614.
- Wang, Y., Tian, J., Tang, X., Rui, K., Tian, X., Ma, J., Ma, B., Xu, H., Lu, L., Wang, S. (2016): Exosomes released by granulocytic myeloid-derived suppressor cells attenuate DSS-induced colitis in mice. *Oncotarget* 7: 15356–15368.
- Whitesell, L., Lindquist, S.L. (2005): HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer* 5: 761–772.
- Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., Oehme, I. (2009): HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters* 277: 8–21.
- Woan, K.V., Lienlaf, M., Perez-Villaroel, P., Lee, C., Cheng, F., Knox, T., Woods, D.M., Barrios, K., Powers, J., Sahakian, E., Wang, H.W., Canales, J., Marante, D., Smalley, K.S.M.,

- Bergman, J., Seto, E., Kozikowski, A., Pinilla-Ibarz, J., Sarnaik, A., Celis, E., Weber, J., Sotomayor, E.M., Villagra, A. (2015): Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation. *Molecular Oncology* 9: 1447–1457.
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W. (2013): Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496: 445–455.
- Xiong, W., Yin, A., Mao, X., Zhang, W., Huang, H., Zhang, X. (2016): Resveratrol suppresses human glioblastoma cell migration and invasion via activation of RhoA/ROCK signaling pathway. *Oncology Letters* 11: 484–490.
- Xu, J., Gewirtz, D.A. (2022): Is Autophagy Always a Barrier to Cisplatin Therapy? *Biomolecules* 12: 463.
- Yan, C., Sun, C., Lu, D., Zhao, T., Ding, X., Zamir, I., Tang, M., Shao, C., Zhang, F. (2022): Estimation of associations between MMP9 gene polymorphisms and breast cancer: Evidence from a meta-analysis. *The International Journal of Biological Markers* 37: 13–20.
- Yar, A.S., Menevse, S., Alp, E., Helvacioğlu, F., Take, G. (2010): The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys. *Molecular Biology Reports* 37: 2323–2331.
- Youssef, I., Amin, N.P. (2022): Hyperthermia for Chest Wall Recurrence. *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.
- Žáčková, M., Moučková, D., Lopotová, T., Ondráčková, Z., Klamová, H., Moravcová, J. (2013): Hsp90 — a potential prognostic marker in CML. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 50: 184–189.
- Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., Mier, J., Ochoa, A.C. (2005): Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Research* 65: 3044–3048.

Zhou, J., Schmid, T., Frank, R., Brüne, B. (2004): PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 13506–13513.

Zupkovitz, G., Tischler, J., Posch, M., Sadzak, I., Ramsauer, K., Egger, G., Grausenburger, R., Schweifer, N., Chiocca, S., Decker, T., Seiser, C. (2006): Negative and Positive Regulation of Gene Expression by Mouse Histone Deacetylase 1. *Molecular and Cellular Biology* 26: 7913–7928.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27.08.1996. godine u Offenbachu na Majni, Njemačka. Nakon završenog općeg smjera Gimnazije Mostar u Mostaru, 2015. godine upisujem preddiplomski studij biologije na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru, BiH. Zvanje prvostupnice biologije stječem 2018. godine te iste godine upisujem diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, RH. Laboratorijsku stručnu praksu sam odradila 2019. godine na Zavodu za animalnu fiziologiju PMF-a. U akademskoj godini 2021./2022. sudjelovala sam u Erasmus+ programu PROMISE projekta, u kojem sam stekla vještine i znanja vezana uz P4 medicinu (personalizirana, participatorna, prediktivna i preventivna medicina). Govorim hrvatski, engleski i njemački jezik.