

# ANTIANGIOGENI POTENCIJAL SUSTAVNE HIPERTERMIJE, CISPLATINE I NANOKRISTALA RESVERATROLA U INHIBICIJI RASTA EHRLICHOVOG SOLIDNOG KARCINOMA U MIŠA

---

Kučan, Darko

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:539705>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

DARKO KUČAN

**ANTIANGIOGENI POTENCIJAL  
SUSTAVNE HIPERTERMIJE, CISPLATINE  
I NANOKRISTALA RESVERATROLA U  
INHIBICIJI RASTA EHRLICHOVOG  
SOLIDNOG KARCINOMA U MIŠA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE

DARKO KUČAN

**ANTIANGIOGENIC POTENTIAL OF  
SYSTEMIC HYPERTHERMIA, CISPLATIN  
AND RESVERATROL NANOCRYSTALS IN  
INHIBITING THE GROWTH OF EHRlich  
SOLID CARCINOMA IN MICE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023.

Ovaj je doktorski rad izrađen na *Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu*, pod vodstvom *prof.dr.sc. Nade Oršolić i dr.sc. Snježane Ramić*, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija *Biologije* pri *Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*.

## INFORMACIJE O MENTORU

Dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor u trajnom zvanju u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, rođena je 1960. godine u Tolisi, (Orašje), BiH gdje je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 1984. god. na smjeru Biologija s ekologijom, te 1985. god. na profesorskom smjeru Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Magistrirala je na istom fakultetu 1991. god. na smjeru "Molekularna biologija", dok je 1999. god. doktorirala s radom naslova "Protutumorski učinci pčelinjeg otrova i propolis" (voditelj prof. dr. I. Bašić) na smjeru "Molekularna biologija". Svoja znanja i vještine je usavršavala u MD Anderson Cancer Center (Department of Leukemia), Division of Cancer Medicine, Houston, Texas, SAD gdje je boravila od 2001-2002.

Nositelj je sljedećih kolegija na preddiplomskom, diplomskom, integriranom preddiplomskom i diplomskom sveučilišnom studiju, te postdiplomskom: Animalna fiziologija; Laboratorijske životinje u biološkim istraživanjima; Biologija tumora; Imunologija; Imunologija i imunogenetika; Komparativna imunologija; Imunologija tumora i metastaza; Opća onkologija; Molekularna Onkologija; Metode u imunologiji; Fiziologija oksidativnog stresa u ljudi i životinja; Fiziološki mehanizmi toksina; Kemoprevencija i bioterapija tumora, Mutageni i antimutageni, Animalni modeli glodavaca u eksperimentalnoj onkologiji.

Voditelj je 62 završna rada; 233 diplomska rada; 7 radova za Rektorovu nagradu; 6 magistarskih radova; 1 specijalističkog rada, 21 doktorskog rada i 4 doktorska rada koji su u tijeku izrade. Nositelj, voditelj ili suradnik je na međunarodnim (3) i nacionalnim (14) projektima. Obavljala je brojne funkcije na Zavodu za animalnu fiziologiju uključujući i predstojnicu Zavoda.

Dr. sc. Nada Oršolić spada među 2% najcitatiranih svjetskih znanstvenika. Rezultate svoga rada objavila je u 217 cjelovitih znanstvenih radova od čega su 20 poglavlja u knjigama, 19 znanstvenih radova recenziranih i objavljenih u zborniku radova s međunarodnog znanstvenog skupa, 8 znanstveno popularizacijskih radova, 8 stručnih i 14 članaka u popularizaciji struke. Sudjelovala je na brojnim znanstvenim skupovima s 270 znanstvenih sažetaka (116 sažetaka s domaćih i 154 sažetaka s međunarodnih kongresa). Editor je knjige: "Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine" (Editors: Oršolić N. and Bašić I). Ethnopharmacology- Review Book, Research Signpost, India ISBN:978-81-7895-357-1, te autor ili ko-autor 4 skripte.

Član je Hrvatskog imunološkog društva, Hrvatskog fiziološkog društva, Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama i Hrvatskog biološkog društva. Također je član uredničkog tima za časopise: Journal of ApiProduct and ApiMedical Science; Bioinfo Publications, Advances in Bioscience and Clinical Medicine; Molecular and Experimental Biology in Medicine. Gost urednik je časopisa Molecules za izdanje "Bee Products: Recent Progress in Health Benefits Studies" i "Bee Products as Natural Antioxidants in Disease and Health", te časopisa International Journal of Molecular Sciences za izdanje "Efficacy of Flavonoids in Chronic Diseases" te u tijeku „Targeting Oxidative Stress in Disease“.

## INFORMACIJE O KOMENTORU

Dr. sc. Snježana Ramić, znanstveni suradnik, rođena je 1969. godine u Vinkovcima RH. U Zagrebu je završila osnovnu i srednju školu te diplomirala na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta smjer molekularna biologija pod mentorstvom prof. dr.sc. Nade Oršolić s radom “Procjena radioprotektivnih učinaka flavonoida u miša testom kometa“. Doktorirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u području Biomedicine i zdravstva pod mentorstvom prof. dr. sc. Fabijana Kneževića s radom “Fosforilirani receptor HER2 kao pokazatelj rezistencije karcinoma dojke na terapiju trastuzumabom”.

Kao viši asistent sudjeluje u nastavi kolegija Molekularna Onkologija, voditeljice prof. dr. sc. Nade Oršolić. Voditelj je dva diplomatska rada pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, a sudjelovala je u izradi više od pet disertacija pri Medicinskom fakultetu. Objavila je više od 30 znanstvenih članaka od kojih je 26 indeksiranih u CC (h indeks 12 - SCOPUS) te više od 30 kongresnih sažetaka s domaćih i međunarodnih kongresa koji su vidljivi na Hrvatskoj znanstvenoj bibliografiji CROSB i Google scholar profilu.

Zaposlena je na Odjelu za onkološku patologiju Klinike za tumore KBC Sestre milosrdnice kao molekularni biolog. U sklopu rutinske dijagnostike opseg posla obuhvaća analize somatskih mutacija upotrebom real-time PCR metode; analizu kromogene hibridizacije *in situ* (CISH); detekcija prisutnosti HPV-a u uzorcima cervikalnog brisa Digene hibrid capture *in situ* hibridizacijskom metodom. Sudjeluje u radu Banke tkiva Klinike za traumatologiju, KBC Sestre milosrdnice, analizom uzoraka kulture keratinocita i limbalnih matičnih stanica. Radi u Genetičkom savjetovalištu Klinike za tumore što uključuje i analize gena uključenih u povećani nasljedni rizik razvoja malignih bolesti upotrebom metode NGS na Illumina platformi te interpretacije detektiranih varijanti.

Suradnik je na projektu HZZZ CRCMolProfil: IP-2019-04-4624, Gensko, proteinsko i RNA profiliranje kolorektalnog karcinoma primjenom tekuće biopsije voditeljice prof. Karmele Barišić. Sudjeluje u radu organizacije „Europska suradnja u znanosti i tehnologiji (European Cooperation in Science and Technology) u projektima COST *BM1206* - Cooperation Studies on Inherited Susceptibility to Colorectal Cancer i COST *CA15204* European Platform for Outcomes Research into Perioperative Interventions during Surgery for Cancer kao i na suradnom Znanstveno-tehnološkom projektu s MEF, Beograd, Srbija. Član je Europskog društva za humanu genetiku, Hrvatskog biološkog društva, Hrvatskog društva biologa u zdravstvu, Društva za kliničku genetiku Hrvatske, Hrvatskog društva za internističku onkologiju te pridruženi član Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog društva patologa i sudskih medicinara.

## *ZAHVALA*

Zahvaljujem prof.dr.sc Nadi Oršolić na predloženoj temi, vodstvu, neiscrpnom znanju, zalaganju, blagosti i velikom znanstvenom i ljudskom primjeru. Njene ideje, radoznalost, sposobnost povezivanja, iskustvo i pristup nešto su što nikada neću zaboraviti.

Također zahvaljujem komentorici dr.sc. Snježani Ramić na nesebičnom doprinosu u izradi disertacije.

Hvala i svim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju koji su pridonijeli istraživanju.

Hvala roditeljima, majci Renati i ocu Damiru na podršci i vjeri u mene.

Hvala svim kolegama i prijateljima koji su me motivirali da znanstveno napredujem.

Na kraju hvala mojoj supruzi Kati i kćerima Miji, Greti i Marti kojima ovaj rad posvećujem, jer one su bit i daju smisao svemu što činim.

## SAŽETAK

ANTIANGIOGENI POTENCIJAL SUSTAVNE HIPERTERMIJE, CISPLATINE I  
NANOKRISTALA RESVERATROLA U INHIBICIJI RASTA EHRlichOVOG  
SOLIDNOG KARCINOMA U MIŠA

Darko Kučan

Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

Prilagodba na hipoksični mikrookoliš kritična je za preživljavanje tumora i širenje metastaza. Hipoksijom inducirani čimbenik-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) igra ključnu ulogu u ovoj prilagodbi stimulirajući proizvodnju pro-angiogenih čimbenika i inducirajući enzime potrebne za anaerobni metabolizam. Inhibitori histon deacetilaza (HDACI), uključujući resveratrol, inhibiraju ekspresiju HIF-1 $\alpha$  i mogu doprinjeti inhibiciji rasta tumora kroz snažni anti-angiogeni učinak. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti kemosenzitivni potencijal resveratrola i njegovih nanokristala (NK Res) u kombinaciji s cisplatinom na inhibiciju tumorske angiogeneze, rasta tumora, i polarizacije makrofaga u miševa nositelja solidnog oblika Ehrlichovog ascitnog tumora (EAT) izloženih sustavnoj hipertermiji. Nakon injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica supkutano (*sc*) u bedro Balb/c miševa, miševi su obrađeni resveratrolom i/ili NK Res per os pet uzastopnih dana počevši od 2. dana nakon injekcije tumora te cisplatinom intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dana i u dozi od 5 mg/kg 15. dana. Odmah potom, miševi su bili izloženi sustavnoj hipertermiji 15 minuta na temperaturi od 41 °C. Razina histon deacetilaza (HDAC), HIF-1 $\alpha$ , proteina toplinskog šoka-70 i -90 (HSP-70/90), krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) i gustoća krvožilja, metaloproteinaze-2 i -9 (MMP-2/9), inducibilna sintaza dušikovog oksida (iNOS) i arginaza određeni su u tumorskom tkivu uz praćenje rasta i volumena tumora te preživljavanja životinja. Sažimajući dobivene podatke, resveratrol može pojačati antitumorski učinak cisplatine moduliranjem aktivnosti HDAC i razine HSP70/90, čime pridonosi izravnoj toksičnosti na tumorske stanice, dokidanju rezistencije i rasta tumora, te posljedičnom povećanju preživljenja miševa. Hipertermija pojačava lokalni protok krvi u tumoru povećavajući akumulaciju cisplatine unutar tumorskog tkiva i remodulira mikrookruženje tumora kroz aktivaciju M1 makrofaga i imunskog sustava na stanice tumora. NK Res ima bolju dostupnost, topivost i zadržavanje u specifičnom krvožilju tumora povećavajući protutumoski i antiangiogeni učinak cisplatine pri fiziološkim uvjetima dok u hipertermalnim uvjetima može neznatno smanjiti učinkovitost cisplatine kroz promjene tumorskog mikrookoliša i HIF-NO signalizacije.

(XV + 305 stranica, 60 slika, 19 tablica, 591 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski).

**Ključne riječi:** Nanokristali resveratrola, sustavna hipertermija, cisplatina, angiogeneza**Mentor:** prof. dr. sc. Nada Oršolić**Komentor:** dr.sc. Snježana Ramić, znanstveni suradnik**Ocjenjivači:** Prof.dr.sc. Domagoj Đikić

Izv.prof.dr.sc. Romana Gračan

Naslovni doc.dr.sc. Jelena Knežević, znanstvena savjetnica



## ABSTRACT

### ANTIANGIOGENIC POTENTIAL OF SYSTEMIC HYPERTHERMIA, CISPLATIN AND RESVERATROL NANOCRYSTALS IN INHIBITING THE GROWTH OF ERLICH SOLID CARCINOMA IN MICE

**Darko Kučan**

Division of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Adaptation to hypoxic environment is crucial for tumor survival and metastatic spread. Hypoxia induced factor - 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is a key factor in this adaptation by stimulating the production of proangiogenic factors and by inducing enzymes needed for anaerobic metabolism. Histone deacetylase inhibitors (HDACI), including resveratrol inhibit HIF-1 $\alpha$  expression and can contribute to inhibition of tumor growth through potent antiangiogenic effect. The purpose of this research was to explore chemosensitive potential of resveratrol and its nanocrystal formulation (NK Res) in combination with cisplatin on tumor angiogenesis inhibition, tumor growth and macrophage polarisation in mice bearing solid form of Erlich ascites tumor (EAT) exposed to systemic hyperthermia. After subcutaneous (*sc*) injection of  $1 \times 10^6$  EAT cells in thigh of Balb/c mice, mice were treated with resveratrol and/or NK Res per os during five consecutive days starting from the second day after tumor injection and cisplatin intraperitoneally (*ip*) at a dose of 2.5 mg/kg on the day 10 and 12 and at a dose of 5 mg/kg on the day 15. Right after, mice were exposed to systemic hyperthermia lasting for 15 min at a temperature of 41 °C. Level of histone deacetylases (HDAC), HIF-1 $\alpha$ , heat shock protein-70 and -90 (HSP-70/90), vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular density, metalloproteinases-2 and 9 (MMP-2/9), inducible synthase of nitric oxide (iNOS) and arginase were determined in the tumor tissue with monitoring of tumor growth and volume and animal survival. Summarizing the obtained data, resveratrol can enhance the antitumor effect of cisplatin by modulating HDAC activity and the level of HSP70/90, thus contributing to direct toxicity on tumor cells, overcoming resistance and tumor growth, and consequently increasing the survival of mice. Hyperthermia enhances local blood flow in tumor and increases cisplatin accumulation of cisplatin within tumor tissue and remodulates tumor microenvironment through M1 macrophage activation and immune system on tumor cells. NK Res has better bioavailability, solubility and retention in specific tumor vasculature and thereby increases antitumor and antiangiogenic effect of cisplatin in physiological conditions, while in hyperthermic conditions it can slightly lower the effect of cisplatin through tumor microenvironment changes and HIF-NO signalisation.

(XV+ 305 pages, 60 figures, 19 tables, 591 references, original in Croatian).

**Keywords:** Resveratrol nanocrystal, systemic hyperthermia, cisplatin, angiogenesis

**Supervisor:** Full Professor Nada Oršolić, PhD

**Co-supervisor:** Research associate Snježana Ramić, PhD

**Reviewers:** Full Professor Domagoj Đikić, PhD

Associate Professor Romana Gračan, PhD

Assistant Professor Jelena Knežević, PhD

## Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>§ 1. UVOD</b> .....	1
1.1. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	5
1.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	5
1.3. PRIMJENJENE METODE.....	7
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	9
2.1. OSNOVNE ZNAČAJKE TUMORA.....	9
2.1.1. Regulacija staničnog ciklusa i uloga apoptoze.....	11
2.1.2. Stanična besmrtnost i tumorigeneza.....	12
2.1.3. Stanično signaliziranje u karcinogenezi.....	12
2.1.4. Mutirani geni tumora.....	13
2.1.4.1. Stanični onkogeni.....	13
2.1.4.2. Tumor supresor geni.....	14
2.1.5. Etiologija tumora.....	14
2.1.6. Mehanizmi popravka DNA.....	15
2.1.7. Karcinogeneza.....	15
2.1.8. Invazija i metastaziranje.....	16
2.1.9. Stromalni mikrokoliš i karcinogeneza.....	17
2.1.10. Ostali genetski aspekti tumora.....	17
2.1.10.1. Genetska nestabilnost tumorskih stanica.....	17
2.1.10.2. Promjene genetskih mehanizama u tumorima.....	18
2.2. TUMORSKI MIKROOKOLIŠ.....	19
2.2.1. Imunosne stanice.....	19
2.2.1.1. Stanice T.....	20
2.2.1.2. Stanice B.....	20
2.2.1.3. Stanice NK.....	21
2.2.1.4. Makrofazi.....	21
2.2.1.5. Neutrofili.....	22

2.2.1.6. Dendritičke stanice .....	22
2.2.2. Stromalne stanice .....	23
2.2.2.1. Endotelne stanice.....	23
2.2.2.2. Tumoru pridruženi fibroblasti .....	24
2.2.2.3. Adipociti .....	25
2.2.2.4. Zvezdaste stanice.....	25
2.2.3. Nestanične sastavnice tumorskog mikrookoliša .....	26
2.2.3.1. Egzosomi .....	26
2.3. HIPOKSIJA .....	28
2.3.1. HIF .....	29
2.3.2. Uloga hipoksije u progresiji i metastaziranju tumora .....	31
2.3.2.1. Stvaranje krvnih žila.....	31
2.3.2.2. Metastaziranje .....	32
2.3.2.3. Rezistentnost na zračenje i lijekove.....	32
2.3.2.4. Tumorski mikrookoliš .....	33
2.4. MOLEKULARNA BIOLOGIJA TUMORSKE ANGIOGENEZE .....	34
2.4.1. Početak vaskularizacije tumora; angiogeni prekidač.....	34
2.4.2. Mehanizmi stvaranja krvnih žila u tumorskom tkivu .....	35
2.4.2.1. Angiogeneza pupanjem .....	36
2.4.2.2. Intesusceptivna angiogeneza .....	38
2.4.2.3. Vaskulogeneza i novačenje endotelnih progenitornih stanica.....	39
2.4.2.4. Vaskularna mimikrija .....	39
2.4.2.5. Transdiferencijacija tumorskih matičnih stanica .....	40
2.4.3. VEGF (Čimbenik rasta krvožilnog endotela).....	42
2.4.4. PDGF (Čimbenik rasta trombocita).....	42
2.4.5. FGF (Čimbenik rasta fibroblasta).....	42
2.4.6. EGF (Epidermalni čimbenik rasta).....	43
2.4.7. TGF (Transformirajući čimbenik rasta) .....	43
2.4.8. MMP (Matriksne metaloproteinaze) .....	43
2.4.9. TNF (Čimbenik nekroze tumora) .....	44
2.4.10. Angiopoetini .....	44
2.4.11. Terapija angiostatinima .....	44
2.5. VEGF I NJEGOVA ULOGA U ANGIOGENEZI TUMORA .....	46

2.5.1. Receptori VEGF-a.....	49
2.5.2. Uloga hipoksije.....	51
2.5.3. VEGF i protutumorska terapija .....	51
2.6. MATRIKSNE METALOPROTEINAZE .....	52
2.6.1. Regulacija aktivnosti MMP.....	54
2.6.2. Uloga MMP u tumorima .....	55
2.6.2.1. MMP i signalni putevi.....	55
2.6.2.2. MMP kao regulatori apoptoze.....	56
2.6.2.3. Krvožilje tumora.....	57
2.6.2.4. MMP i početak neoplastičke progresije .....	59
2.6.2.5. Invazija tkiva i metastaziranje .....	59
2.6.2.6. Stvaranje metastatske niše.....	60
2.6.2.7. MMP i upalni odgovor tumora.....	60
2.6.3. Protutumorska terapija inhibitorima MMP .....	61
2.7. IMUNOSNI OKOLIŠ TUMORA I IMUNOEDITIRANJE TUMORA .....	63
2.7.1. Tumorska heterogenost i protutumorski imunonadzor.....	64
2.7.2. Imunoeditiranje .....	65
2.7.2.1. Faza uklanjanja.....	67
2.7.2.2. Faza ravnoteže.....	69
2.7.2.3. Faza bijega.....	70
2.8. POLARIZACIJA MAKROFAGA .....	72
2.8.1. Funkcionalna raznolikost makrofaga .....	74
2.8.2. Tumoru pridruženi makrofazi.....	75
2.8.3. TAM u funkciji imunosupresivnog okoliša.....	76
2.9. INVAZIVNOST I METASTAZIRANJE TUMORA .....	81
2.9.1. Stjecanje lokalne invazivnosti .....	81
2.9.2. Intravazacija .....	82
2.9.3. Preživljenje u cirkulaciji.....	83
2.9.4. Zastoj u distalnim organima .....	83
2.9.5. Ekstravazacija.....	84
2.9.6. Stvaranje mikrometastaza.....	84
2.9.7. Stvaranje detektabilnih metastaza .....	85
2.10. EPIGENETSKE PROMJENE TUMORA .....	88

2.10.1. DNA metilacija.....	88
2.10.2. Mikro RNA utišavanje gena.....	89
2.10.3. HDAC.....	90
2.10.3.1. Struktura kromatina.....	90
2.10.3.2. Histonske modifikacije i transkripcija gena.....	90
2.10.3.3. Uloga HDAC u karcinomima.....	92
2.10.3.4. Terapijske implikacije inhibitora HDAC.....	94
2.10.3.5. Uloga polifenola u inhibiciji staničnog rasta i smrti.....	95
2.10.3.6. Uloga resveratrola u epigenetskim promjenama.....	96
2.11. OKSIDACIJSKI STRES I TUMOR.....	97
2.11.1. Učinak ROS-a na angiogenezu i rast tumora.....	97
2.11.2. Homeostaza ROS-a.....	98
2.11.3. ROS i karcinogeneza.....	98
2.11.4. ROS i metastaziranje.....	99
2.11.5. ROS i angiogeneza.....	100
2.11.6. Stanična apoptoza i ROS.....	101
2.11.7. Antioksidacijski mehanizmi.....	102
2.11.7.1. Neenzimatski antioksidansi.....	103
2.11.7.2. Prirodni antioksidansi.....	104
2.11.8. Protutumorska terapija i ROS.....	104
2.12. TERAPIJA TUMORA.....	107
2.12.1. Kemoterapija.....	107
2.12.1.1. Alkilirajuća sredstva.....	108
2.12.1.2. Antimetaboliti.....	108
2.12.1.3. Antimikrotubularni spojevi.....	109
2.12.1.4. Antibiotici.....	110
2.12.1.5. Razno.....	110
2.12.2. Cisplatina.....	110
2.12.3. Mehanizmi rezistentnosti na cisplatinu.....	112
2.12.4. Toksičnost cisplatine.....	112
2.13. HIPERTERMIJA.....	114
2.13.1. Stanične promjene.....	114
2.13.2. Citotoksičnost hipertermije.....	115

2.13.3. Hipertermija i fiziološke promjene.....	116
2.13.4. Termotolerancija i HSP .....	117
2.13.5. Proteini toplinskog stresa .....	117
2.13.6. Hipertermija u terapiji karcinoma .....	120
2.13.7. Hipertermija u kombinaciji sa kemoterapijom .....	120
2.13.8. Utjecaj hipertemije na poništenje rezistentnosti na kemoterapeutike.....	121
2.14. RESVERATROL .....	123
2.14.1. Resveratrol i apoptoza .....	124
2.14.2. Resveratrol i angiogeneza.....	125
2.14.3. Resveratrol i upalni procesi .....	125
2.14.4. Resveratrol i metastaziranje i invazija.....	126
2.14.5. Resveratrol i oksidativni stres .....	126
2.14.6. Resveratrol i indukcija autofagije.....	126
2.14.7. Resveratrol i kemoterapija.....	127
2.14.8. Resveratrol i alkilirajući kemoterapeutici .....	127
2.14.9. Biodostupnost resveratrola .....	128
2.15. NANOČESTICE .....	129
2.15.1. Proizvodnja nanokristala .....	130
2.15.2. Nanokristali i biodostupnost.....	130
2.15.3. Toksičnost nanočestica.....	131
§ 3. <b>MATERIJALI I METODE</b> .....	132
3.1. MATERIJALI .....	132
3.1.1. Pokusne životinje i održavanje uvjeta nastambe .....	132
3.1.2. Ehrlichov ascitesni tumor (EAT).....	132
3.1.3. Resveratrol.....	133
3.1.4. Nanokristali resveratrola .....	133
3.1.5. Cisplatin.....	133
3.1.6. Reagensi i mišji kompleti .....	133
3.1.6.1. Za anesteziiranje životinja korištene su sljedeće kemikalije: .....	133
3.1.6.2. Za izradu histoloških preparata parafinskom tehnikom korištene su sljedeće kemikalije:...	134
3.1.6.3. Za određivanje razine dušikova(II) oksida (NO) korišten je:.....	134
3.1.6.4. Za određivanje HDAC aktivnosti u tkivu tumora .....	134
3.1.6.5. Za određivanje aktivnosti enzima oksidacijskog stresa korištene su sljedeće kemikalije: ...	134

3.1.6.6. Za procjenu razina HSP70 i HSP90 u tkivu tumora .....	135
3.1.6.7. Za određivanje MMP-2 i MMP-9.....	135
3.1.6.8. Za određivanje Arginaze .....	136
3.1.7. Hipertermija.....	136
3.1.8. Instrumenti.....	136
3.2. METODE .....	137
3.2.1. Plan pokusa i način obrade životinja .....	137
3.2.2. Hipertermija.....	138
3.2.3. Priprema i karakterizacija nanokristala .....	139
Pokazatelji protutumorske i antiangiogene aktivnosti.....	140
3.2.4. Praćenje preživljenja pokusnih životinja .....	140
3.2.5. Mjerenje promjene mase životinja i volumena tumora .....	141
3.2.6. Određivanje broja metastaza na plućima.....	141
3.2.7. Prikupljanje uzoraka i priprema uzoraka tkiva tumora .....	141
3.2.8. HDAC aktivnost u tkivu tumora.....	142
3.2.8.1. Nuklearna ekstrakcija .....	142
3.2.8.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	142
3.2.8.3. Kolorimetrijsko mjerenje aktivnosti HDAC.....	143
3.2.9. Kvantitativna analiza HIF-1 $\alpha$ u tumorskom tkivu.....	144
3.2.10. Određivanje koncentracije HSP70 i HSP90 u tkivu tumora.....	144
3.2.11. Određivanje koncentracije MMP-2 MMP-9 .....	145
3.2.12. Određivanje koncentracije VEGF-a .....	146
Pokazatelji imunomodulatorne aktivnosti i polarizacije makrofaga .....	146
3.2.13. Mjerenje koncentracije NO po Griessu .....	147
3.2.13.1. Izolacija i stimulacija makrofaga slezene s LPS-om .....	147
3.2.13.2. Izolacija i priprema tumorskog tkiva za analizu NO i Arg1 .....	147
3.2.13.3. Određivanje dušikova (II) oksida (NO) indirektnom metodom po Griess-u.....	148
3.2.14. Određivanje koncentracije arginaze 1 .....	149
Pokazatelji antioksidacijske/prooksidacijske aktivnosti.....	150
3.2.15. Izolacija i priprema tkiva.....	150
3.2.16. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowery-u .....	150
3.2.17. Mjerenje razine lipidne peroksidacije .....	151
3.2.18. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH).....	153

3.2.19. Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze.....	155
Pokazatelji razine oštećenja.....	156
3.2.20. Histološka analiza tumora .....	156
3.2.20.1. Imunohistokemijsko bojenje tumorskog tkiva .....	156
3.2.20.2. Analiza uzoraka.....	157
3.2.20.3. Određivanje gustoće krvnih žila u tumorskom tkivu.....	157
3.2.21. Statistička analiza .....	158
<b>§ 4. REZULTATI.....</b>	<b>159</b>
4.1. PROTUTUMORSKE I ANTIANGIOGENE ZNAČAJKE KOMBINACIJE RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A .....	159
4.1.1. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na tjelesnu masu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a .....	159
4.1.2. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na stopu preživljavanja i volumen tumora miševa nositelja solidnog oblika EAT-a .....	161
4.1.3. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na promjenu relativne mase jetre, slezene i bubrega miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	168
4.1.4. Razina HDAC u uzorcima tkiva tumora obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima .....	169
4.1.5. Razina HSP70 i HSP90 u uzorcima tkiva tumora obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima .....	171
4.1.6. Razina VEGF u uzorcima seruma i tumora miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima .....	174
4.1.7. Razina MMP-2 i MMP-9 u uzorcima tkiva tumora obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima .....	177
4.1.8. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na gustoću mikrožilja (MVD) miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	180
4.2. UČINAK RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE NA IMUNOMODULACIJU I POLARIZACIJU MAKROFAGA U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A .....	182
4.2.1. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na tumoricidnu aktivnost makrofaga u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a .....	182
4.2.2. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na tumoricidnu aktivnost makrofaga slezene miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	185
4.3. ANTIOKSIDATIVNE/PROOKSIDATIVNE ZNAČAJKE KOMBINACIJE RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A .....	188
4.3.1. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva tumora, bubrega i jetre miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.....	188



4.3.1.1. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva tumora miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.....	188
4.3.1.2. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva jetre miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.....	190
4.3.1.3. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva bubrega miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.....	192
4.4. PROCJENA RAZINE OŠTEĆENJA KOMBINACIJE RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A.....	194
4.4.1. Učinak resveratrola, cisplatina i hipertermije na histološke i imunohistokemijske promjene u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	194
4.5. PROTUTUMORSKE I ANTIANGIOGENE ZNAČAJKE KOMBINACIJE NANOKRISTALA RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A.....	200
4.5.1. Učinak kombinacije nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije na tjelesnu masu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	200
4.5.2. Učinak kombinacije nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermijena stopu preživljavanjajai volumen tumora miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	202
4.5.3. Učinak kombinacije nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije na promjenu relativne mase jetre, slezene i bubrega miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	208
4.5.4. Razina HDAC u uzorcima tkiva tumora obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.....	209
4.5.5. Razina HSP70 i HSP90 u uzorcima tkiva tumora obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.....	211
4.5.6. Razina VEGF u uzorcima seruma i tumora miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.....	214
4.5.7. Razina MMP-2 i MMP-9 u uzorcima tkiva tumora obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.....	217
4.5.8. Učinak kombinacije nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije na gustoću mikrožilja (MVD) miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	220
4.6. UČINAK KOMBINACIJE NANOKRISTALA RESVERATROLA, CISPLATINA I HIPERTERMIJE NA POLARIZACIJU MAKROFAGA UBALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A.....	222
4.6.1. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na tumoricidnu aktivnost makrofaga u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	222
4.6.2. Učinak kombinacija resveratrola, cisplatina i hipertermije na tumoricidnu aktivnost makrofaga slezene miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.....	225

4.7. ANTIOKSIDATIVNE/PROOKSIDATIVNE ZNAČAJKE KOMBINACIJA NANOKRISTALA RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A .....	227
4.7.1. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva tumora, bubrega i jetre miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima .....	227
4.7.1.1. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva tumora miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima .....	227
4.7.1.2. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva jetre miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima .....	229
4.7.1.3. Biljezi oksidacijskog stresu uzorcima tkiva bubrega miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima .....	232
4.8. PROCJENA RAZINE OŠTEĆENJA KOMBINACIJE NANOKRISTALA RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A .....	234
4.8.1. Učinak nanokristala resveratrola, cisplatina i hipertermije na histološke i imunohistokemijske promjene u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a .....	234
§ 5. <b>RASPRAVA</b> .....	238
5.1. Antiangiogeni potencijal sustavne hipertermije, cisplatinom i resveratrola u inhibiciji rasta Ehrlichovog solidnog karcinoma u miša .....	240
§ 6. <b>ZAKLJUČCI</b> .....	266
§ 7. <b>LITERATURA</b> .....	271
§ 8. <b>ŽIVOTOPIS</b> .....	305



## § 1. UVOD

Resveratrol (3,5,4-trihidroksi-trans-stilben) u posljednje je vrijeme predmet mnogih istraživanja zahvaljujući svojim antioksidativnim, kardioprotektivnim, protuupalnim i protutumorskim svojstvima (Zhang i sur., 2021.). Ispitivanja na ljudima pokazala su da se 75% oralno primjenjenog resveratrola apsorbira i to primarno transepitelnom difuzijom (Chimento i sur., 2019.). Međutim, bioraspoloživost resveratrola je manja od 1% zbog njegovog brzog metabolizma u crijevima i jetri pri čemu nastaju dva glavna metabolita trans-resveratrol-3-O-glucuronide i trans-resveratrol-3-sulfat uslijed čega se u sistemskej cirkulaciji mogu naći samo tragovi slobodnog resveratrola (Walle, 2011.; Jang i sur., 2022.).

Resveratrol inhibira sve tri razine u procesu karcinogeneze: inicijaciju, promociju i progresiju tumora (Jang i sur., 2022.). Protutumorski učinak resveratrola uključuje proapoptotičko, antiproliferativno, protuupalno i antiangiogenetsko djelovanje. Nadalje, resveratrol sudjeluje u regulaciji razine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), modulaciji signalnih putova, aktivaciji apoptoze i inhibiciji staničnog ciklusa (Zhuang i sur., 2019.).

Oksidacijski stres pridonosi karcinogenezi, pri čemu ROS vodi lipidnoj peroksidaciji, oštećenju DNA i proteina. Dugotrajna peroralna primjena resveratrola (8-12 mg/kg dnevno) značajno smanjuje razinu oštećenja DNA kroz povećanje razine superoksid dismutaze (SOD), katalaze i drugih antioksidacijskih enzima kao i povećanje razine glutationa, vitamina C, E i beta-karotena u štakora nositelja tumora kolona (Pyo i sur., 2020.). Resveratrol povećava ekspresiju SOD u tumorskim stanicama (PC-3, HepG2 i MCF-7) vodeći nakupljanju vodikovog peroksida unutar mitohondrija te posljedičnoj apoptozi (Khan i sur., 2013.) dok stanice MCF-7 ne pokazuju povećanje apoptoze nakon obrade s resveratrolom.

Resveratrol sprječava oksidaciju niskomolekularnih lipoproteina, suprimira ciklooksigenaze-2 i dušikov-oksida sintaze što pridonosi njegovom protuupalnom i protuoksidativnom učinku dok inhibicijom kinon-reduktaze 2 (NQO2), koja sudjeluje u regulaciji ekspresije staničnih protuoksidativnih i detoksifikacijskih enzima poboljšava staničnu otpornost na oksidacijski stres. Resveratrol također povećava aktivnost SIRT-a (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent Deacetylases*) vodeći do poboljšanja stanične otpornosti na stres. Zbog strukturne sličnosti s dietilstilbestrolom (sintetski oblik ženskog spolnog hormona estrogena), pripisuje mu se i mogućnost regulacije ekspresije hormon-ovisnih gena kao što je tumor supresor gen *BRCA1* (Fustier i sur., 2003.).

Terapijska primjena resveratrola ograničena je njegovim fizičko-kemijskim (slaba topljivost, nestabilnost) i farmakokinetičkim (brzi metabolizam, kratko vrijeme polueliminacije, niska bioraspoloživost, brza eliminacija) značajkama (Galiniak i sur., 2019.). Tako je bioraspoloživost oralno primjenjenog resveratrola jednaka nuli, čime se dovodi u pitanje relevantnost *in vitro* ispitivanja s visokim koncentracijama resveratrola (Chimento i sur., 2019.; Galiniak i sur., 2019.).

Jedan od mogućih načina za iskorištavanje antitumorskih svojstava resveratrola je povećanje količine slobodnog trans-resveratrola na ciljanom mjestu djelovanja, zaobilazeći mogućnost brzog metaboliziranja u crijevima i jetri (Walle, 2011.). Pristup povećanju bioraspoloživosti slabo topljivih tvari je smanjenje veličine čestica takve tvari do nanometarskog područja dimenzija, odnosno izrada nanokristala slabo topljive tvari. Smanjenjem veličine čestica slabo topljive tvari do nanometarskih dimenzija različitim tehnološkim postupcima (primjerice, vlažno mljevenje, visokotlačno homogeniziranje) odnosno povećanjem površine čestica takve tvari u odnosu na volumen, povećava se topljivost i brzina otapanja te se poboljšavaju biofarmaceutske značajke slabo topljive tvari (Nishimoto-Sauceda i sur., 2022). Prema literaturnim podacima nanokristali citostatika paklitaksela pokazali su se kao perspektivan smjer razvoja farmaceutskih oblika za primjenu protutumorskih djelatnih tvari (Sharifi-Rad i sur., 2021.).

Protutumorska učinkovitost resveratrola je potvrđena ali korištenje nanokristala resveratrola kao mogućeg načina poboljšanja fizičko-kemijskih i biofarmaceutskih značajki resveratrola, uz minimalno korištenje pomoćnih tvari bez značajnog utjecaja na sigurnosni profil resveratrola do sada nije provedeno posebice kao oblika terapije u multimodalnom pristupu sa sustavnom hipertermijom i kemoterapijom.

Rastući tumor treba razgranatu mrežu kapilara kako bi si osigurao hranjive tvari i kisik. Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz već postojećih i smatra se ključnom za rast tumora i metastaziranje. U tomu važnu ulogu imaju tumoru pridruženi makrofazi (TAM) koji obavljaju imunosupresivne uloge kroz: 1. osobađanje antiupalnih citokina; 2. moduliranja mikrookoliša tumora proizvodnjom čimbenika preživljavanja/rasta, primjerice, čimbenika rasta krvožilnog endotela, (VEGF, engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*); 3. olakšavanja progresije tumora kroz otpuštanje proangiogenetskih čimbenika primjerice, matriks-metaloproteinaza -2 i -9, (MMP-2 i MMP-9, engl. *Matrix Metalloproteinase*); 4. povećanje aktivnosti arginaze (Arg), a smanjenje aktivnosti inducibilne dušikov oksid sintaze (iNOS) (Pan i sur., 2020.).

Kao odgovor na hipoksiju, tumori luče angiogene čimbenike rasta kako bi stimulirali rast žila i opskrbu kisikom u čemu posreduje HIF-1 koji modulira ekspresiju brojnih hipoksijom inducibilnih gena i angiogenih čimbenika kao što je VEGF. Indukcija hipoksije, posebno je karakteristična za VEGF-A u odnosu na ostale članove VEGF obitelji i druge angiogene čimbenike. Nadalje, povišena razina HIF-1 povezana je s povećanjem angiogeneze, agresivnim rastom tumora i lošom prognozom pacijenata što pobuđuje veliko zanimanje za HIF-1 kao obećavajući cilj u protutumorskoj terapiji. Točnije, HIF-1 čimbenik inducira transkripcijski čimbenik hipoksije, regulira ekspresiju brojnih gena uključenih u različite stanične signalne puteve, uključujući angiogenezu preko povećane ekspresije VEGF-a.

Nadalje, histon acetiltransferaze i deacetilaze (HDACs) igraju središnju ulogu u modifikaciji strukture kromatina i ekspresiji gena (Ramaiah i sur., 2021.). Inaktivacija histon-acetiltransferaze povezana je s tumorigenezom. Predloženo je da je aberantna aktivnost HDAC ključni događaj u nastanku tumora, jer prekomjerna aktivnost HDAC-a neprimjereno potiskuje transkripciju tumor supresorskih gena (Li i Seto, 2016.). Nadalje, hipoksični uvjeti reguliraju funkciju HDAC, izravno i neizravno, kroz posredovanje HDAC-a u kisikom regulirane ekspresije gena i hipoksijom-inducirane angiogeneze (Ramaiah i sur., 2021.).

Obitelj proteina toplinskog šoka (HSP, engl. *Heat Shock Proteins*) uključuje skupinu molekularnih nadzornika koji igraju važnu ulogu tijekom smatanja proteina i konformacijskog sazrijevanja. HSP90 je kritično uključen u funkciju i stabilnost mnogih onkogenih produkata i molekula koje djeluju na signalne procese unutar stanica. Ekspresija HSP90 je pojačana u

tumorima, u usporedbi s normalnim tkivom (Zhang i sur., 2020.), a tumorske stanice su posebno osjetljive na HSP90 inhibiciju (Zhang i sur., 2020.), kao i na sposobnost HSP90 inhibitora da poboljšaju osjetljivost tumorskih stanica na hipertermiju i djelotvornost kemoterapije protiv raka (Calderwood i Ciocca, 2008.).

Poznato je da je HSP70 snažan negativni regulator stanične smrti i bitan čimbenik koji podržava preživljavanje tumorskih stanica i rast tumora; štoviše, povišene razine HSP70 unutar tumora koreliraju s lošom prognozom u bolesnika s karcinomom (Rai i sur., 2021.). Osiromašenje HSP70 ne samo da povećava smrt tumorskih stanica, već i selektivno senzibilizira maligne stanice na kemoterapijska sredstva (Rai i sur., 2021.). Tako, niža regulacija HSP70 pokreće otpornost na stanice raka, inhibira apoptozu i uzvodno i nizvodno od mitohondrijske signalizacije. Nadalje, inhibicija HSP90 dovodi do kompenzacijske ekspresije HSP70, što može smanjiti učestalost stanične smrti inače inducirane s HSP90 inhibitorima i tako smanjiti njihovu učinkovitost protiv tumora (Kim i sur., 2015.). Štoviše, Kim i sur. (2015.) su razjasnili ključnu ulogu HSP70 kao proangiogenog regulatora. Prema tome, dvostruka inhibicija HSP90 i 70 može pojačati anti-tumorsku i antiangiogenu učinkovitost lijekova.

Jedan od načina povećanja učinkovitosti kemoterapije na tumor je primjena hipertermije. Tumorske stanice su osjetljivije na temperature u području od 41 °C - 45 °C u odnosu na normalno tkivo. Blaga hipertermija (mHT) povećava perfuziju tumora i krvožilnu permeabilnost te smanjuje tlak intersticijalne tekućine, što dovodi do bolje intra-tumorske biodostupnosti lijekova male molekulske mase. Ovaj pristup je potencijalno atraktivan za isporuku terapijskih makromolekula. Hipertermijski pristup u terapiji karcinoma pokazuje značajnu djelotvornost radi dvostrukog djelovanja, direktno uništavajući stanicu i indirektno aktivirajući anti-tumorsku imunost (Dunne i sur., 2020). Neravnomjerno razvijeni krvožilni sustav solidnih tumora čini maligne stanice osjetljivijima na hipertermiju od normalnih stanica zbog prisutnosti hipoksije i niskog pH. Istraživanja pokazuju da inducirani proteini toplinskog šoka (HSP) u tumorskim stanicama pod hipertermijskim stresom mogu potaknuti aktivaciju stanica T i NK te povećati stanični imunski odgovor na tumor (Multhoff, 2009.; Oršolić i sur., 2020.). Hipertermija poboljšava citotoksičnost nekih kemoterapeutika uključujući cisplatinu (Cis). Cisplatin je antineoplastično sredstvo na bazi platine i jedan je od najprominentnijih kemoterapeutika širokog

spektra koji se koristi za liječenje neoplazmi vrata maternice, glave i vrata, prostate, dojke, pluća, testisa i raka jajnika.

Zanimljiv je i podatak da primjena hipertermije u terapijske svrhe izaziva ekspresiju HSP-a na površini normalnih i tumorskih stanica. Međutim, nakon oporavka pri 37 °C ekspresija HSP-a je prisutna samo kod tumorskih stanica (Multhoff, 2009.). Stanice s izraženim HSP-om su osjetljivije na citotoksično djelovanje NK stanica. Nadalje, nakon nekroze stanica dolazi do otpuštanja HSP-a koji stimuliraju makrofage i dendritične stanice na lučenje citokina te aktiviraju antigen predočne stanice čime se pojačava imunosti odgovor prema tumorskim stanicama. Iz ovoga slijedi da aktivnost makrofaga može biti potaknuta ne samo resveratrolom, nego i apoptozom, hipertermijom te HSP proteinima.

## **1.1. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Krvožilni sustav solidnih tumora je neravnomjerno razvijen pri čemu je u pojedinim dijelovima tumorskog tkiva prisutna hipoksija i nizak pH što čini maligne stanice osjetljivijima na hipertermiju od normalnih stanica. Blaga hipertermija (mHT) će povećati perfuziju tumora i krvožilnu permeabilnost te smanjuje tlak intersticijalne tekućine, dovesti do bolje intra-tumorske biodostupnosti cisplatine i resveratrola i povećati kemosenzitivnost stanica te spriječiti progresiju tumora pokretanjem smrti tumorskih stanica, inhibicijom VEGF-a, smanjenjem razine MMP, te modulacijom HSP uzrokujući povećanu makrofagnu aktivnost i produkciju oksidativnog stresa i smrti tumorskih stanica te mogućeg oštećenja i/ili regeneracije zdravog tkiva zbog nakupljanja nanokristala.

## **1.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

**Temeljni cilj rada** jest procijeniti antiangiogeni i termosenzibilizirajući učinak resveratrola i njegovih nanokristala u modelu miša nositelja Ehrlichovog solidnog tumora; točnije istražiti njihov učinak na: 1. rast tumora i preživljenje domaćina; 2. angiogenezu; 3. indukciju HSP70/90 i funkcionalnu sposobnost makrofaga, 4. oksidacijski stres te razinu oštećenja tumora i zdravog tkiva.

Mehanizmi procjene učinkovitosti resveratrola i njegovih nanokristala temeljiti će se na navedenom kako slijedi:



- Procjeni djelotvornosti resveratrola i njegovih nanokristala (NK Res) samih i/ili združenih s kemoterapijom i hipertermijom na HDAC aktivnost i prekidanje signalne osi HIF-1 $\alpha$ -HSP70/90.
- Istraživanju antiangiogene i termosenzibilirajuće učinkovitosti resveratrola i njegovih NK Res samih i/ili združenih s kemoterapijom i hipertermijom kroz procjenu razine VEGF, MMP-2/9 i preživljavanja.
- Procjeni učinkovitosti resveratrola i njegovih nanokristala u inhibiciji HSP70/90 nakon hipertermalne kemoterapije i pokretanje imunosne aktivacije i makrofagne polarizacije
- Procjeni imunomodularne aktivnosti resveratrola i njegovih nanokristala na povećanje M1 tumoricidne djelotvornosti TAM; i blokiranja M2 tumorske aktivnost TAM, ključne u inhibiciji angiogeneze te inhibiciji rasta tumora
- Procjeni antioksidativne/prooksidativne sposobnosti resveratrola i njegovih nanokristala u inhibiciji makrofagne polarizacije te posljedične angiogeneze ili prooksidativnog učinka u kombinaciji s hipertermijom i cisplatinom u pokretanju stanične smrti apoptozom/nekrozom te razine oštećenja tumorskih stanica te moguće zaštite i/ili oštećenja zdravih stanica bubrega i jetre praćenjem proliferacijskog indeksa i stanične smrti
- Procjeni međudjelovanje navedenih oblika terapije procjenom aditivnog, sinergističkog ili antagonističkog djelovanja

### **1.3. PRIMJENJENE METODE**

Upiti o ostvarivanju navedenih ciljeva istraženi su slijedećim metodama svrstanim u 2 zasebne cjeline:

1. Protutumorski i antiangiogeni potencijal sustavne hipertermije, cisplatine i resveratrola u inhibiciji rasta Ehrlichovog solidnog karcinoma u miša
2. Protutumorski i antiangiogeni potencijal sustavne hipertermije, cisplatine i nanokristala resveratrola u inhibiciji rasta Ehrlichovog solidnog karcinoma u miša.

Svaka cjelina je dalje podjeljena na 4 različita područja istraživanja kako bi se dalo odgovore na postavljene upite kako slijedi:

#### **– Protutumorske i antiangiogene značajke**

Područje uključuje slijedeće metode istraživanja: Praćenje preživljenja pokusnih životinja; Mjerenje promjene mase životinja i volumena tumora; Prikupljanje uzoraka i priprema uzoraka tkiva tumora; HDAC aktivnost u tkivu tumora; Određivanje razina HIF-1 $\alpha$  u tumorskom tkivu; Procjena razina HSP70 i HSP90 u tkivu tumora; Određivanje MMP-2, MMP-9 i VEGF-a; Brojanje gustoće mikrožilja (MVD).

#### **– Imunomodulacijska aktivnost i polarizacija makrofaga**

Područje uključuje slijedeće metode istraživanja: Određivanje NO, arginaze (Arg) i iNOS u tkivu tumora i slezene.

#### **– Antioksidativne/prooksidativne značajke**

Oksido-redukcijski pokazatelji praćeni su određivanjem biljega oksidacijskog stresa u jetri, bubregu, i tumoru primjenom metoda: Mjerenje ukupnih proteina; Razina lipidne peroksidacije mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA); Koncentracija ukupnog glutationa (GSH); i Aktivnost katalaze (CAT).

– **Procjena razine oštećenja**

Histološke i imunohistokemijske promjene u tumorskom tkivu prikazane su kao: Broj krvnih žila na cijelim uzorcima tumora; Broj stanica u proliferaciji, apoptozi i nekrozi; Analiza razine HIF-a i iNOS.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. OSNOVNE ZNAČAJKE TUMORA

Tumor je u medicini termin koji se može koristiti za svaku izraslinu. Gledajući onkološki, tumore dijelimo na benigne (dobročudne) i maligne (zloćudne). Rak je uvriježena oznaka za maligne tumore, a karcinom je tek jedna od podvrsta malignih tumora. Rak nije jedinstvena bolest, te postoji preko 200 tipova raka, koji se uglavnom nazivaju prema organu ili tkivu iz kojeg rak potječe. Drugi način klasifikacije je prema tipu stanica od koji je rak sastavljen, prema čemu su glavne podvrste karcinomi, sarkomi, limfomi, leukemije i mijelomi.

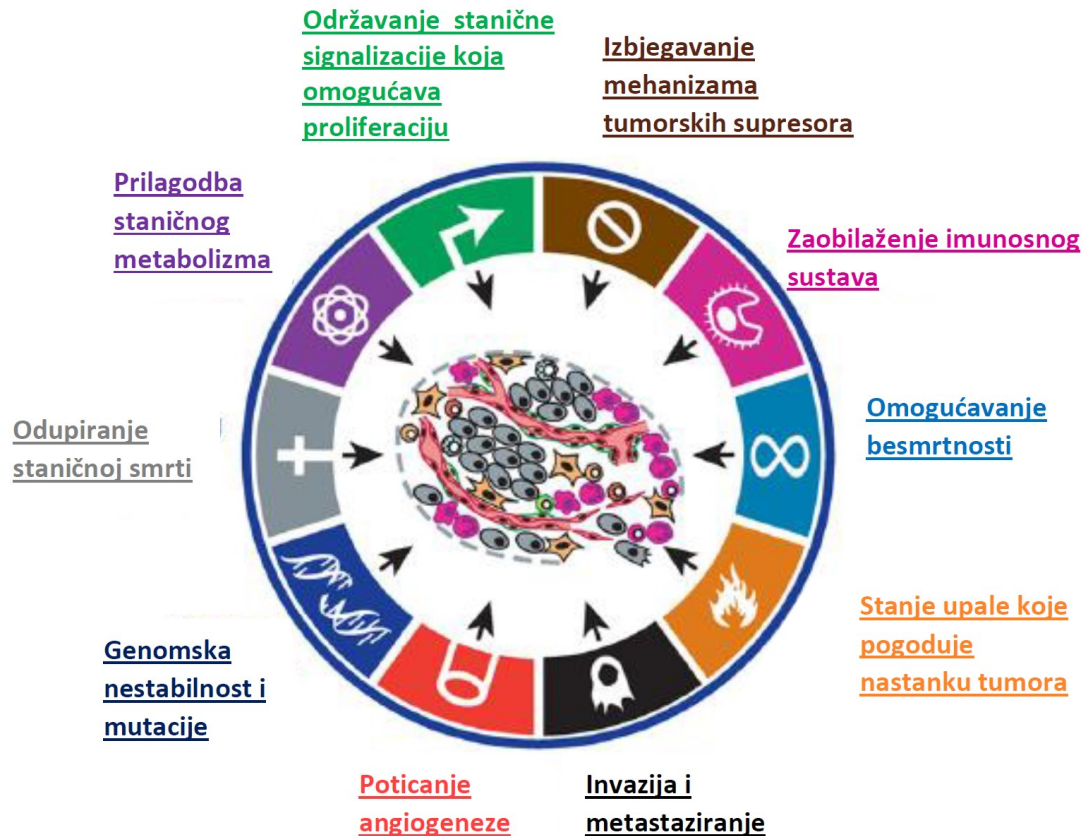
Maligni tumori su globalno drugi uzrok mortaliteta, godišnje su odgovorni za preko 9,6 milijuna smrti. Godine 2018. pluća, prostata, kolorektum, želudac i jetra bili su najčešći tipovi tumora u muškaraca, dok su dojka, kolorektum, pluća, cerviks i štitnjača najčešći tipovi tumora u žena.

Niz čimbenika povećavaju rizik od nastanka tumora, a mogu se podijeliti na predodređene (dob, spol i genetska predispozicija) i varijabilne (prehana, okoliš, infekcije, lijekovi i kemoterapije). Smatra se da su tumori najčešće monoklonalnog (jednostaničnog) podrijetla, odnosno nastaju proliferacijom iz jedne tumorske stanice nastale malignom transformacijom normalne stanice (Juretić, 2000).

Weinberg i Hanahan (2011.) naveli su 6 ključnih promjena stanične fiziologije koje karakteriziraju malignitet (Slika 1):

1. Samodostatnost u signalima rasta: maligne stanice stječu autonomni proliferacijski sustav – patološku mitozu, aktivacijom onkogeni poput *RAS* ili *MYC*
2. Prestanak osjetljivosti na inhibitorne signale rasta: tumorske stanice inaktiviraju tumor supresor gene, poput *RB* koji u normalnim uvjetima inhibiraju rast
3. Izbjegavanje programirane stanične smrti (apoptoze): tumorske stanice suprimiraju i inaktiviraju gene i puteve koji u normalnim uvjetima omogućavaju staničnu smrt.
4. Neograničeni potencijal replikacije: tumorske stanice aktiviraju specifične genske puteve koji im omogućavaju besmrtnost čak i nakon više generacija rasta.

5. Održivost angiogeneze: Tumorske stanice dobivaju mogućnost stvaranja vlastitih krvnih žila – tumorska angiogeneza
6. Invazija tkiva i metastaziranje: tumorske stanice dobivaju mogućnost migracije u druge organe i invaziju drugih tkiva



**Slika 1.** Karakteristike tumora. Preuzeto i prilagođeno prema Hanahan i Weinberg, 2011.

Tumori, bez obzira na biološka obilježja sastoje se od dva osnovna dijela:

- Parenhima sastavljenog od neoplastičnih stanica po kojem tumor dobiva ime i koji određuje njegovo biološko ponašanje
- Potporne strome sastavljene od vezivnog tkiva, krvnih i limfnih žila kojese presudne za rast i razvoj tumora

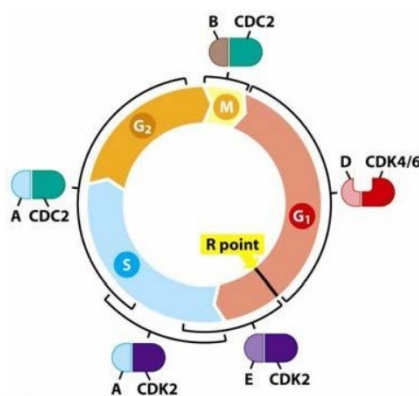
Stanična diferencijacija označuje stupanj različitosti od ishodišnih stanica, morfološki i funkcionalno. Dobro diferencirani tumori jako nalikuju na zrele normalne ishodišne stanice, što

je uglavnom odlika dobroćudnih tumora, dok su slabo, odnosno nediferencirani tumori oni čije su stanice primitivnog izgleda i bez specijalizacije (Jukić i sur. 2002.). Nediferencirani tumori imaju u pravilu veći broj mitozâ, odnosno brže proliferiraju (Jukić i sur., 2002.).

Točnije, maligno oboljenje jest bolest koju karakterizira nekontrolirani rast i proliferacija pri čemu su stanice izbjegle normalnim kontrolnim mehanizmima i stekle mogućnost beskonačne diobe. To je proces koji se zbiva u više koraka i zahtjeva zbir mnogih genetskih promjena kroz vrijeme. Navedene genetske promjene uključuju aktivaciju proto-onkogenâ u onkogene, deregulaciju tumor supresorskih gena i gena za popravak DNA i postizanje besmrtnosti.

### **2.1.1. Regulacija staničnog ciklusa i uloga apoptoze**

U normalnim stanicama proliferacija i progresija kroz stanični ciklus strogo je regulirana grupom proteina koji međusobno surađuju u specifičnoj kaskadi događanja (Slika 2.). Kontrolne točke osiguravaju da su pojedine faze staničnog ciklusa ispravno dovršene i osiguravaju da nekompletno replicirana DNA ne bude prenešena na stanice kćeri. Osnova ovog kontrolnog mehanizma su ciklin ovisne kinaze (CDK, engl. *Cyclin Dependent Kinases*). CDK vode kroz različite faze staničnog ciklusa fosforilacijom i aktivacijom drugih podređenih kinaza. Aktivnost CDK ovisna je o prisustvu aktivirajućih podjedinica zvanih ciklini koji se sintetiziraju i razgrađuju ovisno o staničnom ciklusu (Zhang i sur., 2021.). Kompleksi ciklini-CDK su strogo regulirani CDK inhibitorima (Cheng i sur., 2019.).



**Slika 2.** Ciklini i ciklin ovisne kinaze reguliraju stanični ciklus. Preuzeto i prilagođeno prema Weinberg, 2007.

Ponovni ulazak stanica u stanični ciklus se odlučuje na restrikcijskoj točki (engl. *R point*). Odluka o ponovnom ulasku pod utjecajem je izvanstaničnih mitogenih signala koji se prenose signalnim putevima do ključnih regulatornih proteina, poput transkripcijskih čimbenika u jezgri. Ovi regulatorni proteini aktiviraju CDK S-faze koje potiču početak DNA sinteze. U normalnim stanicama, aktivacija transkripcijskog čimbenika p53 (Liebl i sur., 2021.) koji se često naziva čuvarom genoma može dovesti do zastoja staničnog ciklusa i indukcije apoptoze odnosno programirane stanične smrti preko njegove sposobnosti da inducira ekspresiju inhibitora staničnog ciklusa u svrhu prevencije proliferacije oštećene stanice dok se oštećenje ne popravi ili inicijacijom apoptoze pri velikim oštećenjima koja se ne mogu popraviti. U više od 50% ljudskih tumora put p53 je poremećen. Inaktivacija p53 proteina dovodi do nemogućnosti pokretanja apoptotskog slijeda što rezultira povećanim preživljenjem tumorskih stanica.

### **2.1.2. Stanična besmrtnost i tumorigeneza**

Besmrtnost se definira kao beskonačni životni vijek. Normalne somatske stanice sisavaca imaju ograničeni broj proliferacija nakon čega počinje proces starenja. Ostarjele stanice mogu ostati metabolički aktivne, premda su trajno prestale proliferirati. Stjecanje besmrtnosti ključan je korak u malignoj transformaciji normalne stanice i može se dijelom pripisati prisutnosti telomeraza, enzima koji su odgovorni za održavanje telomera na krajevima kromosoma. Produljenjem DNA telomera, telomeraze mogu obrnuti progresivno skraćenje telomera koje bi u normalnim uvjetima vodilo u staničnu smrt. Za razliku od normalnih stanica kojima nedostaju detektabilne razine telomerazne aktivnosti, otprilike 90% ljudskih tumora sastoji se od tumora koji sadržavaju aktivne telomerazne enzime (Mizukoshi i sur., 2019.).

### **2.1.3. Stanično signaliziranje u karcinogenezi**

Čimbenici rasta i njihovi receptori čimbenika rasta (GF, engl. *Growth Factors*) igraju važnu fiziološku ulogu u normalnim procesima kontrole rasta s ciljem održavanja homeostaze tkiva (Stefani i sur., 2021.). Prenose signale rasta od stanice do stanice. Takvi signali se otkrivaju na staničnoj površini specifičnim receptorima čimbenika rasta (GFR, engl. *Growth Factor Receptors*). Takvi receptori prenose signale rasta signalnim putevima u svrhu aktiviranja ciljnih molekula koje potiču proliferaciju.

Koraci koji karakteriziraju normalnu staničnu proliferaciju:

- Vežanje čimbenika rasta na njegov specifičan receptor na staničnoj membrani
- Prolazna i ograničena aktivacija receptora čimbenika rasta koji aktivira nekoliko proteina provodnika signala (npr. *Ras*) na unutarnjoj strani plazmatske membrane
- Prijenos signala signalnim prijenosnim molekulama, prema citosolnim ciljevima ili u jezgru stanice gdje aktiviraju transkripciju specifičnih gena
- Ulazak stanice u stanični ciklus što rezultira diobom stanice

Poremećeni signalni putevi u stanicama karcinoma omogućavaju odmetnutim stanicama stvaranje vlastitih internih signala koji stimuliraju proliferaciju i postaju neovisne o okolišu. Mutacija gena staničnih receptora rasta olakšava aktivaciju u odsustvu čimbenika rasta ili prekomjerno stvaranje čimbenika rasta rezultira autokrinom signalnom petljom te stalnom proliferacijom stanica tumora.

Alternativan način neovisnosti stanica tumora od čimbenika rasta uključuje konstitutivnu aktivaciju internih signalnih komponenti. Za primjer, Ras protein u normalnoj stanici je ugašen i ne signalizira dok receptor čimbenika rasta ne postane aktiviran i dalje preko serije medijatora aktivira Ras protein, mijenjajući ga iz nepobuđenog u aktivno stanje šaljući daljnje signale koji mogu inducirati proliferaciju. U tumorskim stanicama signalni put je dereguliran; strukturalno promijenjen Ras protein može kontinuirano slati stimulatorne čimbenike rasta u unutarnje dijelove stanice čak i u odsustvu čimbenika rasta (Longo i sur., 2022.).

#### **2.1.4. Mutirani geni tumora**

Geni uključeni u proces karcinogeneze podijeljeni su u dvije široke kategorije onkogeni (mutiranih gena koji aktiviraju proces umnožavanja stanica) i tumor supresorskih gena (antionkogeni, gena koji suzbijaju neoplastičnu preobrazbu), ali podjela također uključuje gene za popravak DNA.

##### **2.1.4.1. Stanični onkogeni**

Geni koji potiču autonomni stanični rast u tumorskim stanicama zovu se onkogeni, dok su protoonkogeni geni koji upravljaju normalnim staničnim rastom i diobom (Kontomanolis i sur., 2020.) Protoonkogeni su fiziološki regulatori stanične proliferacije i diferencijacije (Kontomanolis i sur., 2020.) dok onkogene karakterizira sposobnost promocije staničnog rasta u odsustvu normalnih mitogenih signala. Njihovi produkti, onkoproteini slični normalnim



produktima protoonkogenima sa izuzetkom da su onkoproteini lišeni važnih regulatornih elemenata. Njihova produkcija u transformiranim stanicama postaje konstitutivna, odnosno nezavisna o čimbenicima rasta ili drugim vanjskim signalima. Protoonkogeni mogu biti pretvoreni u onkogene mehanizmima poput točkastih mutacija, delecija i insercija što rezultira:

- Hiperprodukcijom čimbenika rasta
- Preplavljenost stanice čimbenicima rasta
- Nekontroliranom stimulacijom intermedijalnih puteva
- Staničnim rastom povišenim razinama transkripcijskih čimbenika

*RAS* onkogen je najčešće mutirani onkogen kod ljudskih tumora (Chen i sur., 2019.). On kodira Ras protein koji veže GTP koji djeluje kao 'prekidač' brojnih signalnih puteva koji kontroliraju staničnu proliferaciju. Kod normalnih stanica Ras se prolazno aktivira i regrutira Raf u svrhu aktivacije puta MAP kinaze da odašilje signale za promociju rasta u jezgri. Mutirani Ras protein trajno je aktiviran što dovodi do kontinuirane stimulacije stanica bez vanjskog podražaja.

#### **2.1.4.2. Tumor supresor geni**

Tumor supresor geni kodiraju slijedeće proteine:

- Receptore secerniranih hormona koji inhibiraju staničnu proliferaciju
- Negativne regulatore ulaska ili progresije staničnog ciklusa
- Negativne regulature signalnih puteva rasta (npr. *APC* ili *PTEN*)
- Proteine kontrolnih točaka koji zastavljaju stanični ciklus u slučaju oštećenja DNA ili abnormalnih kromosoma
- Proteine popravka DNA, apoptoze, senescencije, te inhibicije angiogeneze

Transformacija normalne u tumorsku stanicu udružena je s gubitkom funkcije jednog ili više tumor supresor gena i obje kopije gena moraju biti poremećene da bi moglo doći do promocije tumorskog rasta.

#### **2.1.5. Etiologija tumora**

Razvoj tumora temelji se na akumulaciji somatskih mutacija kroz životni vijek. Mutacije germinativnih stanica u pravilu nisu uključene u nastanak tumora, ali u rijetkim slučajevima mogu pridonijeti progresiji bolesti. Broj bazalnih mutacija kod ljudi u pravilu je malen, ali može

se povećati preko okolišnih kancerogena koji se mogu podijeliti u tri skupine: kemijski mutageni, zračenje i onkogeni virusi.

Izlaganje mutagenima ili zračenju uvelike povećava broj mutacija i time mogućnost razvoja tumora. Kemijski mutageni sastoje se od različitih skupina kemikalija koje mogu promijeniti DNA kroz razne mehanizme poput alkilacije ili deaminacije DNA baza ili pak preko interkalacije između parova baza i stvaranja adukata DNA. Oksidativni stres također može oštetiti DNA. X zrake i radioaktivno zračenje mogu potaknuti oštećenje dvostruke zavojnice DNA, dok UV zračenje može dovesti do stvaranja pirimidinskih dimera preko unakrsnog povezivanja susjednih pirimidinskih baza. Više virusa, poput HCV, HBV, EBV, HPV mogu uzrokovati tumor (Schiller, 2021.). Mehanizam virusne onkogeneze može se podijeliti u dvije skupine:

- Direktni onkogeni – insercijom dodatnih virusnih onkogeni u stanicu domaćina
- Indirektni onkogeni – izazivanjem dugotrajne nespecifične upale

### ***2.1.6. Mehanizmi popravka DNA***

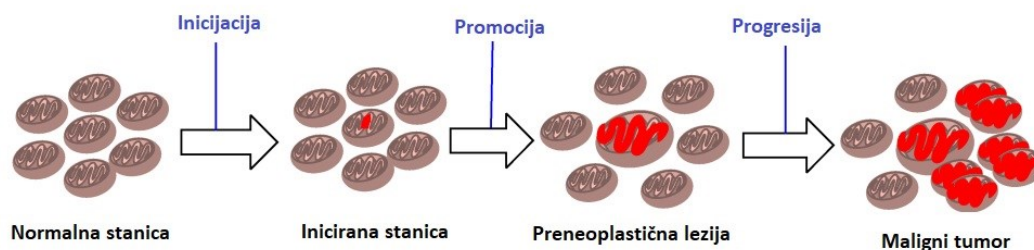
DNA može biti oštećena na razne načine: to mogu biti krivo sparane baze, apurinska i apirimidinska (AP) mjesta, promijenjene baze, jednolančani lomovi, dvolančani lomovi, unakrižno povezivanje lanaca.

Evolucijom su nastali sofisticirani sustavi popravka DNA u svrhu održavanja genoma koji popravljaju oštećenja nastala na DNA (Chatterjee i sur., 2017.). Osnovni mehanizmi popravka DNA uključuju reverziju oštećenja (kao što je fotoreaktivacija, alkiltransferaze), popravke izrezivanja baza i nukleotida, popravak depuriniranih mjesta, popravak lomova dvostruke uvojnice.

### ***2.1.7. Karcinogeneza***

Složen proces koji se odvija kroz više faza zove se karcinogeneza. Sastoji se od stadija inicijacije, promocije, progresije i maligne transformacije (Slika 3). Inicijacija nastaje reakcijom kancerogena i stanične DNA što može rezultirati prekidom lanca DNA ili promjenom nukleotida koju nazivamo aduktom. Adukti nastaju direktno ili nakon metaboličke aktivacije kancerogena. Ukoliko novonastale promjene ne budu popravljene prije replikacije DNA dolazi do trajnog oštećenja, odnosno mutacije gena. Relativno mala populacija stanica koja ima mogućnost diobe i služi za obnovu normalnog tkiva ima mogućnost maligne transformacije. Promocija označuje

proliferaciju iniciranih stanica u višestanični konglomerat sa potencijalom maligniteta. Progresija označuje postupnu evoluciju stanica u kojoj one postupno postaju malignije.



**Slika 3.** Karcinogeneza. Preuzeto i prilagođeno prema Basu, 2018.

### **2.1.8. Invazija i metastaziranje**

Širenje tumorskih stanica na udaljena mjesta organizma putem krvotoka i/ili limfe naziva se metastaziranje i najletalniji je oblik bolesti. Metastatske stanice su manje adhezivne od normalnih stanica i imaju sposobnost razgradnje i penetracije kroz tkivne barijere poput izvanstaničnog matriksa okolnog vezivnog tkiva i bazalne membrane krvnih žila. Nakon ulaska u sistemsku cirkulaciju mogu invadirati normalna tkiva organizma i stvarati sekundarne kolonije. Kaskada invazija-metastaziranje sastoji se od;

- Stjecanje lokalne invazivnosti
- Invazija stanica u krv/limfu (intravazacija)
- Transport preko krvi/limfe u udaljena tkiva
- Bijeg tumorskih stanica iz cirkulacije (ekstravazacija)
- Sposobnost prilagodbe lokalnom tkivnom okolišu i proliferacija

**Epitelno-mezenhimalni prijelaz** je ključni prijelaz koji omogućava stanicama da postanu pokretljive i invazivne i na kraju metastaziraju u druga tkiva (Ouzounova i sur., 2017.).

**Stanična pokretljivost** regulirana je malim G proteinima aktiviranim citoplazmatskim signalnim putevima koji kontroliraju sastavljanje aktinskog citoskeleta

**Stanična invazivnost** pospješena je pretjeranom ekspresijom više oblika matriksnih metaloproteinaza (MMP) koje razgrađuju sastavnice izvanstaničnog matriksa

**Angiogeneza**, stvaranje novih krvnih žila potrebna je solidnim tumorima za nastavak rasta van određene veličine. Najvažniji proteini za održavanje tumorskog rasta su krvožilni endotelni čimbenik rasta (*VEGF*, engl. *Vasculae Endotelial Growth Factor*) i čimbenik rasta fibroblasta (FGF, engl. *Fibroblast Growth Factor*).

### **2.1.9. Stromalni mikrookoliš i karcinogeneza**

Interakcija stromalnih stanica unutar izvanstaničnog matriksa i tumorskih stanica od velike je važnosti za karcinogenezu. Čimbenici koji su bitni za malignu transformaciju:

- Cijepanje komponenti matriksa oslobađa angiogene čimbenike (VEGF) promovirajući rast novih žila i proteolitičkih fragmenata koji omogućuju motilitet tumorske stanice
- Izvanstanični matriks pohranjuje čimbenike rasta u inaktivnim oblicima koji su oslobođeni od strane aktivnih matriksnih proteaza i stimuliraju rast tumorskih stanica na parakrini način.
- Stromalne stanice unutar izvanstaničnog matriksa mogu direktno slati onkogene signale u tumorsku stanicu.

### **2.1.10. Ostali genetski aspekti tumora**

Osim tri glavna tipa gena često izmjenjena u tumorima, tj. tumor supresor geni, protoonkogeni i geni za popravak DNA, postoje još nekoliko genetskih promjena opaženih u tumorima.

#### **2.1.10.1. Genetska nestabilnost tumorskih stanica**

Genetska analiza solidnih tumora otkriva prisutnost visokog stupnja genetskih abnormalnosti poput aneuploidije, kromosomske translokacije i sl. To je vjerovatno posljedica odsustva aktivnog p53 proteina i mogućnosti stanice da izbjegne staničnu smrt kroz apoptozu. Ostali mehanizmi također mogu igrati ulogu poput mitotskih defekata koji rezultiraju pogrešnom segregacijom kromosoma. Kromosomska nestabilnost (CIN, engl. *Chromosomal Instability*) često je prisutna u tumorskim stanicama epitelnog podrijetla, puno rjeđe u hematopoetskim tumorima.

### **2.1.10.2. Promjene genetskih mehanizama u tumorima**

**Gubitak heterozigotnosti:** Genetski događaj često viđen sa tumor supresor genima u tumorima. Budući je humani kariotip diploidan, mutacija jednog alela tumor supresor gena nije dovoljna za razvoj tumora. Kod heterozigota alel divljeg tipa osigurati će funkcionalni fenotip. Kada se dogodi 'drugi pogodak' kao npr, pri pogrešnoj segregaciji kromosoma, jedinka može izgubiti heterozigotnost što vodi u puni tumorski fenotip.

**Mikrosatelitska nestabilnost:** Događaj često viđen u kolorektalnom karcinomu sa defektnim sustavom popravka DNA nepodudarnosti, npr. u hereditarnom nepolipoznom kolorektalnom karcinomu. Mikrosateliti su regije repetitivnih DNA sekvenci unutar genoma koje su sklone skraćivanju ili produljenju ako su enzimi popravka nepodudarnosti defektni. Genetska analiza navedenih regija može se koristiti za identifikaciju takvih defekata.

**DNA hiper ili hipometilacija:** DNA metilacija regija genetskih promotora na CpG (citozin-fosfatgvanin) sekvenci bitan je epigenetski kontrolni mehanizam utišavanja pojedinih gena. Kod tumora, hipermetilacija DNA često je uključena u utišavanje tumor supresorskih gena. Obrnuto, DNA hipometilacija može pridonijeti aktivaciji onkogeni.

## 2.2. TUMORSKI MIKROOKOLIŠ

Tumor nije samo nakupina tumorskih stanica, nego heterogena skupina infiltrativnih i postojećih stanica domaćina, secerniranih čimbenika i izvanstaničnog matriksa. Tumorske stanice stimuliraju značajne molekularne, stanične i fizikalne promjene unutar tkiva domaćina u svrhu rasta tumora i progresije. Tumorski mikrookoliš (TME, engl. *Tumor Microenvironment*) u nastajanju je složen entitet koji kontinuirano evoluirao. Sastav tumorskog mikrookoliša varira između tipova stanica, ali osnovne sastavnice uključuju imunosne stanice, stromalne stanice, krvne žile i izvanstanični matriks. Tumorski mikrookoliš predstavlja skup raznih staničnih i nestaničnih komponenti. Staničnu komponentu TME čine krvožilne stanice (endotelne stanice, periciti), imunosne stanice (neutrofili, monociti, makrofagi, mastociti) te tumoru pridruženi fibroblasti (CAFs). Nestanična komponenta odnosi se na izvanstanični matriks (kolagen, fibronektin, laminin) te na posebno stanje hipoksije koje je jedna od važnijih odlika TME. TME nije tihi promatrač, već aktivni sudionik tumorske progresije (Xiao i sur., 2021.). U ranoj fazi tumorskog rasta stvara se dinamičan i recipročan odnos između tumorskih stanica i sastavnica tumorskog mikrookoliša koji pridonosi preživljenju tumorskih stanica, lokalnoj invaziji i metastatskoj diseminaciji bolesti (Slika 4). U svrhu prevladavanja hipoksičnog i kiselog mikrookoliša tumorski mikrookoliš koordinira aktivnosti koje potiču angiogenezu u svrhu dobivanja kisika i nutrijenata i otklanjanja nusprodukata metabolizma. Tumor postaje infiltriran sa raznim adaptivnim i urođenim imunosnim stanicama koje mogu provoditi pro i antitumorske funkcije.

### 2.2.1. Imunosne stanice

Imunosne stanice su ključne sastavnice tumorskog mikrookoliša. Potvrđena je dihotomija odnosa imunosnih stanica i tumorskog mikrookoliša; imunosne stanice mogu potisnuti rast tumora ili ga mogu poticati. Dugotrajna upala kao posljedica kronične infekcije je čest mehanizam koji je u podlozi stvaranja nekoliko tipa tumora poput kolorektalnog, hepatocelularnog i cervikalnog karcinoma. Općenito, imunosne stanice se mogu podijeliti u dvije kategorije, adaptivne i urođene. Adaptivna imunost se pokreće nakon izlaganja specifičnim antigenima i koristi imunosnu memoriju u procjeni ugroze i poticanja imunosnog odgovora. Stanice T i B pripadaju adaptivnom imunosnom odgovoru. Urođena imunost je nespecifičan obrambeni mehanizam koji

nastupa brzo, unutar nekoliko sati od ulaska stranog antigena u tijelo. Stanice izvršioi urođenog imunosnog odgovora su makrofazi, neutrofil i dendritičke stanice.

### **2.2.1.1. Stanice T**

Svaka stanica T razvija vlastiti T stanični receptor (TCR, engl. *T Cell Receptor*) koji prepoznaje specifičan antigen. Unutar tumorskog mikrookoliša postoji nekoliko različitih populacija stanica T koje utječu na tumorigenezu. Citotoksične stanice T (CD8<sup>+</sup>) prepoznaju abnormalne tumorske antigene izražene na tumorskim stanicama i označuju ih za uništenje. Prisustvo citotoksičnih stanica T u tumorskom mikrookolišu često se povezuje sa dobrom prognozom pacijenata sa malignim oboljenjima (Li i sur., 2020.). Osim što uništavaju tumorske stanice, citotoksične stanice T također suprimiraju angiogenezu sekrecijom  $\gamma$  interferona (IFN- $\gamma$ ). CD4<sup>+</sup> T-stanice se diferenciraju u brojne podtipove i koordiniraju širok spektar imunskih odgovora unutar konteksta tumorskog mikrookoliša. Pomoćničke stanice T (Th-1) stanice su proupalne CD4<sup>+</sup> T-stanice koje potiču CD8<sup>+</sup> stanice sekrecijom interleukina-2 (IL-2) i IFN- $\gamma$ . Povišene razine stanica Th-1 unutar tumorskog mikrookoliša također se povezuju sa dobrim ishodom kod brojnih tipova karcinoma. Regulatorne stanice T (Treg) su potrebne za supresiju upalnog odgovora i kontrolu autoimunosti. Treg stanice su sveprisutne unutar tumorskog mikrookoliša i potiču razvoj i progresiju tumora prigušivanjem protutumorskog imunskog odgovora. Treg direktno potiču preživljenje tumorskih stanica preko sekrecije čimbenika rasta i indirektno preko interakcije sa stromalnim stanicama poput fibroblasta i endotelnih stanica. Imunosni okoliš unutar tumorskog mikrookoliša može se podijeliti u tri kategorije: imunsko infiltriran, isključen od imuniteta i imunsko utišan. U imunsko infiltriranom tumoru, imunskie stanice (poput citotoksičnih stanica T) su homogeno raspoređene kroz čitav tumor što ukazuje na aktivan imunski odgovor. S druge strane, neki tumori su isključeni od imuniteta, u tim slučajevima stanice T se vide samo na periferijama tumora i ne infiltriraju tumorski mikrookoliš. U trećem slučaju, neki tumori su imunsko utišani i imunski odgovor u cijelosti izostaje.

### **2.2.1.2. Stanice B**

Stanice B su specijalizirane imunskie stanice odgovorne za proizvodnju protutijela, predočavanje antigena i sekreciju citokina. U pravilu stanice B budu grupirane na rubovima tumora i često se pronalaze u limfnim čvorovima u bliskosti sa tumorskim mikrookolišem. U usporedbi sa stanicama T, relativno je mali broj infiltrativnih stanica B u tumorskom mikrookolišu, premda

imaju ulogu tijekom tumorigeneze. Tumor infiltrirajuće stanice B važne su u stvaranju 'tercijalnih limfoidnih struktura', ektopičnih limfoidnih struktura stvorenih unutar tumorskog mikrookoliša. Takve strukture omogućuju blisku suradnju stanica T i B i pozitivni su prognostički biljezi u karcinomima dojke, melanomu i raku jajnika. Antitumorske uloge stanica B uključuju predočavanje antigena stanicama T, proizvodnju protutumorskih protutijela i sekreciju citokina, poput IFN- $\gamma$  koji potiču citotoksične imunosne odgovore. S druge strane stanice B mogu imati protumorska svojstva i njihovo prisustvo u tumorskom mikrookolišu može značiti loš ishod u karcinomu mjehura, raku prostate i karcinomu bubrežnih stanica. Slično kao i sa Treg stanicama, regulatorne stanice B potiču agresiju tumora preko stvaranja citokina (IL-10 i TGF- $\beta$ ) koji potiču imunosupresivne fenotipove makrofaga, neutrofila i citotoksičnih stanica T (Hinshaw i sur., 2019.).

### **2.2.1.3. Stanice NK**

NK stanice kruže krvotokom tražeći virusom zaražene stanice domaćina i tumorske stanice. Funkcionalno se mogu podijeliti na dvije skupine, one koje direktno sudjeluju u stanično-posredovanom uništenju tumorskih stanica i na drugu skupinu koja luči antiupalne citokine. Učinkovite su u uništavanju tumorskih stanica unutar cirkulacije, ali manje su učinkovite u tumorskom mikrookolišu.

### **2.2.1.4. Makrofazi**

Makrofazi su ključna komponenta urođenog imunosnog sustava koji moduliraju imunosni odgovor fagocitozom patogena i predočavanjem antigena (Vitale i sur., 2019.). Također su bitni u cijeljenju rane i popravku tkiva. Makrofazi podrijetlom iz monocita mogu se svrstati u M1 upalni fenotip koji fagocitira i ubija stanice ili imunosupresivni M2 fenotip koji sudjeluje u cijeljenju rane. Premda se oba tipa makrofaga mogu naći unutar tumora, tumorski mikrookoliš potiče M2 fenotip preko hipoksije i sekrecije citokina (IL-4) u svrhu rasta i progresije tumora. Pojedine vrste tumora mogu biti jako infiltrirane makrofazima, koji mogu činiti do 50% tumorske mase. U pravilu, jaka infiltracija makrofazima udružena je sa lošom prognozom u više tipova tumora poput karcinoma dojke, pluća i želuca. Makrofazi često okružuju krvne žile u tumorskom mikrookolišu gdje luče VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) i induciraju stvaranje novih žila.

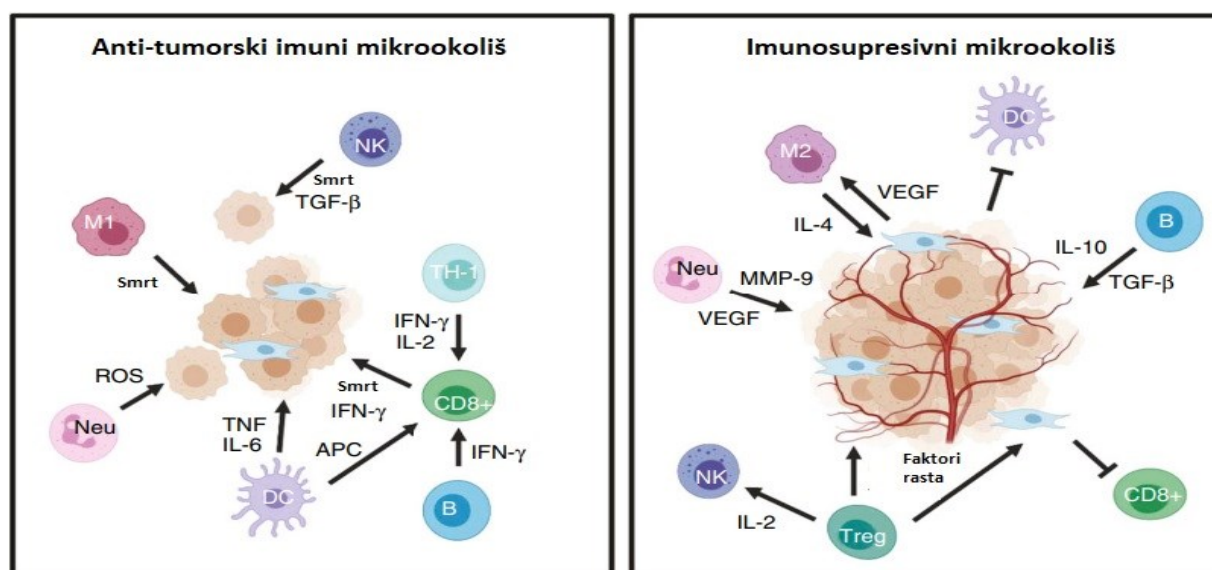


### 2.2.1.5. Neutrofil

Neutrofil čine do 70% cirkulirajućih leukocita i pružaju prvu liniju obrane protiv mnogih patogena (Kim i sur., 2016.). Neutrofil mogu suprimirati ili poticati rast tumora, ovisno o tipu tumora i stadiju razvoja. Tijekom rasta tumora neutrofil se novače u tumorski mikrookoliš i potiču upalu oslobađanjem citokina i ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*) koji potiču apoptozu tumorskih stanica. U kasnijim stadijima razvoja tumora, neutrofil potiču rast tumora modifikacijom izvanstaničnog matriksa, otpuštanjem VEGF i stvaranjem MMP-9 (engl. *Matrix Metalloprotease 9*) u svrhu poticanja angiogeneze, progresije tumora i lokalne invazije.

### 2.2.1.6. Dendritičke stanice

Dendritičke stanice igraju važnu ulogu u imunom sustavu kao antigen predočne stanice; prepoznaju, hvataju i predočavaju antigene stanicama T u sekundarnim limfnim organima (poput limfnih čvorova) (Verneau i sur., 2020.). Premošćavaju prazninu između adaptivnog i urođenog imunog sustava u svrhu započinjanja patogen specifičnog odgovora T. Sudbina dendritičkih stanica u tumorskom mikrookolišu temelji se na signalima koji potiču antitumorski odgovor ili toleranciju. Same po sebi dendritičke stanice su programirane da bi imale antitumorsku ulogu u organizmu, ali tumorski mikrookoliš može re-programirati dendritičke stanice da podržavaju progresiju tumora. Citokini izlučeni od strane tumorskog mikrookoliša izazivaju dendritičkim stanicama toleranciju na postojanje tumora i blokiraju započinjanje imunog odgovora.



**Slika 4.** Dvojaka uloga imunih stanica u tumorskom mikrookolišu. Preuzeto i prilagođeno prema Anderson i Simon, 2020.

### **2.2.2. Stromalne stanice**

Tumorske stanice novače potporne stanice iz okolne endogene tkivne strome u svrhu promocije kritičnih koraka u formiranju tumora i kao takve čine važnu sastavnicu tumorskog mikrookoliša. Sastav stromalnih stanica može znatno varirati između raznih tipova tumora i uključuje krvožilne endotelne stanice, fibroblaste, adipocite i stelatne stanice. Jednom kada se stromalne stanice unovače u tumorski mikrookoliš, luče mnoge čimbenike koji utječu na angiogenezu, proliferaciju, invaziju i metastaziranje.

#### **2.2.2.1. Endotelne stanice**

Krvožilni endotel je tanak jednoslojni sloj endotelnih stanica koji pomažu u organizaciji stvaranja krvnih žila. On ne služi samo za odvajanje cirkulirajuće krvi od tkiva, već sudjeluje u dostavi vode i nutrijenata, održavanju metaboličke homeostaze, prenošenju imunskih stanica i sudjeluje u stvaranju novih krvnih žila (Sobierajska i sur., 2020.). Tijekom početnih stadija tumorskog razvoja, tumorske stanice vrše razmjenu plinova i nutrijenata pasivnom difuzijom. Kada tumor dosegne volumen od 1-2 mm<sup>3</sup>, nedostatak kisika i nakupljanje nusprodukata metabolizma rezultira hipoksičnim i kiselim mikrookruženjem tumora. Da bi nadvladali spomenuti problem, tumori moraju razviti vlastitu krvnu opskrbu. Hipoksičan tumorski mikrookoliš vodi ka aktivaciji hipoksijom induciranih čimbenika (HIF, engl. *Hypoxia Inducible Factors*) – transkripcijskih čimbenika važnih za koordinaciju staničnog odgovora na nisku koncentraciju kisika (Cowman i sur., 2022.). Nicanje krvnih žila čest je mehanizam koji koriste tumori u svrhu iskorištavanja postojećih krvnih žila i induciranja rasta novih žila. HIF pokreće nicanje žila potičući endotelne stanice da luče proangiogene čimbenike poput PDGF (engl. *Platelet Derived Growth Factor*), EGF (engl. *Epidermal Growth Factor*) i VEGF. VEGF stimulira migraciju endotelnih stanica da formiraju lumene novih krvnih žila autokrinim i parakrinim načinom dok endotelne stanice luče proteine za formiranje novih bazalnih membrana. Krvne žile u tumorskom mikrookolišu često ne dostignu zadnji stupanj sazrijevanja, što rezultira propustljivim krvožiljem. Endotelne stanice su važne u poticanju stanične migracije, invazije i migracije. Tijekom tumorske progresije endotelne stanice prolaze proces koji se naziva endotelno – mezenhimalna tranzicija i postaju tumoru pridruženi fibroblasti. Ta tranzicija je pod kontrolom TGF-β i koštanog morfogenetskog proteina (BMP, engl. *Bone Morphogenic Protein*) i vodi do gubitka međustaničnih sveza, odvajanjima i produljenju, pospješenoj migraciji i gubitka endotelnih svojstava. Tumoru pridruženi fibroblasti potiču migraciju i invaziju tumorskih stanica. Metastaziranje je višefazni proces koji uključuje

translokaciju tumorskih stanica od primarnog mikrookoliša na udaljena mjesta. Tumorske stanice prvo moraju pobjeći sa mjesta primarnog tumora i ući u žile tijekom procesa koji se zove intravazacija. Tijekom intravazacije tumorske stanice adheriraju na endotelne stanice i ta interakcija mijenja endotelnu barijeru dozvoljavajući tumorskim stanicama migraciju između dvije endotelne stanice. Krvne žile stvorene u tumorskom mikrookolišu uobičajeno su nezrele i loših međustaničnih sveza što omogućava tumorskim stanicama bijeg iz krvožilja.

#### **2.2.2.2. Tumoru pridruženi fibroblasti**

Tumoru pridruženi fibroblasti su sastavnica tumorske strome i igraju bitnu ulogu u olakšavanju međustanične komunikacije tumorskih stanica i tumorskog mikrookoliša (Liao i sur., 2019.). Premda često nastaju iz fibroblasta tkiva domaćina, mogu se razlikovati u smislu podrijetla, nastajući iz stanica poput adipocita, endotelnih stanica, pericita, zvjezdastih stanica i mezenhimalnih matičnih stanica koštane srži. Nakon ozljede fibroblasti koji normalno prebivaju unutar tkiva mogu postati reverzibilno inducirani na način da tvore miofibroblaste koji aktivno sudjeluju u cijeljenju rane. Miofibroblasti su aktivirani sa TGF- $\beta$  signalnim putem i razvijaju karakteristike bitne za cijeljenje rane, poput proliferacije, kontraktilnih svojstava, sekretornih fenotipova i formiranje izvanstaničnog matriksa. Tumori se često nazivaju 'ranama koje nikada ne cijele'. U tumorskom mikrookolišu, tumori i stromalne stanice luče čimbenike poput TGF- $\beta$ , PDGF i FGF 2 (engl. *Fibroblast Growth Factor 2*) u svrhu pretvorbe fibroblasta u tumoru pridružene fibroblaste (Shi i sur., 2022.). Nakupljanje tumoru pridruženih fibroblasta unutar tumorskog mikrookoliša često je udruženo sa lošom prognozom u više tipova tumora, uključujući kolorektalni karcinom. Kod kolorektalnog karcinoma, prisutnost tumoru pridruženih fibroblasta snažno je povezana sa povratom bolesti. Unatoč navedenim svojstvima, tumoru pridruženi fibroblasti mogu poticati i ograničavati tumorigenezu. Neki tipovi tumora poput karcinoma dojke i pluća imaju bolju prognozu i preživljenje u slučaju prisutnosti gustog fibroznog tkiva (dezmoplastični tumori). Unutar tumorskog mikrookoliša, tumoru pridruženi fibroblasti proizvode većinu izvanstaničnih komponenti uključujući čimbenike rasta, citokine i komponente izvanstaničnog matriksa. Navedene stanice oblikuju tumorski mikrookoliš djelujući na tumorsku proliferaciju i metastaziranje, neoangiogenezu, preoblikovanje izvanstaničnog matriksa i imunosupresiju. Kod tumora epitelnog podrijetla, epitelno-mezenhimalna tranzicija ključan je korak pri metastaziranju, kada epitelne stanice izgube stanični polaritet i međustaničnu adheziju stječu sposobnost migracije i invazije. Tumoru pridruženi fibroblasti kontroliraju metastaziranje

sekrecijom TGF- $\beta$  potičući epitelno-mezenhimalni prijelaz i angiogenezu. U svrhu olakšavanja migracije tumorskih stanica kroz tumorski mikrookoliš tumoru pridruženi fibroblasti luče MMP-3 koji razgrađuje E-kadherin i potiče invaziju tumorskih stanica. Izvanstanični matriks je važan izvor VEGF nastalog djelovanjem MMP-13 inducirane u fibroblastima u svrhu poticanja angiogeneze. Zaključno, tumoru pridruženi fibroblasti potiču imunosupresivan fenotip preko produkcije imunomodulatornih kemokina i citokina.

### **2.2.2.3. Adipociti**

Adipociti su specijalizirane stanice tijela koje reguliraju energetske balans i odgovorne su za skladištenje viška energije u obliku masti. Učinak adipocita na tumorski mikrookoliš očituje se preko sekrecije metabolita, enzima, hormona, čimbenika rasta i citokina. Unutar konteksta tumorskog mikrookoliša, adipociti su u dinamičnom i recipročnom odnosu sa tumorskim stanicama u smislu progresije tumora. Tkivo dojke je većinski sastavljeno od masti, te su stoga adipociti izrazito bitni u tumorskom okolišu karcinoma dojke. Stanice karcinoma dojke mogu stimulirati adipocite na lipolizu čime nastaju slobodne masne kiseline spremne za unos od strane tumorskih stanica (Maguire i sur., 2021.). Tumorske stanice tada koriste slobodne masne kiseline za proizvodnju energije, stvaranje stanične membrane, lipidne bioaktivne molekule i egzosome. Leptin je bitan hormon kojeg proizvode adipociti koji direktno potiče tumorsku progresiju utječući na proliferaciju tumorskih stanica karcinoma dojke i indirektnim načinom aktivacijom makrofaga. Adipociti također imaju bitnu ulogu u oblikovanju izvanstaničnog matriksa lučenjem metaloproteinaza poput MMP-1, MMP-7, MMP-10, MMP-11 i MMP-14. Više od 40% pacijenata sa tumorima su pretili što čini pretilost čimbenikom rizika za mnoge tipove karcinoma uključujući dojku, gušteraču i jajnik.

### **2.2.2.4. Zvezdaste stanice**

Zvezdaste stanice su u stanju mirovanja unutar strome, mezenhimalnog su podrijetla, a nalaze se unutar jetre i gušterače. Nakon ozljede tkiva postanu aktivne, ulaze u stanični ciklus i pretvaraju se u miofibroblaste. Karakteristika zvezdastih stanica je taloženje vitamina A u kapljicama lipida. Jetrene zvezdaste stanice nalaze se u perisinusoidnim i portalnim prostorima jetre i mogu činiti do 15% jetrene mase. Hepatocelularni karcinom (HCC) je najčešći maligni tumor jetre i zvezdaste stanice potiču signalizaciju unutar tumorskog mikrookoliša. TGF- $\beta$  je ključna signalna molekula koju proizvodi HCC i on aktivira zvezdaste stanice. Kada su aktivirane, mijenjaju

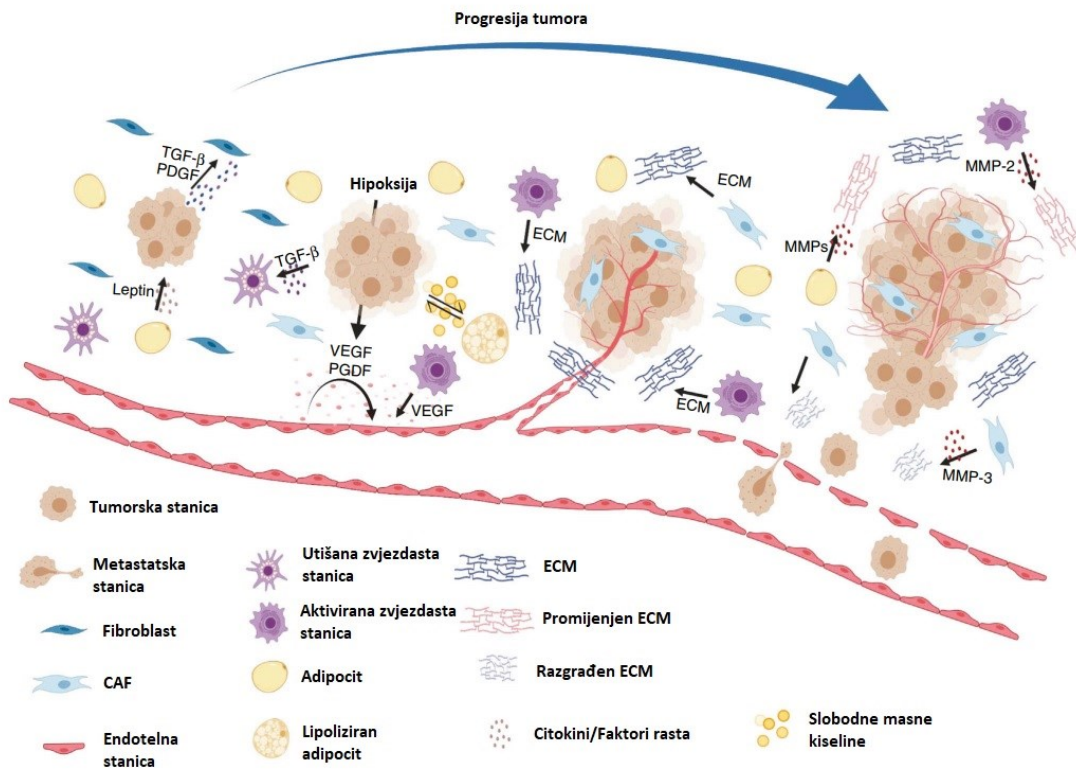
izvanstanični matriks i proizvode proangiogene čimbenike poput VEGF i MMP-2. Lipidne kapljice u jetrenim zvjezdastim stanicama stvaraju novi izvanstanični matriks i modeliraju ga proizvodnjom MMP.

### ***2.2.3. Nestanične sastavnice tumorskog mikrookoliša***

Izvanstanični matriks je dio nestaničnih sastavnica tumorskog mikrookoliša, sastavljen je od kolagena, fibronektina, elastina i laminina koji pružaju strukturnu i biokemijsku potporu okolnim stanicama. Solidni tumori sadrže velike depozite izvanstaničnog matriksa koji čine do 60% tumorske mase. Veliki depoziti kolagena zajedno sa velikim postotkom infiltracije fibroblastima rezultira promjenom fenotipa strome-epitelijom (hiperplazija tumorskih fibroblasta (miofibroblasta), pojačano stvaranje vezivnog tkiva, posebice kolagena, sinteza epitelnih čimbenika rasta, dezorganizacija obrazaca rasta i povišena proliferacija), koja je povezana s lošom prognozom pacijenta. Mnoge stanice unutar tumorskog mikrookoliša luče sastavnice izvanstaničnog matriksa, premda su tumoru pridruženi makrofazi predominantan izvor. MMP su proteaze koje razaraju proteine izvanstaničnog matriksa potičući progresiju tumora i metastaza. Izvanstanični matriks je skladište citokina i čimbenika rasta (VEGF, FGF, PDGF, TGF- $\beta$ ) koji se oslobađaju djelovanjem proteaza uključujući MMPs.

#### **2.2.3.1. Egzosomi**

Egzosomi su mikrovezikule veličine od 30-200 nm. Sadržaj tih vezikula odražava podrijetlo stanica od kojih su nastale, uključujući proteine, RNA, DNA i lipide. Unutar tumorskog mikrookoliša egzosomi su bitni radi signalizacije između tumorskih stanica i strome. Funkcionalno, promoviraju upalu, progresiju tumora, angiogenezu i metastaziranje unutar tumorskog mikrookoliša. Stanje hipoksije pojačava produkciju egzosoma od strane tumorskih stanica i potiče tranziciju stromalnih stanica u tumoru pridružene fibroblaste.



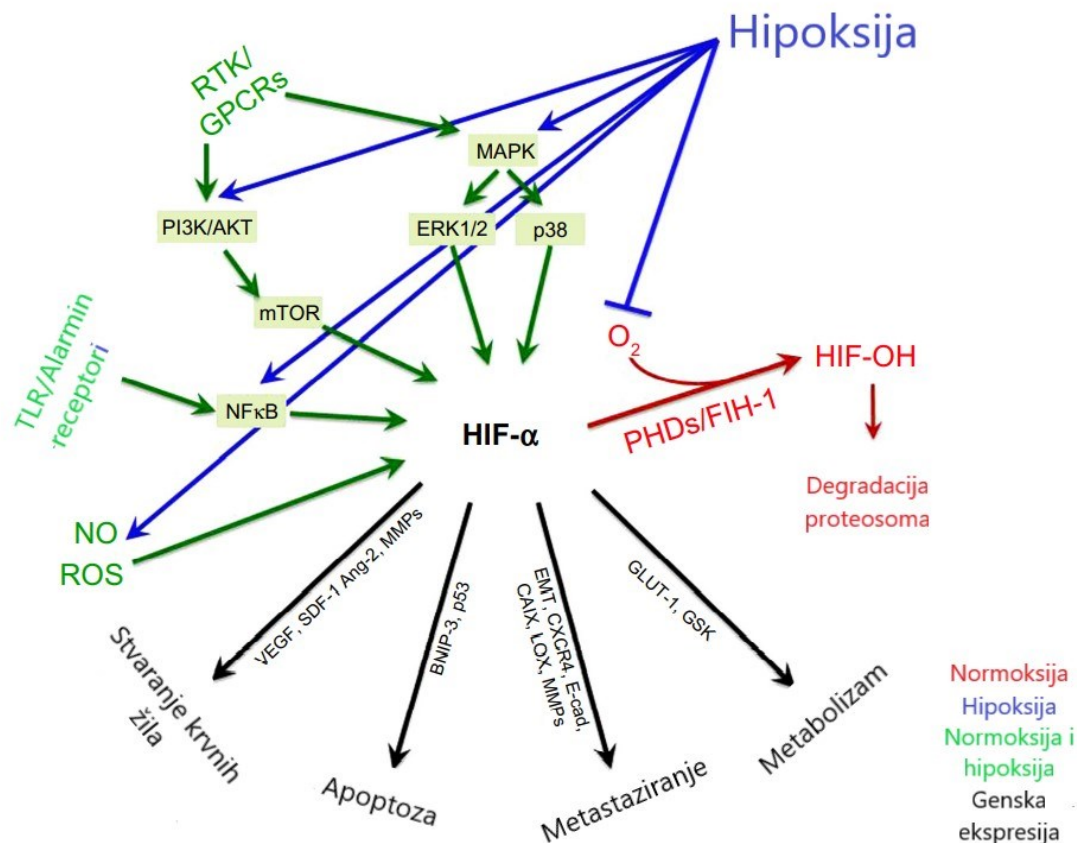
**Slika 5.** Dinamičan odnos stromalnih i tumorskih stanica u TME. Preuzeto i prilagođeno prema Anderson i Simon, 2020.

## 2.3. HIPOKSIJA

Hipoksija je stanje smanjene količine kisika u stanicama i tkivima koje dovodi do disfunkcije stanica, organa i organskih sustava. Hipoksija tkiva javlja se kao posljedica neadekvatne opskrbe kisikom koja kompromitira biološke funkcije. Uzroci hipoksije mogu biti: 1. niski parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi kao posljedica npr. plućnih bolesti ili boravka u visinama; 2. smanjene sposobnosti krvi da prenosi kisik kao posljedica anemije, stvaranja methemoglobina ili trovanja ugljikovim monoksidom; 3. smanjena perfuzija tkiva, generalizirana ili lokalna; 4. promjena difuzijske geometrije kisika; 5. intoksikacija – cijanid.

Stanice, pa tako i tumorske trebaju kisik za metabolizam. Neadekvatna vaskularizacija tkiva dovodi do hipoksije ili ekstremnije anoksije. Za razliku od normalnih stanica koje ne mogu dugo preživjeti u hipoksičnim uvjetima tumorske stanice imaju sposobnost preživljenja i proliferacije u hipoksičnom okolišu što je rezultat genetskih i adaptivnih promjena koji dovode do aktivacije onkogenih i/ili inaktivacije tumor supresor gena što rezultira otpornošću na hipoksiju (Slika 6).

Hipoksija pokreće brojne kompleksne unutarstanične signalne puteve poput HIF puta (engl. *Hypoxia Inducible Factor*). Drugi putevi vezani uz hipoksiju uključuju PI3K/AKT/mTOR, MAPK i NFκB. Ti putevi su uključeni u proliferaciju stanice, preživljenje, apoptozu, metabolizam, migraciju i upalu. PI3K/AKT/mTOR, MAPK i NFκB putevi mogu biti stimulirani neovisno o uvjetima hipoksije raznim čimbenicima poput citokina, kemokina i čimbenika rasta koji se vežu na receptore tirozin kinaze, receptore sparnene s G proteinom, TLR/alarmin receptore koji mogu voditi aktivaciji HIF-1α. Kod tumorskih stanica epigenetske promjene i stečene mutacije sudionika signalnih puteva i pretjerana aktivacija receptora dovodi do nekontroliranog rasta tumora.



**Slika 6.** HIF regulacija u normoksičnim i hipoksičnim uvjetima. Preuzeto i prilagođeno prema Muz i sur., 2015.

### 2.3.1. HIF

Glavni regulatori staničnog odgovora na hipoksiju sastoje se od heterodimerskog kompleksa sastavljenog od konstitutivne jezgrene jedinice HIF- $\beta$  i citoplazmatske jedinice HIF- $\alpha$  (uglavnom HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ ) ovisne o kisiku. Stabilizacija HIF- $\alpha$  regulirana je skupinom enzima ovisnih o kisiku i željezu, poznatih kao enzimi HIF-prolil hidroksilazne domene (PHD 1-3). U uvjetima normoksije PHD enzimi hidroksiliraju dva prolilna ostatka na HIF- $\alpha$  čime se omogućuje vezanje von Hippel-Lindau (VHL) tumor supresorskog proteina što dovodi do ubikvinizacije i proteosomske degradacije ove podjedinice.



U hipoksičnim uvjetima dolazi do inhibicije hidroksilacije prolinskih i asparaginskih ostataka što dovodi do stabilizacije HIF-1 $\alpha$  podjedinice i povećane međureakcije s njenim koaktivatorima (Liu i sur., 2015). Inhibicija razgradnje HIF-1 $\alpha$  podjedinice dovodi do njenog nakupljanja i translokacije iz citosola u jezgru preko međureakcije s mikrotubulima (Koyasu i sur., 2018.). Nazočnost HIF-1 $\alpha$  podjedinice u jezgri dovodi do njene međureakcije s HIF-1 $\beta$  podjedinicom pri čemu formiraju heterodimer HIF-1 koji se veže unutar regije elementa hipoksijskog odgovora (engl. *Hypoxia Response Element*, HRE) koja se nalazi unutar promotora HIF-1 reguliranog gena i time potiče transkripciju gena povezanih sa različitim učincima uključenim u razrješavanje hipoksičnog stresa uključujući eritropoezu, angiogenezu, metabolizam i upalu (Mamlouk, Wielockx, 2013.; Franke i sur., 2013.) HIF 1- $\alpha$  je ubikvitarno izražen, dok je HIF-2 $\alpha$  izražen selektivno, primarno u odraslim plućima, srcu, bubregu i jetri, te specijaliziranim stanicama poput endotela i eritropoetin producirajućih stanica u bubrezima (Cowman i sur., 2020.). Kod imunskog sustava, HIF-1 $\alpha$  izražen je u svim urođenim i adaptivnim imunskim populacijama, dok je HIF-2 $\alpha$  izražen samo u nekim imunskim stanicama uključivši monocite/makrofage. Uravnotežena ekspresija obje izoforme ima velik utjecaj na polarizaciju stanica T i makrofaga.

PHD izoforme pokazuju preklapajuće kao i zasebne uloge. PHD2 se opisuje kao glavni regulator puta hipoksije.

HIF-1 $\alpha$  proteini su negativno regulirani inhibitorom ovisnom o kisiku (FIH-1) (engl. *Factor Inhibiting HIF-1*) koji je asparaginil hidroksilaza koja hidroksilira asparaginske ostatke na C-terminalnoj transaktivacijskoj domeni (TAD) i sprečava interakciju proteina sa transkripcijskim koaktivatorom p300 (Koivunen i sur. 2018.). Između 3 HIF- $\alpha$  izoforme, HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  su visoko homologni i prepoznaju hipoksija odgovorne elemente (HRE, engl. *Hypoxia Responsive Elements*) u regijama promotora gena HIF-1 na poziciji 546 i 143 (Weidemann, 2008.). HIF-3 $\alpha$  uključen je u negativnu regulaciju hipoksičnog odgovora kao inhibitorni protein PAS domene.

Zbog raznolikog karaktera tumora koji sadrži hipoksične i upalne fenotipove, signalni putevi su aktivirani simultano i učestalo dijele brojne ciljne gene. HIF-1 $\alpha$  i NF $\kappa$ B zajedno reguliraju preko 1000 gena, te tako kontroliraju maligni i metastatski fenotip tumorskih stanica na slijedeće načine: 1. potiču stanično preživljenje brojnim čimbenicima rasta i inhibicijom proapoptotskih puteva; 2. doprinose tumorskoj neovaskularizaciji preko VEGF, VEGF receptora, COX-2, iNOS; 3. reguliraju otpuštanje stanica smanjenom regulacijom adhezijskih molekula poput kadherina; 4.

induciraju migraciju stanica i invaziju preko enzima za razgradnju matriksa. HIF i NF $\kappa$ B putevi kontrolirani su mehanizmom negativne povratne sprege i prekidaju se sa alarminima. Oštećenje tkiva i nekroza prouzročena hipoksijom povećava prisustvo alarmina, endogenih biljega oštećenja koje prepoznaje receptor za napredne glikacijske završne produkte RAGE (RAGE, engl. *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*). Ekspresija RAGE receptora pojačano je regulirana sa HIF-1 $\alpha$  (Taneja i sur., 2021.). Receptori alarmina snažno aktiviraju NF $\kappa$ B i proupalnu gensku ekspresiju. Bazalna HIF-1 $\alpha$  mRNA ekspresija regulirana je sa NF $\kappa$ B u nehipoksičnim uvjetima budući je promotor HIF-1 $\alpha$  osjetljiv na pojedine NF $\kappa$ B podjedinice. Signalni put HIF potreban je tijekom fizioloških procesa i regulira ekspresiju stotina gena. Olakšava rast tumora potičući angiogenezu preko VEGF i SDF-1, metabolizam preko regulacije GLUT-1 i GLUT-3 i glikolitičkih enzima, regulaciju stanične apoptoze i staničnog preživljenja preko BNIP-3, p53, TGF- $\beta$  i bFGF. HIF- $\alpha$  pridonosi metastaziranju mijenjajući adhezivnost i motilitet stanice regulacijom epitelno-mezehimalne tranzicije i ekspresije E-kadherina, ZEB-1-2 i TCF3 kao i migraciju i invaziju preko CXCR4, CAIX, LOX, MMP-2 i MMP-9.

### ***2.3.2. Uloga hipoksije u progresiji i metastaziranju tumora***

Glavni stanični odgovori na hipoksiju potaknuti pretjeranom ekspresijom HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  podjedinica pojačavaju stvaranje krvnih žila, malignitet tumora, metastaziranje i otpornost na terapiju.

#### **2.3.2.1. Stvaranje krvnih žila**

Hipoksija potiče nesrazmjer između proizvodnje pro i antiangiogenih čimbenika što vodi ubrzanom i kaotičnom formiranju krvnih žila (Ahluwalia i sur., 2012.). Hipoksija i HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  uključeni su u sve korake stvaranja novih krvnih žila. Pridonose novačenju endotelnih progenitornih stanica iz koštane srži i indukciji njihove diferencijacije u endotelne stanice regulacijom VEGF-a. Proces je posredovan stimulacijom proizvodnje proangiogenih molekula poput VEGF-R2, članova FGF obitelji i PDGF koji utječu na stvaranje primitivne krvožilne mreže. Hipoksija i HIF- $\alpha$  također su uključeni u angiogenetske procese induciranjem ekspresije enzima poput MMP u svrhu pupanja i diobe postojećih žila migracijom endotelnih stanica pod utjecajem kemoatraktanta preko izvanstaničnog matriksa. Hipoksija inducira proliferaciju endotelnih stanica regulacijom VEGF-R1, Ang-1 i Ang-2 ekspresije te sazrijevanje žila indukcijom Ang-1, PDGF i TGF- $\beta$  koji potiču novačenje potpornih stanica poput glatkih

mišićnih stanica i pericita stvarajući zrele i stabilne krvne žile. Međutim, neovaskulatura u tumorima je često abnormalna, nezrela i porozna.

### **2.3.2.2. Metastaziranje**

Pojačana angiogeneza udružena je sa metastaziranjem budući porozna i heterogena vaskulatura olakšava ekstravazaciju, cirkulaciju i migraciju tumorskih stanica u nova, nezahvaćena tkiva i bijeg od hipoksičnog okruženja. Oksigenacija tumora je ključan čimbenik progresije tumora i pretjerane ekspresije HIF- $\alpha$  podjedinica tumora i njihovih metastaza i povezana je sa agresivnošću većine ljudskih tumora te korelira sa lošim preživljenjem. Hipoksija utječe na promjene u genskoj ekspresiji, posebice gena uključenih u metabolizam glukoze, stanične proliferacije, migracije i angiogeneze pospješujući invaziju i migratorno ponašanje tumorskih stanica preko epitelno mezenhimalne tranzicije (EMT). EMT je u fiziološkim uvjetima aktivna tijekom embriogeneze i regeneracije tkiva ali i tijekom kancerogeneze više tipova solidnih i hematoloških tumora. Hipoksijom izazvan EMT-om karakterizirana je smanjenom ekspresijom gena vezanih uz epitel poput E-kadherin,  $\beta$ -katenin i porastom ekspresije mezehimalnih gena poput N-kadherin, vimentin, SMA i CXCR4 (Wong i sur., 2018.). EMT potiče glavni regulator TGF- $\beta$ , također povišen u hipoksiji, koji aktivira nizvodno smještene transkripcijske čimbenike poput Smad, Snail, Slug i Twist i inhibira ekspresiju E-kadherina. Radio- i kemo-rezistencija također je udružena sa EMT fenotipom; ekspresija Snail i Slug antagonizira p53 u potaknutu apoptozu i potiče rezistentnost na zračenje i kemoterapeutike poput paklitaksela i cisplatine u stanicama karcinoma jajnika. HIF-1 $\alpha$  je eksprimiran u 90% humanih karcinoma želuca. Inhibicija HIF značajno smanjuje metastaze karcinoma želuca *in vivo* i HIF deficijentne stanice su slabije pokretljive, invazivne i adhezivne *in vitro*.

### **2.3.2.3. Rezistentnost na zračenje i lijekove**

Otpornost tumorskih stanica na apoptozu izazvanu terapijom jedna je on najvećih prepreka u terapiji tumora. Velik broj pacijenata dobije recidiv kao posljedicu mikro-rezidualne bolesti, rezistentne subpopulacije tumorskih stanica koja vodi k lokalnom povratu bolesti i/ili metastazama. Tumorska hipoksija razvije se radi nekontrolirane proliferacije, izmjenjenog metabolizma i abnormalnih krvnih žila što dovodi do smanjenog prijenosa kisika i nutrijenata. Hipoksija je letalna za mnoge stanice, subpopulacija tumorskih stanica može se adaptirati hipoksičnim uvjetima i postati rezistentna na kemo - i radioterapiju. Smanjena oksigenacija

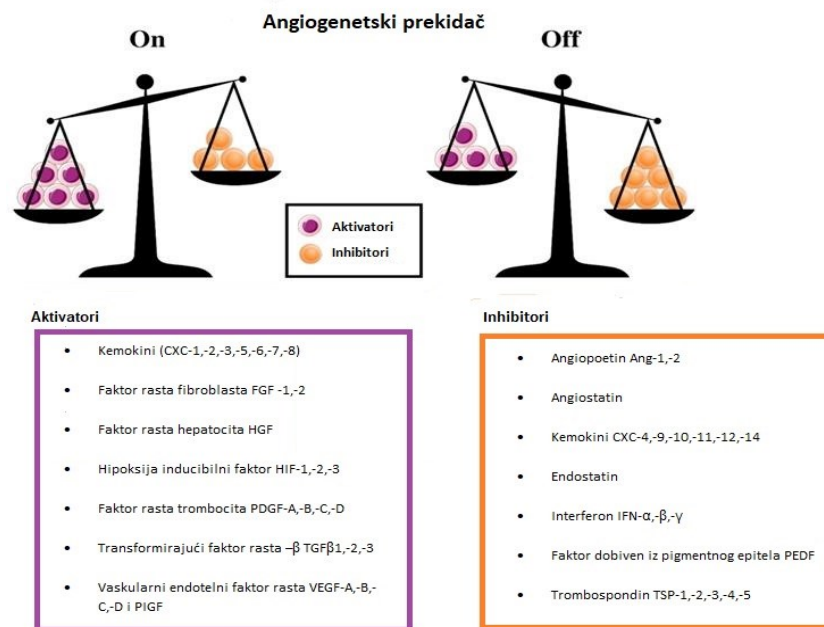
tumorskih tkiva potiče kemorezistenciju djelujući na dostavu lijeka i stanični unos preko promjena u pH vrijednosti, ekspresiji križne otpornosti preko P-glikoproteina (P-gp) kao i manjkom kisika potrebnog za citotoksičnost velikog broja kemoterapeutika. Jedna od najbitnijih parametara radiorezistencije je oksigenacija, stanje staničnog ciklusa, priroda radijacije. Kada ima dovoljno kisika, normoksične stanice su osjetljive na zračenje radi 'fiksacije kisika' gdje dostupnost molekula kisika u reakciji sa slobodnim radikalima u DNA stvorenim ionizirajućim zračenjem dovodi do nepopravljivih oštećenja DNA. Stanice ozračene u hipoksičnim uvjetima rezistentne su na smrt radi smanjene produkcije DNA radikala što je uzrokovano smanjenim stvaranjem ROS-a i smanjenjem oštećenja DNA. Faza staničnog ciklusa određuje radiosenzivitet tumora. Stanice su najosjetljivije u G2/M fazi ciklusa kada su mehanizmi za popravak DNA najviše skloni gubitku funkcije. Zračenje potiče HIF-1 aktivnost što dovodi do proizvodnje angiogenetskih molekula poput VEGF koji štiti endotelne stanice od radijacijski inducirane apoptoze.

#### **2.3.2.4. Tumorski mikrookoliš**

U hipoksičnom tumorskom tkivu, uz tumorske stanice i tumorski mikrookoliš je pod utjecajem hipoksijom izazvanih promjena. Hipoksija potiče metaboličke i molekularne promjene endotelne stanice, povećava ekspresiju proangiogenih molekula, stvaranje krvnih žila i time osigurava više kisika i nutrijenata za tumorske stanice. Hipoksija također regulira upalne medijatore i čimbenike rasta koji tada stimuliraju trombocite, leukocite i aktivnost glatkih mišićnih stanica. Jedna od najznačajnijih promjena je porast adhezivnosti endotelne stanice prema neutrofilima, novačenje NK stanica i lokalna upalna reakcija. Ovisno o trajanju nedostatka kisika, hipoksija regulira ekspresiju NO sintaze i time potiče vazokonstrikciju. Stromalne stanice olakšavaju rast tumora i tumorsku diseminaciju najvećim dijelom regulacijom adhezije tumorskih stanica. Hipoksija potiče stromalne stanice na lučenje brojnih čimbenika – Ang-2, ANGPTL-4, PDGF, VEGF, SDF-1, LOX i SCF čime potiču stvaranje novih krvnih žila i limfangiogenezu. SDF-1 privlači tumorske stanice i olakšava metastaziranje. Hipoksija vodi prema imunosnoj rezistentnosti i imunosupresiji što pomaže tumorskim stanicama bijeg od imunosnog nadzora. Neki od učinaka imunosupresije su: 1. gubitak imunosnih molekula prepoznavanja tumorskom hipoksijom što rezultira smanjenom osjetljivošću prema djelovanju stanica T i NK; 2. inhibicija sazrijevanja T i dendritičkih stanica i stvaranja citokina; 3. poticanje supresivnih stanica poput regulatornih stanica T i tumoru pridruženih makrofaga koji sprečavaju imunosnosne efektorne stanice.

## 2.4. MOLEKULARNA BIOLOGIJA TUMORSKE ANGIOGENEZE

Angiogeneza je kod tumora mehanizam stvaranja novih krvnih žila od postojećih u svrhu krvne opskrbe tumora. Razvoj i progresija tumora i njegovih metastaza rezultat su učinkovitog razvoja krvožilnog sustava (Lugano i sur., 2020.). Tumori mogu narasti do otprilike 1–2 mm<sup>3</sup> veličine prije nego im se ograniče metaboličke potrebe zbog granice difuzije kisika i hranjivih sastojaka. Za daljnji rast tumor prelazi na angiogeni fenotip. Pravilan tijek ovog procesa važan je u mnogim fiziološkim stanjima poput embrionalnog razvoja, normalnom rastu tkiva, održavanja reproduktivne funkcije žene (ovulacija, obnova endometrija nakon menstruacije, stvaranje žutog tijela, placencija tijekom trudnoće) te procesa zacjeljivanja rana. Regulacija intenziteta angiogeneze ovisi o ravnoteži angiogenih i angiostatskih (antiangiogenih) čimbenika (Slika 7).



**Slika 7.** Angiogenetski prekidač. Preuzeto i prilagođeno prema Madu i sur., 2020.

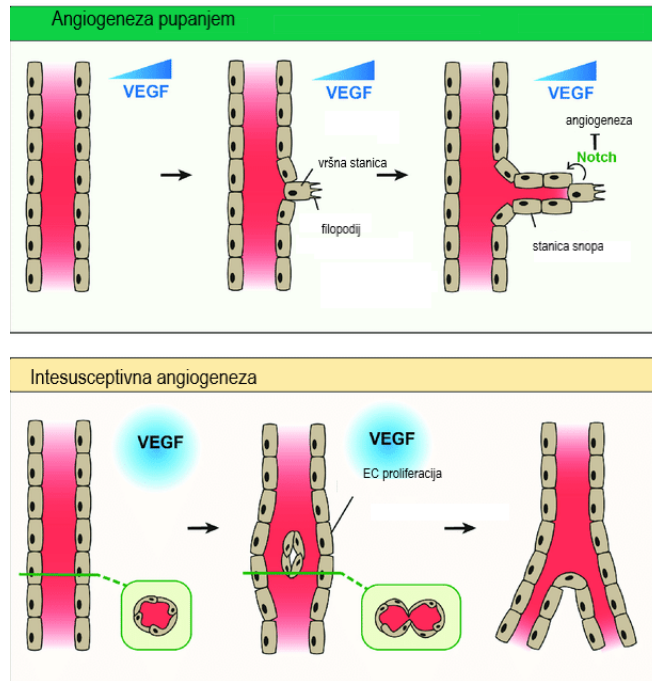
### 2.4.1. Početak vaskularizacije tumora; angiogeni prekidač

Mali mirujući tumori, lišeni aktivne produkcije krvnih žila često su opaženi u ljudskim tkivima i u genetski modificiranim modelima karcinogeneze u miševa u ranim stadijima progresije tumora.

Progresija tumora često je popraćena urastanjem krvnih žila što je u korelaciji sa potrebom tumora za krvnom opskrbom u svrhu napredovanja. Tumori mogu biti vaskularizirani ili preko rasta krvnih žila iz postojeće vaskulature (Kuczynski i sur., 2019.) ili induciranjem formiranja novih krvnih žila preko mnoštva molekularnih i staničnih mehanizama. Vaskularna homeostaza regulirana je velikim brojem pro i antiangiogenih čimbenika. Kada su proangiogeni/antiangiogeni čimbenici u ravnoteži, nema rasta krvožilja i endotelne stanice su u neproliferativnom stanju. Inicijacija stvaranja krvnih žila počinje kada proangiogeni signali dominiraju, što se naziva angiogenetskim prekidačem. (Dudley i Griffioen, 2023.). Angiogeni prekidač budi tumor iz mirujućeg (dormantnog) stanja i potiče brzi rast malignih stanica udružen sa stvaranjem novih krvnih žila. Angiogeni prekidač može biti potaknut genetskim promjenama tumorskih stanica što dovodi do pojačane proliferacije i hipoksije ili ekspresijom proangiogenih čimbenika ili upalnim odgovorom na tumor i novačenjem imunskih stanica.

#### ***2.4.2. Mehanizmi stvaranja krvnih žila u tumorskom tkivu***

Krvni optok je od presudne važnosti u smislu dostave nutrijenata i kemijskih spojeva u tkiva, odnošenja nusprodukata i održavanju homeostaze. Krvožilni sustav, sastoji se od aorte, arterija, kapilara i vena prenosi krv kroz cijelo tijelo. Arterije odvođe krv od srca prenoseći oksigeniranu krv tkivima. Kapilarni splet ima tanku stijenku što omogućava razmjenu plinova između krvi i tkiva. Kisik se otpušta u tkiva, a ugljikov dioksid se apsorbira i prenosi nazad u srce preko vena. Transmigracija imunskih stanica u tkiva olakšana je postkapilarnim venulama. Kapilarni zid sastavljen je od sloja endotelnih stanica okruženih bazalnom membranom i podržan pericitima. Angiogeneza uobičajno kreće iz kapilara i igra važnu ulogu u rastu, održavanju tumora i metastaziranju. Stvaranje krvnih žila u tumorskom tkivu može biti inducirano kroz nekoliko staničnih procesa.



**Slika 8.** Usporedba angiogeneza. Preuzeto i prilagođeno prema Hendriks i Ramasamy, 2020.

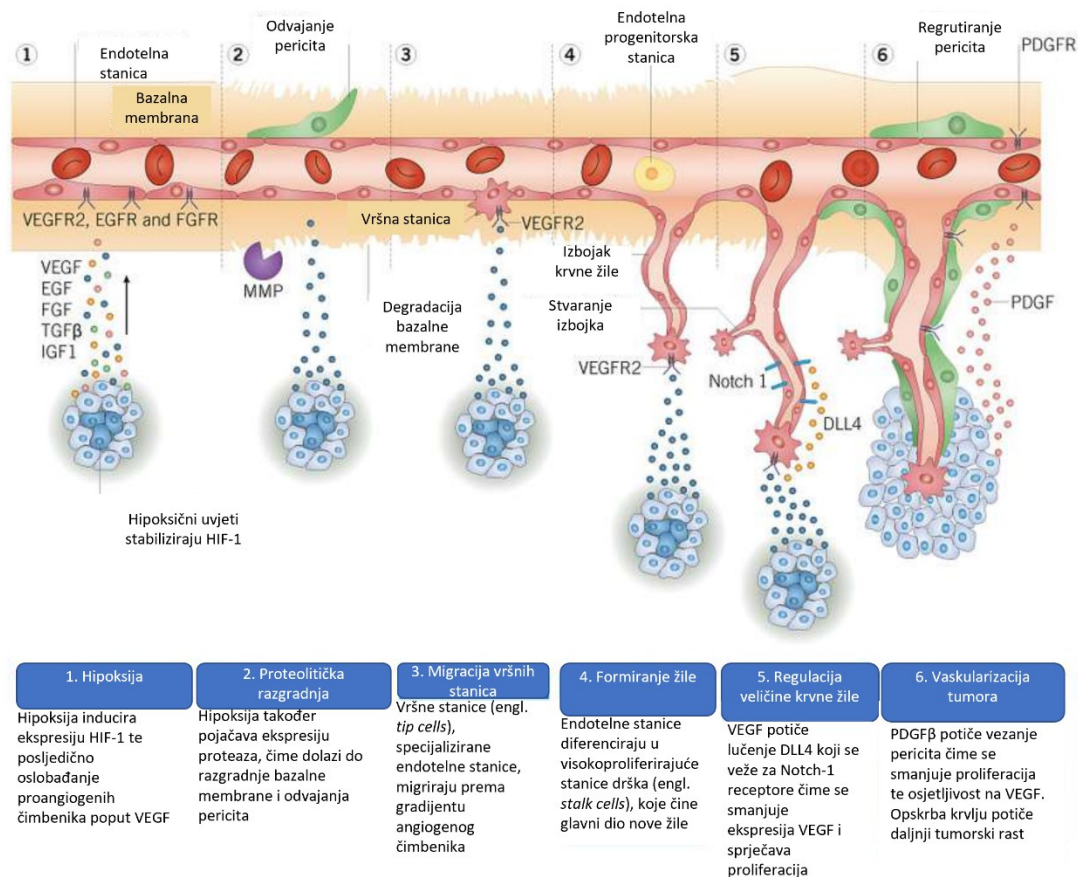
### 2.4.2.1. Angiogeneza pupanjem

Novе kapilare mogu nastati od pupoljka roditeljske stanice preko višestrukog procesa koji se zove angiogeneza pupanjem (Slika 9). Stvaranje izbojka uključuje: 1. odabir vršne stanice (engl. *Tip cell*); stanica iz roditeljske kapilare postaje pokretna vodeća stanica i blokira susjedne stanice da postanu vršne procesom koji se naziva lateralna inhibicija; 2. produljenje izbojka; vršna stanica putuje kemotaktičkom stazom, a slijedi je stanica snopa (engl. *Stalk cell*); 3. stvaranje lumena; stvaranje veze lumena izbojka sa roditeljskom žilom. Izbojak u razvoju tada se spaja sa ostalim žilama procesom anastomoziranja.

Endotelne stanice su po svojoj prirodi utišane, ali se mogu inducirati na pupanje i početak angiogeneze proangiogenim čimbenicima poput VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*). Odabir vršnih i stanica snopa reguliran je komunikacijom između VEGF i D114/Notch puteva (Jakobsson i sur., 2009.). Kao odgovor na VEGF, vršne stanice stvaraju DLL4 ligand (engl. *Delta-like-4 ligand*), PDGF, VEGF receptor-2 (VEGFR-2) i VEGFR-3/Flt4 (Tammela i sur., 2008.) VEGF blokira Notch signalizaciju i potiče pupanje, grananje, migraciju i stvaranje filopodija u vršnim stanicama (Jakobsson i sur., 2010.). DLL4 otpušten od vršnih stanica aktivira

Notch signalizaciju u susjednim endotelnim stanicama, suprimira stvaranje vršnih stanica inhibicijom ekspresije VEGFR2 i VEGFR3 i induciranjem ekspresije VEGFR1 (mamac za VEGF). Vršne stanice pružaju brojne filopodije i stječu motilan i invazivan fenotip, luče proteine koji rastvaraju matriks i vode stvaranje nove krvne žile prema gradijentu VEGF (Gerhardt, 2003.). Neuropilini, ne-tirozinkinazni receptori promoviraju funkciju vršnih stanica pojačavajući signalizaciju putem VEGFR2 i VEGFR3 (Fantin i sur., 2013.). Stanice snopa slijede vršne stanice i granaju se iz roditeljske stanice uspostavljajući lumen krvne žile i spojne veze izbojka u nastajanju. Po prirodi su proliferativnije i imaju manje filopodija u odnosu na vršne stanice. Izraz vaskularna anastomoza označava razvoj spoja između dva izbojka ili između izbojka i postojeće krvne žile. Migratorni vrh stanica filopodija izražava junkcijske proteine poput VE-kadherina (Lenard i sur., 2013.). Filopodiji susjednih vršnih stanica stvaraju i razbijaju sveze više puta tijekom stvaranja inicijalne sveze nakon čega se VE-kadherin otpušta na jednom mjestu filopodijskog doticaja i stvara se prstenasta sveza koja formira mali luminalni džep na tom mjestu (Blum i sur., 2008.). Slijedi uzmicanje viška filopodija, anastomotske membrane se spajaju, izražavaju apikalne biljege poput podokaliksina i upreguliraju ekspresiju spojnih molekula na staničnoj površini (Lenard i sur., 2013.).





**Slika 9.** Angiogeneza pupanjem. Preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.tocris.com/cell-biology/angiogenesis>

### 2.4.2.2. Intesusceptivna angiogeneza

Slabije proučeni proces neoangiogeneze naziva se intesusceptivna angiogeneza u kojem se stvaraju transluminalni tkivni stupci unutar postojeće vaskulature i postupno se spajaju u svrhu remodeliranja vaskularnog pleksusa. Prvi put je opisan u procesu remodeliranja plućnih kapilara (Patan i sur., 1992). Molekularni mehanizam nije do kraja razjašnjen, ali proces može biti induciran čimbenicima rasta poput VEGF, PDGF i eritropoetina (Hellstrom i sur., 2007.). Intesusceptivna angiogeneza opažena je u raznim tipovima tumora uključivši melanom, kolorektalni karcinom, gliom i tumore dojke (Ribatti i sur, 2005.; Nico i sur., 2010.). Kod melanoma, ekspresija VEGF korelira sa pojavom intesusceptivne angiogeneze i brojnim intraluminalnim tkivnim naborima (Ribatti i sur., 2005.). Smatra se da intesusceptivna

angiogeneza pomaže tumorskom rastu povećavanjem kompleksnosti i broja mikrovaskularnih struktura unutar tumora.

#### **2.4.2.3. Vaskulogeneza i novačenje endotelnih progenitornih stanica**

De novo stvaranje žila u embriju inducirano je diferencijacijom i udruživanjem endotelnih progenitornih stanica (EPC, engl. *Endothelial Progenitor Cells*) u procesu koji se zove vaskulogeneza. U modelu miša, progenitorne stanice se diferenciraju i čine skupine zvane krvni otočići. Podskupina stanica smještena periferno u krvnim otočićima nazvani angioblasti potiču nastanak prekursora endotelnih stanica, dok se oni centralno smješteni diferenciraju u hematopoetske stanice. Angioblasti migriraju u paraaksijalni mezoderm, udružuju se u agregate, proliferiraju i diferenciraju se, te tvore pleksuse sa endokardijalnim cjevčicama u modelu miša. Navedeni proces vodi stvaranju aorte, kardinalnih vena i embrionalnih stabiljki arterija i vena u žumančanoj vreći. Vaskulogeneza u tumorskom tkivu posredovana je novačenjem EPC ili hematopoetskih stanica iz koštane srži (Ahn i sur., 2010.). EPC su uglavnom unipotentne odrasle matične stanice koje imaju mogućnost samoobnove, proliferacije, učestvovanja u neovaskularizaciji i popravku endotela (Chopra i sur., 2018.). EPC karakterizira ekspresija CD34, VEGFR1, CD133, Tie-2, Nanog i Oct-4. EPC pridonose postnatalnoj vaskulogenezi i novače se iz koštane srži na mjesta ozljede pomoću čimbenika rasta, citokina i HIF čimbenika gdje se diferenciraju u zrele endotelne stanice koje se inkorporiraju u mjesta aktivne neovaskularizacije (Asahara i sur., 1997.). Kod tumora, vaskulogeneza započinje komunikacijom tumorskih stanica i EPC u koštanoj srži. VEGF u tumorskom mikrookolišu mobilizira VEGFR2 pozitivne EPC iz koštane srži (Kopp i sur., 2006.). Tumor također luči druge čimbenike poznate po mobilizaciji EPC u tumorski okoliš poput kemokina, CCL2, CCL5, CXCL12 i adiponektina (Chang i sur., 2007.).

#### **2.4.2.4. Vaskularna mimikrija**

Agresivni rast tumorskih stanica može stvoriti strukture nalik žilama procesom koji se naziva vaskularna mimikrija. Navedene strukture, stvorene bez doprinosa endotelnih stanica predstavljaju alternativni dotok krvi i nutrijenata tumorskim stanicama. Vaskularna mimikrija opažena je u različitim vrstama tumora uključujući melanom, gliom, rak pluća, rak prostate i kolorektalni karcinom.

Tumorske stanice nalik endotelima luče kolagen tip IV i VI, proteoglikane, heparan sulfate, laminin koji pomažu u formiranju i stabilizaciji tubularnih struktura. Vaskularna mimikrija je loš prognostički čimbenik, međutim nedostaje tehnika kojima bi se jasno razlučile stanice vaskularne mimikrije od normalnih endotelnih stanica što otežava analizu relativna važnosti ovog procesa.

#### **2.4.2.5. Transdiferencijacija tumorskih matičnih stanica**

Transdiferencijacija tumorskih stanica u endotelne i krvožilne stanice nalik na glatke mišićne stanice uočena je u više tipova tumora. Pokazalo se da tumorske endotelne stanice imaju slične somatske mutacije kao maligne stanice tumora, što ukazuje na njihovo neoplastično podrijetlo (Ricci-Vitiani i sur., 2011). Transdiferencijacija gliomskih stanica u endotelne stanice *in vitro* dokazana je kulturom gliomskih tumorskih matičnih stanica u mediju za promociju endotela što je rezultiralo ekspresijom panendotelnih biljega CD31, CD34 i vWF, stvaranjem tubularnih struktura i unosom LDL (Ricci-Vitiani i sur., 2011.).

Hipoksični mikrokoliš aktivira angiogenu mrežu potičući pupanje novih krvnih žila u tumor i induciranjem masovne ekspanzije. Abnormalna angiogeneza karakterizirana je povećanjem proliferacije endotelnih stanica, atipičnom morfologijom tumorskih krvožilnih endotelnih stanica i pericita, glatke muskulature i bazalne membrane (Hoff i Machado, 2012.). U usporedbi sa normalnim krvožiljem, tumorsko krvožilje karakterizirano je visokom permeabilnošću, slabim protokom krvi i nepravilnim oblikom (Gavalas i sur., 2013.). Angiogeni čimbenici rasta i njihovi odgovarajući receptori koje otpuštaju i reguliraju tumorske stanice glavni su pokretači angiogenetskog procesa (Tablica 1).

**Tablica 1.** Proangiogeni čimbenici i njihovi receptori

<b>PROANGIOGENETSKI ČIMBENIK</b>	<b>MOLEKULARNA TEŽINA</b>	<b>RECEPTOR</b>
<b>VEGF</b>	19kDa	Tirozin kinaza (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3)
<b>PDGF</b>	30kDa	Tirozin kinaza (PDGFR $\alpha$ i $\beta$ )
<b>FGF</b>	18kDa	Tirozin kinaza (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4)
<b>EGF</b>	6,4 kDa	Tirozin kinaza EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4)
<b>TGF</b>	25 kDa	Serin/Treonin kinaza (tip I i II)
<b>MMP</b>	125kDa	LRP (engl. <i>Low-density lipoprotein receptor related protein</i> )
<b>TNF</b>	51kDa	Tirozin kinaza (TNFR I i TNFR II)
<b>Angiopoetin</b>	57kDa	Tirozin kinaza (Tie-1 i Tie-2)

Kratice: VEGF - čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*); PDGF - Čimbenik rasta trombocita (engl. *Platelet Derived Growth Factor*); FGF- čimbenik rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*); EGF- Epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*); TGF Transformirajući čimbenik rasta (engl. *Transforming Growth Factor*); MMPs - Matriksne metaloproteinaze (engl. *Matrix Metalloproteinases*); TNF- Čimbenik tumorske nekroze (engl. *Tumor Necrosis Factor*)

Stvaranju novih krvnih žila u tumorima ne pridonosi samo povećanje sinteze angiogenih čimbenika već i potiskivanje sinteze angiostatskih čimbenika čime tumorske promjene poprimaju takozvani »angiogeni fenotip« (Viallard i Larrivé, 2017.). Angiogeni čimbenici potrebni za neovaskularizaciju tumora potiču najčešće iz slijedećih izvora: 1. sintezom u tumorskim stanicama; 2. sekrecijom iz makrofaga koji infiltriraju tumor; te 3. enzimatskom degradacijom međustaničnog matriksa od strane makrofaga i/ili tumorskih stanica.

### **2.4.3. VEGF (Čimbenik rasta krvožilnog endotela)**

Induciran hipoksijom, regulira rast novih krvnih žila. Transkripcija mRNA VEGF-a posredovana je hipoksija inducibilnim čimbenikom (HIF-1) koji također potiče smanjenu regulaciju antiangiogenih čimbenika poput trombospondina-1 i angiostatina (Conteduca i sur., 2014.). Sekreciju VEGF-atakođer potiču hormoni (estrogen i progesteron) i citokini poput EGF, TNF, IL-1, IL-6, PDGF i prostaglandin. U obitelji VEGF postoji 7 članova VEGF A-E i placentalni čimbenik rasta PlGF 1 i 2 (Gavalas i sur., 2013.). VEGF djeluje vezivanjem za tirozin kinazne receptore koji su normalno izražene na površini endotelnih stanica. Izgrađeni su od vanstanične regije koja se sastoji od sedam domena koje su nalik imunoglobulinima, transmembranskog dijela i unutarstaničnog dijela koji ima tirozin kinaznu aktivnost (Yadav i sur., 2015.). Glavne funkcije VEGF su: indukcija angiogeneze, stimulacija rasta i proliferacije endotelnih stanica i inhibicija njihove apoptoze, zatim aktivacija enzima uključenih u razaranje izvanstaničnog matriksa, poticanje mobilizacije endotelnih prekursora iz koštane srži i regulacija krvožilne permeabilnosti (Yadav i sur., 2015.).

### **2.4.4. PDGF (Čimbenik rasta trombocita)**

Uključen je u sazrijevanje žila i novačenje pericita i postoji u četiri izoforme PDGF A-D. Luče ga aktivirani trombociti, endotelne, epitelne, glijalne i upalne stanice. Parakrinom stimulacijom inducira susjedne stanice na proliferaciju i migraciju u više fizioloških procesa. Različite vrste genetskih promjena u tumorima mogu aktivirati PDGF ligande i receptore koji djeluju kao proto-onkogeni. PDGF receptori (PDGFR $\alpha$  i  $\beta$ ) koji su izraženi u oligodendrocitima, fibroblastima i glatkim stanicama žila po strukturi su tirozin kinaze koje se u aktivnom obliku sastoje od dva lanca povezanih sa jednim dimernim ligandom. PDGFR $\alpha$  se veže na PDGDDA-C izoforme, a PDGFR $\beta$  je aktiviran sa PDGF-B i -D. Uz promociju proliferacije tumorskih stanica, PDGF može inducirati angiogenezu i stvaranje tumoru pridruženih fibroblasta u različitim oblicima tumora (Demoulin i Essaghir, 2014.).

### **2.4.5. FGF (Čimbenik rasta fibroblasta)**

Čimbenik rasta fibroblasta spada u skupinu proteina koji se vežu za receptor tirozin kinaze. Secernirani FGF djeluje kao homeostatski čimbenik uključen u održavanje i popravak tkiva, ponovni rast i metabolizam. Secernirani FGF regulira metabolizam proliferirajućih stanica, kao i njihovo preživljenje, migraciju i diferencijaciju. FGF signalni put uključuje različite proteine

poput mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK) i proteine PI3k/Akt kasakade (Hoff, Machado, 2012.). Abnormalnosti strukture FGF receptora (FGFR) mogu izazvati poremećenu morfogenezu i razvoj više vrsta tumora. FGF potiče angiogenezu u suradnji sa VEGF i ostalim proangiogenim čimbenicima. Do sada je pronađeno preko 20 izoformi koji se vežu uz pet tipova receptora. Prvih 4 izoformi receptora sastoje se od izvanstanične imunoglobulinu slične domene i unutarstanične tirozin kinazne domene. U petoj izoformi nedostaje unutarstanična domena tirozin kinaze. Aberacije FGF signalnih puteva nađene su u različitim tipovima humanih i životinjskih tumora. Pretjerana ekspresija FGF i amplifikacija gena potiču inicijaciju i progresiju tumora.

#### ***2.4.6. EGF (Epidermalni čimbenik rasta)***

Nalazi se u tumorima nastalim iz epitelnih stanica i inducira rast tumora, diseminaciju, invazivnost i metastaziranje. Receptor EGF (EGFR) pripada ErbB obitelji tirozin kinaznih receptora (RTK) koji induciraju stanice stimulirane EGFR ligandom na rast i proliferaciju. EGFR se sastoji od izvanstanične i transmembranske domene, juta membranske domene, unutarstanične domene sa djelovanjem tirozin kinaze i C-terminalnog kraja sa mnogo tirozinskih ostataka (Conteduca i sur., 2014.). Kod tumora, EGFR je često mutiran i posljedično trajno aktivan i stimuliran radi održive proizvodne EGFR liganda poput EGF, TGF $\alpha$ , amfiregulina i heparin vežućeg EGF. Abnormalna ekspresija TGF- $\alpha$  ili EGFR od strane tumorskih stanica udružena je sa agresivnim fenotipom i lošom prognozom (Sasaki i sur., 2013.), također jer aktivacija EGFR signalizacije rezultira upregulacijom proangiogenih čimbenika poput VEGF.

#### ***2.4.7. TGF (Transformirajući čimbenik rasta)***

Djeluje kao proangiogeni čimbenik pri niskoj razini potičući izražaj angiogenih čimbenika i proteaza. Kao antiangiogeni čimbenik djeluje kada su njegove razine visoke inhibicijom rasta i proliferacije endotelnih stanica (Yadav i sur., 2015.). Kod sisavaca postoje tri izoforme TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 i - $\beta$ 3) koje se nalaze u latentnom obliku i zahtijevaju aktivaciju prije nego ispolje svoju biološku ulogu vezivanjem na dva serin/treonin kinazna membranska receptora (tip I i II). TGF- $\beta$  je dijelom odgovoran za aktivaciju fibroblasta u raznim tipovima tumora.

#### ***2.4.8. MMP (Matriksne metaloproteinaze)***

MMP induciraju tumorsku angiogenezu razdgradnjom izvanstaničnog matriksa i otpuštanjem angiogenih mitogena. MMP-9 i MMP-2 potiču neoangiogenezu u tumorima proteolitički cijepajući i aktivirajući latentni TGF- $\beta$  (Yadav i sur., 2015.). Sastoje se od 23 podčlana. Djeluju

na razne komponente izvanstaničnog matriksa poput kolagena, gelatina, fibronektina i laminina što dovodi do promjena u strukturi matriksa i ekspresiji receptora na površini stanice potičući razvoj, invazivnost i metastaziranje malignih tumora i moguće su glavni krivac za narušavanje ravnoteže čimbenika rasta i supresije rasta.

#### **2.4.9. TNF (Čimbenik nekroze tumora)**

Izljučuju ga makrofazi, mastociti i T-limfociti. Funkcija mu je aktivacija makrofaga i indukcija oslobađanja angiogenih čimbenika. Ima različit spektar djelovanja, uključivši apoptozu, angiogenezu, nekrozu, migraciju stanica, aktivaciju i diferencijaciju imunskih stanica ovisno o staničnom zaleđu što je od velikog značenja u tumorskom imunskom nadzoru, razvoju i progresiji tumora (Wajant, 2009.). Djelujući autokrino, TNF- $\alpha$  potiče otpuštanje i aktivaciju drugih citokina i angiogenih čimbenika koji potiču rasap tumora po peritoneumu.

#### **2.4.10. Angiopoetini**

Angiopoetin ima agonistička i antagonistička svojstva, odnosno djeluje kao proangiogeni i antiangiogeni čimbenik preko Tie receptora i njegovog signalnog puta (Yadav i sur., 2015.). Ang-1 i Ang-2 sudjeluju sa tirozin kinaznim receptorom Tie2, uglavnom izraženom na krvožilnom endotelu mogu poticati neoangiogenezu. Ang-1 djeluje preko Akt/puta preživljenja stabilizirajući novoformirane krvne žile. Ang-2 djeluje na način da popravlja i potiče rast krvožilja i uglavnom je izražen u endotelnim stanicama i tumorskoj stromi. Djeluje sam ili u suradnji sa drugim proangiogenim čimbenicima poput VEGF i to na način da ima utjecaj na razinu ekspresije (Gavalas i sur., 2013.), potiče stabilizaciju i maturaciju novih krvnih žila.

#### **2.4.11. Terapija angiostatinima**

Fenomen koji nastaje nakon uklanjanja primarnog tumora koji za posljedicu ima rapidno bujanje sekundarnih promjena tog istog tumora (Marie i Clunet, 1910.) bio je povod istraživanja o kontroli rasta sekundarnih promjena angiostatskim čimbenicima koje luči primarni tumor. Inhibitori angiogeneze djeluju na kapilarne endotelne stanice koje u procesu angiogeneze proliferiraju jednako brzo kao matične stanice koštane srži koje se prosječno dijele svakih 5 dana (Huang i sur., 2022.).

Smatra se da antiangiogena terapija počiva na 4 mehanizma (Ellis, 2002.). Prvi terapijski pristup jest blokada djelovanja specifičnih angiogenih čimbenika, odnosno onih čimbenika koji imaju

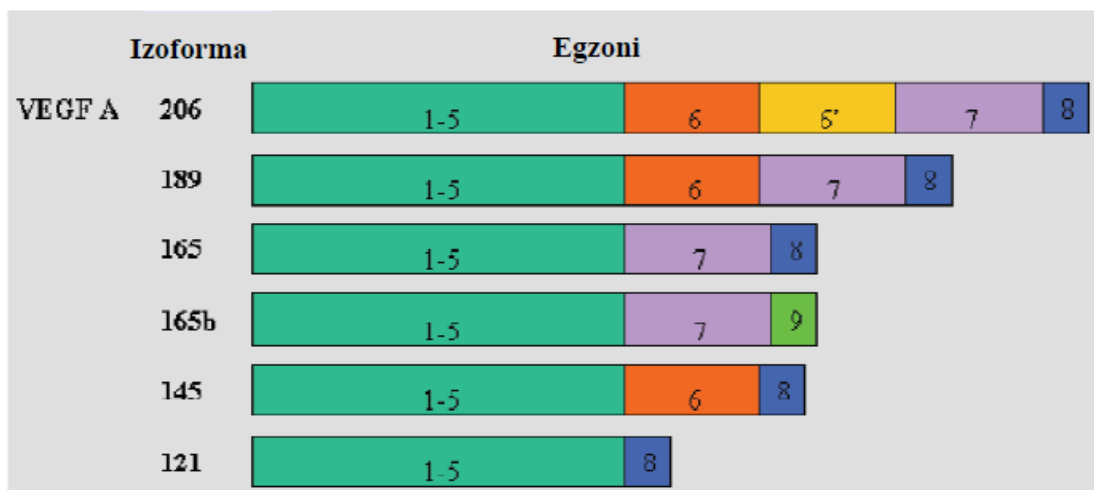
mitogeni učinak na endotelne stanice. Sljedeći način jest smanjenje učinka čimbenika ili stanica, koje pospješuju preživljenje endotelnih stanica. Upravo iz tog pristupa potekao je razvoj integrinskih antagonista koji onemogućuju vezanje endotelne stanice za izvanstanični matriks te na taj način dovode do njezine apoptoze (Ellis, 2002.). Istraživanje angiostatskih čimbenika kao što su endostatin i angiostatin dovelo je do njihove primjene u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima gdje su dokazali svoj antiangiogeni potencijal uz minimalnu toksičnost što predstavlja treći pristup. Posljednji način liječenja odnosi se na blokiranje nekih putova koji mogu voditi pojačanju angiogenih učinaka. Tako je primjerice poznato da prijenos signala putem HER2/neu receptora dovodi do pojačanja angiogeneze (Ellis, 2002.), dok uspješnom blokadom toga puta trastuzumabom dolazi do indirektnog blokiranja angiogeneze.

Sličnim mehanizmom djeluju i inhibitori ciklooksigenaze s obzirom na to da jedan od produkata djelovanja tog enzima prostaglandin E2 dovodi do porasta ekspresije angiogenih čimbenika. Upravo se tim mehanizmom objašnjava smanjena pojavnost nekih tumora (primjerice kolorektalni karcinom) u osoba koje su uzimale COX-2 (ciklooksigenaza 2) inhibitore te se njihova primjena čini klinički opravdanom (Sharma i sur., 2001.).



## 2.5. VEGF I NJEGOVA ULOGA U ANGIOGENEZI TUMORA

Jedan od najznačajnijih pokretača angiogeneze je sekrecija jednog od čimbenika iz VEGF/VPF obitelji (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability factor*). Obitelj se sastoji od šest poznatih čimbenika. VEGFovi su multifunkcionalni citokini koji ispoljavaju mnoge učinke na krvožilni endotel što može doprinjeti angiogenezi. Učinci uključuju promjene u staničnoj morfologiji i citoskeletu zajedno sa stimulacijom migracije endotelnih stanica i proliferacijom. Imaju mogućnost poticanja preživljenja, induciranja i poticanja invazije endotelnih stanica preko interakcije sa receptorima tirozin kinaza. VEGF je jedan od najvažnijih regulatora angiogeneze i jedna od ključnih meta u protutumorskoj terapiji. Za sada je poznato 5 strukturalno povezanih, ali različitim genima kodiranih VEGFova i PlGF. Razlikuju se prema broju aminokiselina u lancima. VEGF gen je smješten na kratkom kraku kromosoma 6 i ima različite izoforme koje su rezultat alternativnog cijepanja (Slika 10). Tri najčešće varijante su one sa 189, 165 i 121 polipeptidnih amino lanaca. Geni za sve izoforme VEGF sadrže egzon 1 do 5 i 8 i razlikuju se po različitim kombinacijama egzona.



**Slika 10.** Izoforme VEGF-A. Preuzeto i prilagođeno prema Byrne i sur., 2005.

Dvije primarne izoforme VEGF-A ( $VEGF_{121}$  i  $VEGF_{165}$ ) imaju različitu ekspresiju tijekom angiogeneze u različitim tkivima kao i različite biološke funkcije, dok su druge dvije skupine ( $VEGF_{189}$  i  $VEGF_{206}$ ) najvjerojatnije uključene u limfogenezu. Postoje i druge

varijante - VEGF<sub>1 4 5</sub>, VEGF<sub>1 4 8</sub>, VEGF<sub>1 6 2</sub>, VEGF<sub>1 8 3</sub> koje se razlikuju po sposobnosti vezanja heparina ili heparin sulfata što je mogući važan mehanizam interakcije sa lijekovima poput heparina ili heparina male molekularne mase (Ferrara i sur., 1997.; Hicklin i sur., 2005.).

Nekoliko izoformi VEGFa imaju različita fizikalna svojstva. VEGF<sub>1 2 1</sub> je slobodno topljiv i ne veže heparin. VEGF<sub>1 6 5</sub> i VEGF<sub>1 8 9</sub> imaju povećan osnovni naboj i vežu heparin sa povećanim afinitetom. Heparin, heparin sulfat i heparinaze istiskuju veće VEGF izoforme sa mjesta vezanja protoglikana. Cijepanje plazmina također aktivira navedene izoforme oslobađajući ih od stanice ili matriksa. Unatoč fizikalnim razlikama, više VEGF izoformi ima iste biološke učinke kada su slobodno otopljeni. Angiogeneza se pokreće samo kada stanica izražava metaloproteinaze koje oslobađaju VEGF iz matriksa, te su potrebne da bi došlo do angiogenog prekidača.

Prva i najvažnija biološka funkcija VEGF-A je povećanje mikrovaskularne permeabilnosti. Isto rezultira istjecanjem plazmatskih proteina uključujući fibrinogena i ostalih proteina zgrušavanja. Sustav proteina zgrušavanja se potom brzo aktivira preko signalnih puteva tkiva i rezultira nakupljanjem izvanstaničnog fibrina u tumorskoj stromi. VEGF-A je najvažniji angiogeni citokin sa ključnom ulogom u tumorskoj angiogenezi. Postoji više načina na koji tumori sa utišanom VEGF ekspresijom mogu stimulirati angiogenezu. Jedan od načina je da tumori potiču okolne stromalne stanice na sekreciju VEGF-a, no nisu samo tumorske stanice te koje su izvor angiogenih čimbenika, već to mogu biti i upalne stanice (makrofazi, monociti i druge). Također, razne linije tumorskih stanica proizvode VPF (dimerni heparin-vežući glikoprotein) koji povećava proliferativnu sposobnost krvožilnih endotelnih stanica *in vitro* budući je visokospecifičan mitogen za ovaj tip stanica. VEGF-A je pretjerano izražen od strane invazivnih tumorskih, ali i nekih premalignih lezija (prekursori tumora dojke, cerviksa i kolona) s tim da razina ekspresije raste sa malignom progresijom. Određivanje cirkulirajućih razina VEGF-A ima ulogu u određivanju prognoze tumora, a sam VEGF-A i njegovi receptori su potencijalna meta antitumorske terapije. Na molekularnoj razini VEGF-A mijenja ekspresiju endotelnih stanica što vodi ka povećanoj ekspresiji mnoštva različitih proteina uključujući prokoagulantne čimbenike tkiva, proteine vezane uz fibrinolitičke puteve (urokinaze, aktivatore plazminogena, urokinazne receptore), matriksne metaloproteinaze, GLUT-1, glukozni transportni protein, NOS, brojne mitogene i antiapoptotičke čimbenike (bcl-2, A1, survivin, XIAP). VEGF-A također služi kao

čimbenik preživljenja endotelnih stanica, štiteći ih od apoptoze. VEGF-A je jedan od najbitnijih glikoproteina, odgovoran za stimulaciju angiogeneze u embriju, zatim za cijeljenje rana, u menstrualnom ciklusu, ali i tijekom stvaranja, rasta i metastaziranja tumora.

VEGF-B je bitan u razvoju koronarnih arterija, budući je prisutan u miokardu u visokim koncentracijama. Također je bitan u tumorskoj angiogenezi zbog sposobnosti regulacije funkcija endotelnih stanica. VEGF-B je čimbenik rasta koji veže heparin, te ga ima u izobilju u skeletnoj muskulaturi i gušterači. Visoke razine VEGF-B i VEGF-C udružene su sa limfogenom diseminacijom kolorektalnog karcinoma.

VEGF-C i VEGF-D su ključni za razvoj limfatičnog sustava i mogu povećati krvožilnu permeabilnost i inducirati angiogenezu. VEGF-C veže se za VEGFR-3/Flt-4 receptor izražen na limfatičnom endotelu i pokreće tirozinsku fosforilaciju VEGFR-2 i VEGFR-3 koji su uključeni u limfangiogenezu. VEGF-C i VEGF-D su mitogeni za limfatične endotelne stanice i preko VEGFR-3 potiču preživljenje istih. VEGF-D koji je strukturalno srodan VEGF-C je mitogen endotelnih stanica i djeluje preko VEGFR-2 i VEGFR-3/Flt-4 receptora.

Ostali članovi obitelji su VEGF-E koji još nije potpuno istražen, te PIGF (engl. *Placenta Growth Factor*), otkriven u placenti, te nije izražen u ostalim tkivima osim placenti i smatra se da ima ulogu u patološkoj angiogenezi djelujući kao čimbenik koji povećava aktivnost VEGF-A.

Biološki gledano VEGF-A, PIGF i VEGF-B su sekretorni oblici, dok su VEGF-C i VEGF-D sintetizirani kao proteini koji zahtijevaju post-translacijsku obradu i vezani su uz staničnu površinu.

VEGF-ovi su izraženi u povećanoj razini u većini tumora i prisutni su kroz cijeli životni ciklus tumora. Tumorske stanice mogu pokrenuti stvaranje novih žila proizvodnjom VEGF-a koji za uzvrat prehranjuje tumorske stanice što predstavlja samodostatnu parakrinu petlju, budući da razvoj tumora može početi aktivirati druge angiogene puteve. Razvojem sekundarnih puteva, VEGF ostaje biti pretjerano izražen i glavni medijator angiogeneze. Kidanje navedene petlje jedna je od terapijskih opcija karcinoma. Brojni čimbenici rasta, citokini i lipidni medijatori poput TGF- $\alpha$ , FGF-2, TGF- $\beta$ , čimbenik rasta keratinocita, TNF, interleukin-1 i interleukin-6, čimbenik rasta sličan inzulinu 1, čimbenik rasta hepatocita i prostaglandini E1 i E2 upreguliraju

ekspresiju VEGF-a u različitim stanicama (Ferrara i sur., 1997.; Jain, 2003.; Hicklin i sur., 2005.).

### **2.5.1. Receptori VEGF-a**

Receptori VEGF su po strukturi tirozin kinaze. Vežanje liganda pokreće dimerizaciju receptora i aktivaciju enzima tirozin kinaze preko transfosforilacije između molekula receptora. Navedeno vodi do početka unutarstaničnog provođenja signala preko vlastitih signalnih puteva. Neka provođenja signala dijele se sa većinom, ako ne i svim tirozin kinaznim receptorima, dok su neka zasebna (provode samo VEGF receptori).

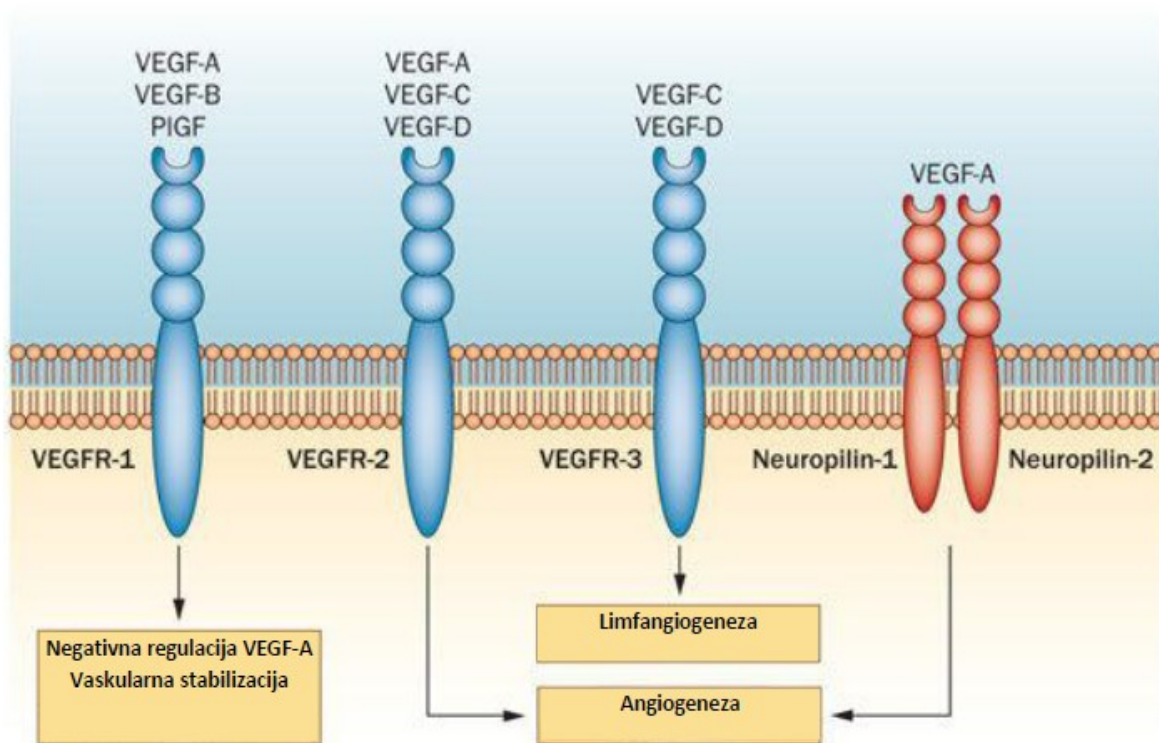
VEGF receptori su izraženi na endotelnim stanicama. Različiti VEGF vežu se na različite receptore (Slika 11). Postoji pet poznatih tipova tirozin kinaznih receptora za VEGF – VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (KDR/flk-1), VEGF-R3 (Flt-4), neuropilin-1 (NRP-1) i neuropilin-2 (NRP-2). Tri velika transmembranska tirozin kinazna receptora za VEGF: (Flt-1, flk-1/KDR i Flt-4) vežu sve izlučene VEGF izoforme. To vežanje pokreće kaskadu signalnih događaja koji pokreću autofosforilaciju tirozin kinaznih receptora i provođenje signala započinje.

Na endotelu krvnih žila izraženi su VEGF-R1 i VEGF-R2, dok je VEGF-R3 izražen na endotelu limfnih žila. Također, VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (flk-1/KDR) povišeno su izraženi u krvožilju tumora koji izražava VEGF-A. VEGF-R1 je također izražen na drugim stanicama poput monocita, makrofaga, pericita, glatkih mišića žila i stanica kolorektalnog tumora. Može imati nezavisnu ulogu u stimulaciji staničnog motiliteta te je transmembranski protein koji veže VEGF-A, VEGF-B i PlGF. Topiv oblik ovog receptora (sVEGF-R1) može djelovati kao inhibitor VEGF. Afinitet VEGF-A za VEGF-R1 10x je veći od afiniteta za VEGF-R2, dok mu je tirozin kinazna aktivnost 10x slabija.

VEGF-R2 veže VEGF-A, VEGF-C i VEGF-D. Odgovoran je za određivanje mikrovaskularne propusnosti i primarni je posrednik VEGF signalnog puta. VEGF-R2 je izražen na endotelnim stanicama i hematopoetskim matičnim stanicama, glatkim mišićnim stanicama žila, megakariocitima i progenitornim stanicama retine. Također je prisutan na stanicama nekih tumora (dojka, neuralni i gastrointestinalni).

VEGF-R3 je izražen uglavnom na embrionalnim endotelnim stanicama i tijekom razvoja njegova se ekspresija smanjuje i i postaje ograničena na fiziološke uvjete samo u limfatičnim endotelnim stanicama. Veže samo zrele oblike VEGF-C.

Neuropilin-1 (NRP-1) je nekinazni receptor, spada u obitelj neuralnih posrednika u neuralnim stanicama, premda ga posjeduju i endotelne stanice. NRP-1 djeluje kao izoforma specifičnog receptora za VEGF<sub>165</sub>. U prvim istraživanjima je pokazano da neuropilini posreduju u neuralnom rastu, ali kasnije su nađeni na endotelu tumorskih stanica (dojka, pluća, gušterača, želudac i karcinom kolona). Pokazano je da potenciraju vezanje VEGF-A na VEGFR-2 receptore, ali budući su neuropilini slabije istraženi na krvožilnom endotelu od VEGFR-1 i VEGFR-2 njihova uloga u tumorskoj angiogenezi je još uvijek predmetom istraživanja. Neuropilin-2 je receptor za placentarni čimbenik rasta (PlGF), ali također može vezati VEGF<sub>165</sub> (Soker i sur., 1998.; Mattila i sur., 2008.; Roodhart i sur., 2008.).



**Slika 11.** Uloge VEGF receptora. Preuzeto i prilagođeno prema Taimeh i sur., 2013.

### ***2.5.2. Uloga hipoksije***

Genska ekspresija VEGF-a pojačano je regulirana u tumorima pri hipoksičnim uvjetima. Centralni dijelovi rastućih tumora često budu hipoksični i nekrotični. Tijekom hipoksije HIF-1 $\alpha$  je stabilan i zajedno sa HIF-1 $\beta$  veže se na promotor VEGF-a i aktivira gensku ekspresiju. Hipoksija vodi u značajan porast VEGF ekspresije uglavnom preko HIF-1 $\alpha$  posredovane VEGF transkripcije (Song i sur., 2017.).

Limfni sustav skuplja tekućinu koja je izgubljena u međustaničnim prostorima tkiva zbog propusnosti kapilara i vraća je u cirkulaciju. Limfne žile uključene su u razna patološka stanja tipa limfedema i sistemske skleroze ali i širenja i metastaziranja tumora. VEGF-D potiče angiogenezu i limfangiogenezu u solidnim tumorima. Ekspresija VEGF-D u tumorskim stanicama vodi prema limfogenom širenju bolesti. Receptor za VEGF-D, VEGFR-3/Flt-4 izražen je na limfnom endotelu odraslih tkiva. Aktivacija receptora vodi limfangiogenezi (Cohen-Kaplar i sur., 2008.).

### ***2.5.3. VEGF i protutumorska terapija***

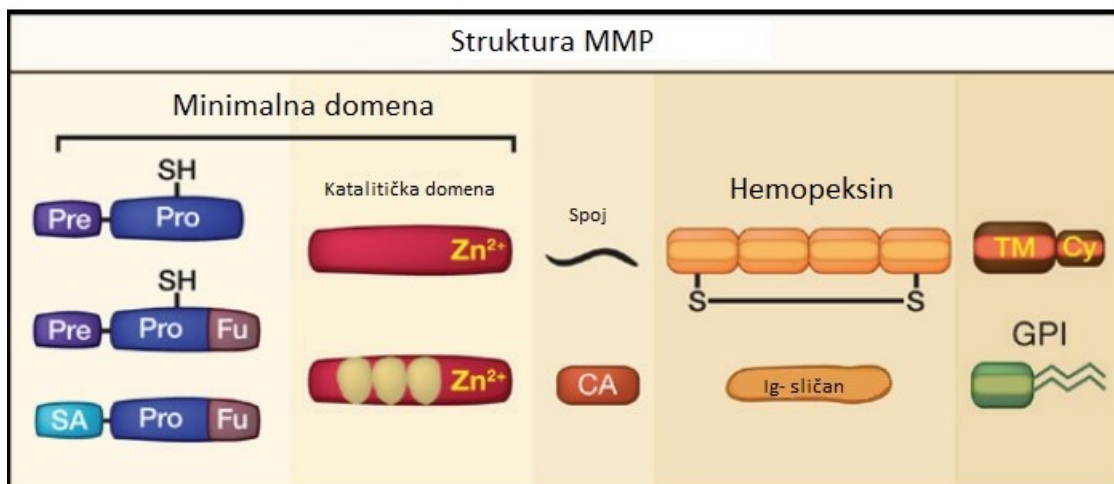
Postoje različiti pristupi djelovanju lijekova koji blokiraju angiogenezu, a uključuju antagoniste VEGF-a ili njegovih receptora, selektivne inhibitore tirozin-kinaze, ciljane lijekove i toksine za VEGF receptore (Carmeliet, 2005.; Fontanella i sur., 2014.) i gensku terapiju reguliranu istim putem hipoksije koji kontrolira proizvodnju VEGF-a (Giacca i Zacchigna, 2012.).

Od lijekova koji inhibiraju djelovanje VEGF-a, u kliničkim pokusima i praksi najzastupljenije je specifično monoklonalno protutijelo za VEGF receptor - bevacizumab (tvornički naziv Avastin, Genentech) koje se nalazi u različitim fazama kliničkog ispitivanja u terapiji dijabetičke retinopatije, kolorektalnog karcinoma, karcinoma pluća ne-malih stanica, karcinoma dojke, bubrega, glioblastoma i drugih kliničkih stanja (Garcia i sur., 2020.). Također testirani su i topljivi analozi VEGF receptora kao što je VEGF TRAP, male molekule VEGF inhibitora kao što su SU5416, SU11248, PTK787/ZK222584 te ribozimi kao što je angiozim (Byrne i sur., 2005). Ciljanje novog VEGF receptora NRP-1 s peptidima također je pokazalo neke obećavajuće pretkliničke rezultate (Barr i sur., 2005.). Zaključno, ciljanje VEGF signalnog puta može biti od velike terapijske važnosti kod mnogih bolesti.

## 2.6. MATRIKSNE METALOPROTEINAZE

Brojni dokazi podupiru stajalište da izvanstanične proteinaze, poput matriksnih metaloproteinaza (MMP) posreduju pri mnogim promjenama mikrookoliša tijekom tumorske progresije. Navedeni enzimi reguliraju mnoštvo fizioloških procesa i signalnih puteva i predstavljaju ključnu ulogu u komunikaciji tumora i strome.

MMP su obitelj cink ovisnih endopeptidaza prvi puta opisanih u 60-tim godinama prošlog stoljeća (Gross i Lapiere, 1962.). Važni su u fiziološkim procesima poput remodeliranja tkiva i organogeneze (Page-McCaw i sur., 2007.), u regulaciji upalnih procesa (Parks i sur., 2004.) i u bolestima tipa tumora (Egeblad i Werb, 2002.). U ljudskim tkivima izraženo je 23 tipa MMP i razvrstane su prema strukturi. Osnovna struktura MMP pokazuje 3 podjedinice koje su karakteristične za skoro sve MMP; pro-peptid, katalitička domena, C-terminalna domena nalik na hemopeksin koja je vezana za katalitičku domenu fleksibilnom svezom (Slika 12). MMP su početno izražene u enzimatski neaktivnom stanju kao posljedica interakcije cisteinskog ostatka pro-domene sa cinkovim ionom na katalitičkoj strani. Nakon prekida navedene interakcije mehanizmom koji se naziva cisteinski prekidač koji je uobičajeno posredovan proteolitičkim uklanjanjem pro-domene ili kemijskom modifikacijom cisteinskog ostatka, enzim postaje aktivan. Pro-domena sadrži konsenzusnu sekvencu i zahtjeva proteolitičko cijepanje konvertazama, koje se, ovisno o sekvenci zbiva unutarstanično preko furina ili izvanstanično preko drugih MMP ili preko serinske proteinaze poput plazmina (Sternlicht i Werb, 2001.).



**Slika 12.** Struktura MMP.

Sve MMP (matriksne metaloproteinaze) imaju zajedničku "Minimalnu domenu" koja se sastoji od tri regije, amino-terminalna signalna sekvenca (Pre) koja se cijepa signalnom peptidazom prilikom ulaska u endoplazmatski retikulum, Pro domena koja sadrži tiolnu skupinu (-SH) i furinsko mjesto cijepanja, te katalitičku domenu sa mjestom vezanja cinka ( $Zn^{2+}$ ). Interakcija -SH skupine pro-domene sa cinkovim ionom katalitičke domene drži enzim u stanju neaktivnog zimogena. Aktivacija zimogena često je posredovana intracelularnim proteazama nalik na furin koje ciljaju furinski motiv raspoznavanja (Fu) između pro-domene i katalitičke domene. Većina MMP posjeduje i regiju nalik hemopeksinu, koja se sastoji od četiri ponavljanja koja slični hemopeksinu i sadrži disulfidnu svezu (S-S) između prve i zadnje poddomene i vezana je za katalitičku svezu preko fleksibilnog spoja. Osim po različitoj strukturi domena. MMP se još mogu podijeliti u secernirane (MMP-1,-2,-3,-7,-8,-9,-10,-11,-12,-13,-19,-20,-21,-22,-27,-28) i one vezane uz membranu (MMP-14,-15,-16,-17,-23,-24,-25) koje koriste transmembransku domenu <sup>TM</sup> sa citoplazmatskom domenom vezanu na nju (Cy), glikozilfosfatidilinositolno sidro (GPI). Gelatinaze MMP-2 i MMP-9 pokazuju sljedove koji vežu gelatin koji slični kolagen-vežućem tipu II motiva fibronektina (FN). Preuzeto i prilagođeno prema Kessenbrock i sur., 2010.

U bliskom srodstvu sa MMP su ADAM (engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase*) i ADAMTS (engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs*). Imaju funkciju u oplodnji, razvoju ploda i tumorima (Edwards i sur., 2008.). Svi ADAM imaju metaloproteinaznu domenu, ali samo polovica pokazuje proteolitičke aktivnosti što ukazuje da vjerovatno posreduju u biološkim ulogama u neproteolitičkom smislu. ADAMTS enzimi imaju proteaznu domenu, dizintegrinsku domenu i jednu ili više trombospondinskih domena. Njihova uloga je u sastavljanju ECM, ovulaciji i tumorima.

*In vivo* djelovanje MMP ovisi o lokalnoj ravnoteži između samih MMP i njihovih fizioloških inhibitora. Najbitniji inhibitori MMP su TIMP (engl. *Tissue Inhibitors Of Metalloproteinases*) koje su često prisutne u tomorskom mikrookolišu (Deryugina i Quigley, 2006.). TIMP-1, -2,-3 i -4 čine 1:1 stehiometrijske komplekse sa aktivnim MMP što vodi inhibiciji proteolitičke



aktivnosti. Poput MMP i ADAM i ADAMTS inhibirani su specifičnim TIMP (Murphy, 2008.). Ekspresija metaloproteinaza i njihovih inhibitora u tumorskom mikrookolišu prilično je raznolika. Premda tumorske stanice mogu izražavati članove MMP obitelji i TIMP, glavni izvor proteinaza su stromalne stanice koje infiltriraju tumor (Egeblad i Werb, 2002.). Različiti tipovi stromalnih stanica proizvode različite skupine proteinaza i njihovih inhibitora koji se otpuštaju u izvanstanični prostor i time mijenjaju okoliš oko tumora.

### ***2.6.1. Regulacija aktivnosti MMP***

Proteolitička aktivnost MMP može biti regulirana na više razina uključujući: 1. ekspresija gena s transkripcijskom i post-transkripcijskom regulacijom; 2. izvanstanična lokalizacija i tkivni ili stanični tip otpuštanja MMP, nazvan kompartmentalizacija; 3. aktivacija proenzima uklanjanjem pro-domene; 4. inhibicija specifičnim inhibitorima, tj. tkivnim inhibitorima matriksnih metaloproteinaza (TIMP) i nespecifičnim inhibitorima proteinaze, npr.  $\alpha$ 2-makroglobulin. Ključan korak u reguliranju MMP aktivnosti je pretvorba zimogena u aktivni proteolitički enzim. Aktivne MMP mogu modulirati globalni proteolitički potencijal u izvanstaničnom miljeu aktivacijom zimogena (proforma MMP) i razgradnjom ili inaktivacijom inhibitora drugih proteaza. Postoji nekoliko proteinaza koje posreduju pri aktivaciji MMP poput plazmina, furina ili aktivnih metaloproteinaza (Sternlicht i Werb, 2001.). Jednom aktivirane, MMP-2, -3, 7, -9 i -12 mogu pokrenuti negativnu povratnu svezu, npr. razgradnjom plazminogena i interferencijom plazminogenske pretvorbe u aktivni plazmin. Stroga regulacija aktivnosti MMP je bitna, budući bi nesputana proteinazna aktivnost otpuštena iz upalnih stanica mogla dovesti do oštećenja tkiva, a ponavljanje upalnog odgovora do kroničnih upalnih bolesti i tumora (Parks i sur., 2004.).

Funkcija MMP može biti pod utjecajem ROS-a. Upalni odgovor u tumorskom okolišu stvara velike količine ROS koji nastaju od strane aktiviranih neutrofila i makrofaga. Navedeni oksidansi aktiviraju MMP oksidacijom cisteina iz pro-domene (Shrihari, 2017.), ali s vremenom u kombinaciji s enzimom mijeloperoksidazom osiguranom iz upalnih stanica inaktiviraju MMP modifikacijom aminokiselina katalitičke domenepreko hipoklorne kiseline (Fu i sur., 2003.).

Lokalizacija ili kompartmentalizacija MMP u fiziološkim uvjetima često određuje njihovu biološku ulogu. Nekoliko MMP je u interakciji sa površinskim receptorima poput integrina ili se ograničavaju na specifična područja ECM što osnažuje aktivnost MMP povećanjem njihove lokalne koncentracije i također mogu interferirati sa dostupnosti endogenih inhibitora. Vežanje

MMP-2 na integrin  $\alpha_v\beta_3$  preko domene hemopeksina odlučujuće je za invazivno djelovanje mezenhimalnih stanica (Rupp i sur., 2008.). Također, visoke lokalne koncentracije MMP-14 na staničnoj membrani metastatskih tumorskih stanica bitne su za migraciju stanica (Friedl i Wolf, 2008.).

Mehaničke sile pridonose tumorskoj progresiji (Butcher i sur., 2009.) potencijalno modulacijom proteolize komponenti ECM. Navedene sile mogu odmotati konformacije MMP substratnih proteina i time dozvoliti prepoznavanje i cijepanje preko proteinaza. Na primjer, Von Willebrandov čimbenik, značajan regulator hemostaze i grušanja luči se kao ultradugačak lanac sastavljen od stotina VWF monomera. Veličina ovog multimolekularnog kompleksa čini ga osjetljivim na razorne sile protoka krvi koje se tipično nalaze na mjestima ozljeda. Navedene sile započinju konformacijske promjene kompleksa te odmatanje VWF domene 2 dovodi do ekspozicije mjesta cijepanja koje napadaju ADAMTS-13 i cijepaju VWF u manje dijelove koji započinu grušanje krvi (Zhang i sur., 2009.).

### ***2.6.2. Uloga MMP u tumorima***

Više od 40 godina je poznata uloga MMP vezana za tumore. MMP posredovana degradacija izvanstaničnog matriksa vodi prema invaziji tumorskih stanica i metastaziranju. Otkriće da inhibicija MMP smanjuje invazivni potencijal tumora u životinjskim istraživanjima brzo je prenešeno na klinička ispitivanja, međutim ista nisu polučila očekivane rezultate. Postalo je evidentno da je funkcija MMP puno složenija nego se je početno smatralo, budući ovi enzimi imaju brojne funkcije uz jednostavno uništavanje fizičkih barijera. Sudjeluju u brojnim signalnim procesima i imaju čitav spektar bioloških djelovanja koja će se objasniti u nastavku.

#### **2.6.2.1. MMP i signalni putevi**

Neregulirana proliferacija je česta karakteristika tumora. Postoje dva osnovna principa kojim tumor to postiže; stjecanjem samodostatnosti u proliferativnim signalima ili postizanjem neosjetljivosti za neproliferativne signale. MMP su bitno uključeni u razbijanje ravnoteže između pro i anti-proliferativnih signala u tumorskom mikrookolišu budući snažno utječu na biodostupnost i/ili funkcionalnost bitnih čimbenika koji reguliraju rast.

Osnovni signalni put sa ključnom ulogom u homeostazi tkiva je TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  normalno vrši tumor-supresivnu ulogu potičući citostazu i diferencijaciju. Kada tumor napreduje u malignoj

progresiji, genom često nakuplja mutacije u TGF- $\beta$  receptorskom sustavu što čini tumorske stanice neosjetljivim za TGF- $\beta$ . Nadalje, njegov mnogostruki utjecaj na nemalignu stromu, poput bijega od imunskog nadzora može biti iskorišten od strane tumora i pretvoriti TGF- $\beta$  u tumor-promovirajući čimbenik koji vodi prema pojačanoj invaziji i metastaziranju (Massague, 2008.). Aktivan TGF- $\beta$  je dobiven iz inaktivnog pro-oblika proteolitičkom konverzijom pomoću furina ili drugih proteinaza poput MMP-9 koja je uobičajeno izražena od strane upalnih stanica. MMP-2 i MMP-9 indirektno moduliraju TGF- $\beta$  bioaktivnost cijepajući komponentu ECM latentni TGF- $\beta$  vežući protein 1 (LTBP-1) čime otapaju ECM-vezani TGF- $\beta$  (Dallas i sur., 2002.) što ukazuje da proteolitička aktivacija TGF- $\beta$  preko MMP ima tumor promovirajuća svojstva selektivno usmjeravajući preko strome posredovanu invaziju i metastaziranje tumora.

Ligandi za EGFR (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*) su snažni pokretači stanične proliferacije i važni regulatori tkivne homeostaze. Poremećaj istih preko genetskih mutacija često se viđa kod tumora dojke i drugih tumora (Hynes i Lane, 2005.). Istraživanja su pokazala ulogu ADAM proteinaza u regulaciji EGFR puteva. Na primjer, ADAM-10 potiče otpuštanje topivog EGF, dok je ADAM-17 značajan pretvarač proformi drugih EGFR liganda poput TGF- $\alpha$  i epiregulina. Aktivacija EGFR rezultira pojačanom regulacijom MMP-9, što dovodi do raspada E-kadherina, snažnog kontrolnog elementa mnogih staničnih funkcija uključujući međustaničnu adheziju i diferencijaciju. Cijepanje E-kadherina preko MMP ili ADAM proteinaza ima utjecaj na proliferaciju tumorskih stanica. ADAM-10 posreduje otpuštanje E-kadherina što rezultira translokacijom  $\beta$ -katenina u jezgru i pokreće staničnu proliferaciju (Maretzky i sur., 2005.). Pretjerana ekspresija MMP-3 u mamarnom epitelu pokreće kaskadu događaja uključujući cijepanje E-kadherina što rezultira epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (Scheau i sur., 2019.). Kombinacija inhibitora ove metaloproteinaze sa dvostukim inhibitorom EGFR i HER2/neu kinaze sinergistički zaustavlja rast ksenografta humanog karcinoma dojke (Witters i sur, 2008.). Ova istraživanja sugeriraju da bi specifična inhibicija metaloproteinaza mogla biti u službi zaustavljanja nereguliranog rasta i proliferacije mnogih tumora.

#### **2.6.2.2. MMP kao regulatori apoptoze**

Izbjegavanje apoptoze jedna je od strategija rasta i razvoja tumora. Vanjski put apoptoze počinje preko izvanstaničnog receptora poput Fas koji aktivira proteolitičku kaskadu unutarstaničnih kaspaza nakon vezanja Fas liganda što dovodi do selektivnog razaranja podstaničnih odjeljaka i

nuklearne DNA. Funkcija MMP interferira sa indukcijom apoptoze u malignim stanicama što može uključivati cijepanje liganda ili receptora koji provode proapoptotske signale. MMP-7 odstranjuje Fas ligand sa površine tumorske stanice tretirane Doksorubicinom (Mitsiades i sur., 2001.) smanjujući utjecaj kemoterapije na tumor ukidanjem apoptoze. Ekspresija MMP-7 može poslužiti kao prediktivni biljeg za rezistentnost prema kemoterapiji kod pacijenata sa nemalim staničnim karcinomom pluća (Liu i sur., 2008.). ADAM-10 može potisnuti indukciju apoptoze citotoksičnim limfocitima preko razaranja Fas liganda (Schulte i sur., 2007.). Navedeni primjeri pokazuju ulogu metaloproteinaza u promociji tumora blokiranjem apoptoze preko receptora ili posredstvom limfocita.

### **2.6.2.3. Krvožilje tumora**

MMP uključene u tumorsku angiogenezu su MMP-2, -9 i -14 i u manjoj mjeri MMP-1 i -7. MMP-9 ima posebnu ulogu u tumorskoj angiogenezi, uglavnom regulirajući biodostupnost VEGF, najpotentnijeg induktora tumorske angiogeneze. MMP-9 otpušten od upalnih stanica omogućuje angiogeni prekidač čineći sekvencirani VEGF biodostupnim svojim VEGFR2 receptorima u tumorima obočica gušterače (Bergers i sur., 2000.). Angiogeni prekidač preko MMP-9 uključuje kompleksnu suradnju povezanih čimbenika. U modelu mišjeg glioblastoma, HIF-1 $\alpha$  inducira novačenje CD45 pozitivnih stanica iz koštane srži kao i endotelne i progenitorne stanice pericita u svrhu promocije neovaskularizacije. MMP-9 koji aktivno nastaje iz CD45 pozitivnih mijeloidnih stanica je esencijalan i dovoljan za angiogeni prekidač povećavajući biodostupnost VEGF. Ovaj proces inducira angiogenezu, ali također regulira invazivnost tumorskih stanica. Kao zanimljivost, VEGF prevenira migraciju tumorskih stanica duž krvnih žila, ali potiče perivaskularnu infiltraciju tumorskih stanica u moždani parenhim (Du i sur., 2008.). MMP-9 je također uključena u vaskulogenezu. Tumori transplantirani u ozračeno tkivo u svrhu prevencije angiogeneze nemaju sposobnost rasta u MMP-9 deficijentnim miševima. Međutim, tumorski rast se ponovno uspostavlja transplantiranjem CD11b pozitivnih mijeloidnih stanica iz koštane srži miša sa dovoljno MMP-9, iz čega se daje zaključiti da je MMP-9 potrebna za tumorsku vaskulogenezu (Ahn i Brown, 2008.). Stoga, MMP-9 je potencijalna važna meta kao dodatna terapija za pospješivanje odgovora tumora na radioterapiju.

MMP-9 izlučene iz neutrofilnih granulocita imaju posebnu ulogu. Za razliku od ostalih pro-MMP-9 iz neutrofila nije u kompleksu sa TIMP-1, te je stoga odmah spremna za pokretanje

tumorske angiogeneze (Ardi i sur., 2007.). Otpuštanje MMP-9 bez TIMP-1 bitan je proangiogenetski događaj u tumoru infiltriranom neutrofilima. Povišen broj neutrofila u pacijenata sa miksofibrosarkomom korelira sa gustoćom mikrovaskulature tumora (Mentzel i sur., 2001.). Također osiromašenje neutrofila u mišjem modelu tumora gušterače značajno smanjuje angiogenetski prekidač u displazijama (Nozawa i sur., 2006.).

Raspad komponenti ECM i drugih izvanstaničnih molekula može stvoriti ulomke sa novim bioaktivnim svojstvima koji inhibiraju angiogenezu (Ribatti, 2009.). Biološki aktivan endostatin stvara se cijepanjem kolagena tipa XVIII pomoću MMP-3, -7, -9, -13 i -20 (Heljasvaara i sur., 2005.). Raspad kolagena IV $\alpha$ 3 pomoću MMP-9 rezultira stvaranjem monomerne NC1 domene zvane tumstatin, koja je potentni supresor angiogeneze. Navedeno se manifestira patološkom vaskularizacijom i povećanim rastom tumora u MMP-9 deficijentnom mišu (Hamano i sur., 2003.). Raspad plazminogena pomoću MMP-2, -9, -12 može stvoriti značajne količine angiostatina, raspadnog produkta sa antiangiogenom funkcijom (Cao i Xue, 2004.). Globalno gledajući, MMP mogu stvoriti signale koji potiču i inhibiraju angiogenezu. Ovisno o vremenskom okviru ekspresije MMP i dostupnosti supstrata, utjecaj MMP na angiogenezu može biti dvojak. MMP također reguliraju krvožilnu stabilnost i permeabilnost. MMP-e, pogotovo MMP-14 posreduju pri žilnom odgovoru na ozljedu tkiva i tumorskoj progresiji preko aktivacije TGF- $\beta$  (Sounni i sur., 2010.).

Limfangiogeneza igra važnu ulogu u biologiji tumora obzirom je direktno vezana sa stvaranjem metastaza u limfne čvorove. MMP inhibitori širokog spektra pokazali su da MMP imaju velik utjecaj na limfangiogenezu (Nakamura i sur., 2004.), međutim samo mali broj istraživanja pronalazi direktnu svezu MMP prema limfangiogenezi. Modulacija biodostupnosti VEGF pomoću MMP, posebno MMP-9 utječe na limfangiogenezu i potiče limfogeno metastaziranje. Najizravniji dokaz uključenosti MMP u limfangiogenezu dolazi iz eksperimentalnih modela limfangiogeneze u tridimenzionalnom sustavu stanične kulture koristeći mišje dijelove torakalnog limfnog voda usadene u kolagenski gel u kojem se stvaraju limfne kapilare sa lumenom (Bruyere i sur., 2008.). Povećana ekspresija MMP-1, MMP-2 (Langenskiold i sur., 2005) te MMP-3 (Islekel i sur., 2007.) povezana je sa limfogenom invazijom i metastaziranjem. Inhibicija MMP-2, -9 i -14 smanjuje angiogenezu i limfangiogenezu, te smanjuje metastaze u limfnim čvorovima (Nakamura i sur., 2004.).

#### **2.6.2.4. MMP i početak neoplastičke progresije**

Početak tumorske invazije dijeli mnoge sličnosti sa epitelno-mezenhimalnim prijelazom (EMT, engl, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) koji se događa tijekom embrijonalnog razvoja. U skupinu sličnosti spada gubitak unutarstanične adhezivnosti i pojačana stanična mobilnost (Kalluri i Weinberg, 2009.). Pretjerana ekspresija nekoliko MMP uključivo MMP-3, -7 i -14 rezultira razvojem karcinoma. Mogući mehanizam pokazuje da pretjerana ekspresija MMP-3, sastavnice tumorskog mikrookoliša uzrokuje EMT i potiče genomsku nestabilnost u kulturi mamarnih epitelnih stanica što vodi do neoplastične progresije svih stadija, maligne transformacije i mamarnih karcinoma u transgeničnim miševima (Lochter i sur., 1997., Sternlicht i sur., 1999.). Ovi učinci povezani su sa ekspresijom alternativnog produkta spajanja Rac1 koji potiče stvaranje ROS-a od strane mitohondrija, oksidativna oštećenja DNA i ekspresiju Snail, transkripcijskog čimbenika vezanog uz EMT (Radisky i sur., 2005.).

#### **2.6.2.5. Invazija tkiva i metastaziranje**

Smrtni ishod velike većine svih tipova tumora posljedica je diseminacije metastatskih tumorskih stanica i razvojem sekundarnih tumora na udaljenim mjestima. Početak metastaziranja uključuje invaziju tumora u periferna tkiva što dovodi do intravazacije tumorskih stanica u krv ili krvne žile od kuda se diseminiraju u sekundarne organe. Invazija i metastaziranje znači da tumor mora proći nekoliko barijera na tom putu poput endotelne bazalne membrane. Metastatske tumorske stanice specifično se lokaliziraju na mjesta pogodna za daljnji razvoj nazvana premetastatske niše u kompleksnoj međuovisnosti upalnih stanica i hematopoetskih progenitornih stanica (Kaplan i sur., 2005.). Prijenos signala posredovan MMP udružen sa pojačanim metastaziranjem uočen je u prisustvu MMP-1. Proteinazom aktivirani receptori (PAR, engl, *Proteinase Activated Receptors*), skupina G-proteinskih receptora sa funkcijama u trombozi i upali može imati utjecaj na invazivnost tumora induciranjem migracije tumorskih stanica nakon proteolitičkog cijepanja receptora. PAR-1 ekspresija povećana je kod mnogih tumora poput dojke, kolona i pluća. Istraživanja koja koriste "ksenograft" model karcinoma dojke pokazuje bitnu ulogu MMP-1, koji nastaje iz fibroblasta koji infiltriraju tumor u cijepanju PAR-1 što pokreće migraciju stanica i invazivno ponašanje tumora (Boire i sur., 2005.).

Premda postoji mnoštvo bioloških funkcija MMP kod tumora, centralna uloga je razaranje i remodeliranje ECM stvarajući puteve kroz periferna tkiva za invaziju i metastaziranje. Sve veći

dokazi iz *in vivo* istraživanja pokazuju da se motilitet metastatskih stanica tumora i ulazak u cirkulaciju događa u suradnji sa tumoru pridruženim makrofazima (Wyckoff i sur., 2004.). Proteolitička razgradnja endotelne bazalne membrane i drugih komponenata matriksa povezuje se sa ekstravazacijom imunskih stanica tijekom upale i vjerovatno je presudna za intravazaciju tumorskih stanica u cirkulaciju. MMP-2 i MMP-9 dobiveni iz makrofaga su bitni medijatori migracije imunskih stanica u mozak u modelu miša kod autoimunskog encefalitisa što uključuje razgradnju ECM komponente distroglikana (Agrawal i sur., 2006.). MMP-dobivene iz tumoru pridruženih makrofaga također mogu pridonijeti intravazaciji tumorskih stanica u cirkulaciju.

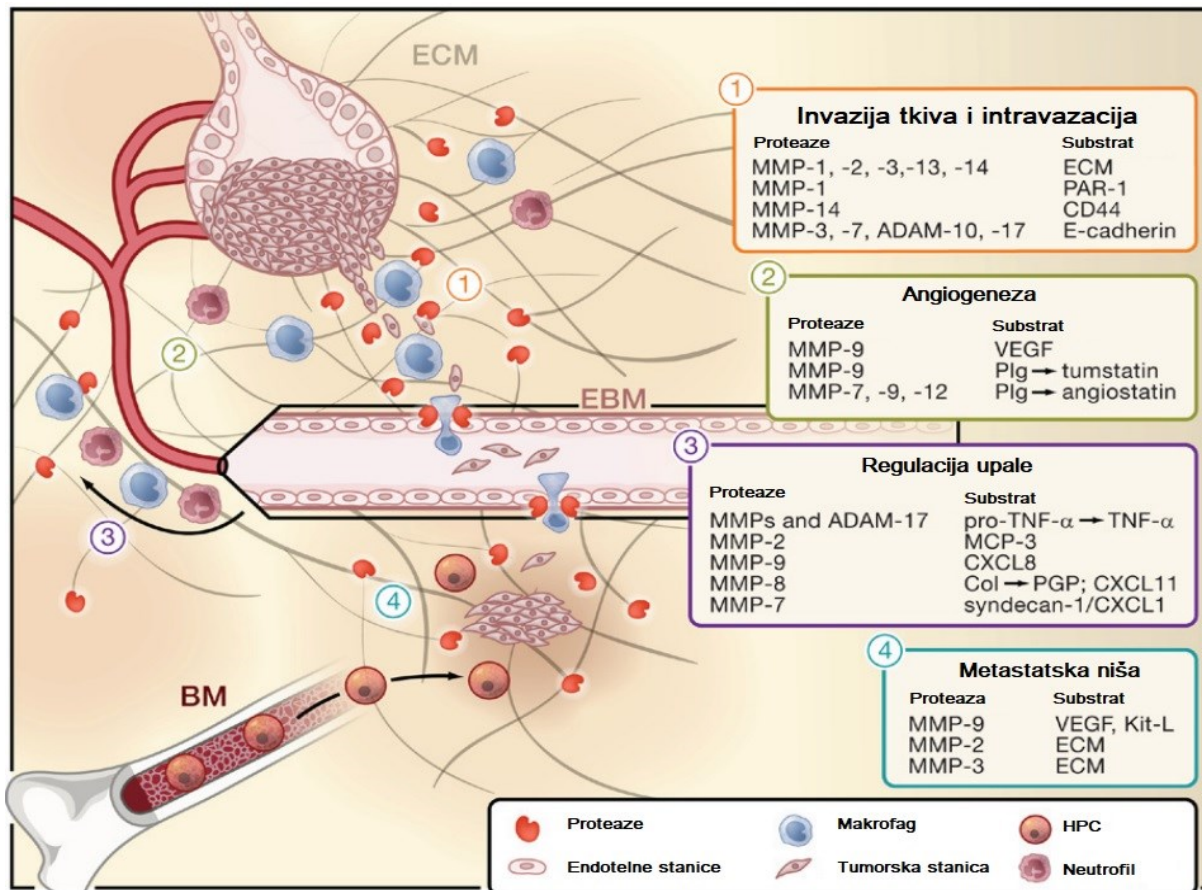
#### **2.6.2.6. Stvaranje metastatske niše**

Pojedini organi kao pluća, jetra ili kosti su pogodna mjesta za stvaranje metastaza. Metastaze ne ovise samo o karakteristikama tumora od kojeg potječu, već zahtjevaju i formiranje pogodnog okruženja, metastatske niše koja je posebno prilagođena za usađivanje tumorske stanice u udaljenom organu. Vrlo je vjerovatno da su MMP i druge proteinaze bitno uključene u formiranje niša. Topivi čimbenici koje otpušta primarni tumor pokreću stvaranje metastatskih niša što je inicijalno potaknuto ekspresijom embrionskog tipa fibronektina kojeg stvaraju fibroblasti na ciljanim mjestima (Kaplan i sur., 2005.). Ovaj proces se događa prije nego su diseminirane stanice uočljive na distalnim organima. Povišeno stvaranje fibronektina na tim mjestima omogućuje infiltraciju VEGFR-1 pozitivnih progenitornih stanica iz koštane srži koje tada uspostavljaju mikrookoliš pogodan za razvoj metastaza. MMP-9 je presudna za stvaranje metastatskih niša (Kaplan i sur., 2005.) što se veže uz njegovu sposobnost oslobađanja VEGF i poticanja angiogeneze (Bergers i sur., 2000.). MMP-9 otpušta topiv Kit-ligand u svrhu novačenja matičnih i progenitornih stanica iz koštane srži (Heissig i sur., 2002.) što doprinosi metastaziranju, budući da progenitorne stanice koje stvaraju niše izražavaju c-Kit (Kaplan i sur., 2005.).

#### **2.6.2.7. MMP i upalni odgovor tumora**

Tijek upale i stvaranja citokina od strane imunskih stanica povezani su sa progresijom tumora na više načina (Lin i Karin, 2007.). Postoje jaki dokazi iz istraživanja na knock-out miševima da MMP (Slika 13) igra važnu ulogu u akutnim kao i kroničnim upalama (Parks i sur., 2004.). Jedan od najvažnijih proupalnih citokina je TNF- $\alpha$ , koji je izražen kao prekursor vezan za membranu (pro-TNF- $\alpha$ ) na mnoštvu stanica uključivši makrofage i T-stanice. Konverzija pro-TNF- $\alpha$  u topivi

citokinetički oblik zahtjeva proteolitičko cijepanje pomoću ADAM-17, također poznatog kao TNF konvertirajući enzim (TACE) ili preko više MMP uključujući MMP-1, -2, -3, -9, -12, -14, -15, i -17 (Manicone i McGuire, 2008.). Mnogi tumori proizvode obilje TNF- $\alpha$  koji potiče preživljenje tumorskih stanica preko NF- $\kappa$ B (Luo i sur., 2004.) što dovodi do zaključka da je konverzija TNF- $\alpha$  preko MMP i ADAM-17 bitan korak u tumor-promocijskoj kaskadi (Slika 13).



**Slika 13.** Funkcije MMP u tumorskom mikrookolišu. Preuzeto i prilagođeno prema Kessenbrock i sur., 2010.

### 2.6.3. Protutumorska terapija inhibitorima MMP

Prva istraživanja tumorske terapije blokiranjem MMP-posredovane angiogeneze i metastaziranja inhibitorima metaloproteinaza u 90-tim godinama prošlog stoljeća dovela su do III. faze kliničkih istraživanja, no nisu dala željene rezultate, u prvom redu radi neselektivnosti inhibitora, a sama istraživanja su bile suboptimalno izvedena, odnosno nisu uzimale u obzir “staging” tumora, tako



da bi vjerovatno bile uspješnije da su testiranja vršena u ranijim fazama tumora. Izazov buduće terapije je razvoj selektivnih inhibitora ili antitijela specifičnih samo za jednu podskupinu MMP. Na primjer, monoklonalno protutijelo usmjereno na katalitičku domenu MMP-14 uspješno inhibira migraciju i invaziju endotelnih stanica u kolagenskim i fibrinskim gelovima (Galvez i sur., 2001.). Također, aktivnost MMP može se usmjeriti na aktivaciju citotoksičnih spojeva poput toksina antraksa da djeluje na krvožilje tumora (Liu i sur., 2008.).

## 2.7. IMUNOSNI OKOLIŠ TUMORA I IMUNOEDITIRANJE TUMORA

U dijelu o tumorskom mikrookolišu opisane su imunosne sastavnice tumorskog mikrookoliša. Bitan dio imunosnog mikrookoliša je komunikacija između imunosnih sastavnica i kako ona djeluje na krajnji imunosni odgovor. Mnogo je dokaza da tumoru pridružene imunosne stanice djeluju u cilju kontrole, ali i promocije nastanka tumora. U tom smislu, tijekom faze eliminacije, stanice NK imaju bitnu tumoricidnu ulogu: sekrecija CCL5 i XCL1 od strane stanica NK potiče okupljanje konvencionalnih dendritičkih stanica (cDC) u TME što dovodi do pojačanog stvaranja i aktivacije novih repertoara protutumorskih stanica T stimulirajući ukupni efektorni imunosni odgovor (Moretta i sur., 2005.). Recipročna suradnja između stanica NK, efektornih stanica T i protutumorskih makrofaga sekrecijom IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  na mjestu tumora pojačava diferencijaciju CTL, pojačava fagocitozu makrofaga, pojačava novačenje citotoksičnih cMET neutrofila i pojačava citotoksična svojstva stanica NK (Finisguerra i sur., 2015.). Dectin-1, receptor na makrofazima i DC stanicama prepoznaje N-glikanske strukture tumorskih stanica što aktivira IRF5 put odgovoran za pojačanje ubojitih svojstava stanica NK (Chiba i sur., 2014.). CX3CR-1 patrolirajući monociti inhibiraju metastatsku progresiju novačenjem stanica NK na mjesto metastaziranja, a tada IFN- $\gamma$  dobiven iz stanica NK reprogramira makrofage u tumoricidno stanje (O'Sullivan i sur., 2012.). Nakon što su tumori pobjegli inicijalnom tumoricidnom imunitetu, provode razne pristupe koje skreću ravnotežu na stranu tumorske tolerancije sa TAM i tumoru pridruženim stanicama Treg koji umanjuju učinak urođenih i adaptivnih efektorskih imunosnih stanica na raznim razinama i preko raznih mehanizama. Na primjer, TAM i Treg pojačavaju imunotolerantnost TME lučenjem imunosupresivnih molekula poput IL-10, TGF- $\beta$  i prostaglandina. Oni također smanjuju sekreciju IL-12 od strane DC, izbjegavajući stvaranje Th1 odgovora i izbacivanjem NK i efektorskih T stanica (Ruffell i sur., 2014, Frydrychowicz i sur., 2017.). Novija, kombinacijska imunoterapija koja uključuje protutijelo protiv tumorskog antigena, rekombinantni IL-2 sa produljenim vremenom poluživota, anti-PD-1 i T- stanično cjepivo pokazala se učinkovitom kod velikih metastatskih tumora u multiplim modelima tumora. Analizom je zaključeno da je učinkovitost ovisna o orkestriranom odgovoru urođenog i adaptivnog imunosustava (Moynihan i sur., 2016.).

### **2.7.1. Tumorska heterogenost i protutumorski imunonadzor**

Analiza humanih primarnih i metastatskih tumora pokazuje visoke nivoe genomske, fenotipske i antigene raznolikosti (Swanton i sur., 2012.) što doprinosi neuspješnosti terapija i progresiji bolesti. Razni mehanizmi predloženi su da bi se objasnila tumorska heterogenost a neki od njih su genomska nestabilnost (McGranahan i Swanton, 2015.), hijerarhijska organizacija podrijetlom iz početne tumorske matične stanice (Kreso i Dick, 2014.) i selektivni pritisak nametnut od strane imunskog sustava koji najvjerojatnije utječu na antigensku heterogenost tumora (Quail i Joyce, 2013.). Preko tumorskog imunoeditiranja, imunski sustav eliminira imunogenije tumorske stanice, promovirajući razvoj klonalnih tumora i time smanjujući heterogenost. Analizom heterogenosti neoantigena uzoraka tumora karcinoma pluća i melanoma, pokazalo se da su pacijenti sa klonalnim tumorima podložniji T-staničnom odgovoru i imaju osjetljiviju inhibiciju tumorskih kontrolnih točaka u usporedbi sa heterogenijim tumorima (McGranahan i sur., 2016.). Nadalje, analiza različitih područja heterogenih tumora pokazala je različite razine antigen-specifičnih CD8<sup>+</sup> T stanica u različitim dijelovima tumora (McGranahan i sur., 2016.). Porast u mutacijskom teretu i heterogenosti neoantigena *in vivo* kao i stvaranje repertoara novih antitumorskih T-stanica (Rizvi i sur., 2015., Germano i sur., 2017.) javlja se kao rezultat inaktivacije DNA reparatornih mehanizama u kolorektalnom, karcinomu dojke i staničnim linijama karcinoma gušterače. Tumori s jako izraženim neoantigenima koreliraju sa dobrom prognozom u pacijenta sa karcinomom pluća liječenim sa anti-PD1 (Rizvi i sur., 2015.). Kako raste tumorska genomska heterogenost, tako raste i vjerojatnost subklonalnih generacija da izbjegnu imunski napad. Metastatska progresija i rezistentnost na terapiju najčešće potječu iz rijetkih klonova u primarnom tumoru (Gupta i Massague, 2006.). Analiza metastaza pacijenata sa rakom jajnika pokazala je da je smanjenje metastatskog tumora udruženo sa infiltracijom CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T stanica i većim brojem tumorskih mutacija u odnosu na lezije sa smanjenim udjelom T stanica (Jimenez-Sanchez i sur., 2017.). Uspjeh tumorske imunoterapije ovisi o sposobnosti imunskog sustava, pogotovo T stanica da prepozna i eliminira tumore sa multiklonalnim i subklonalnim antigenima.

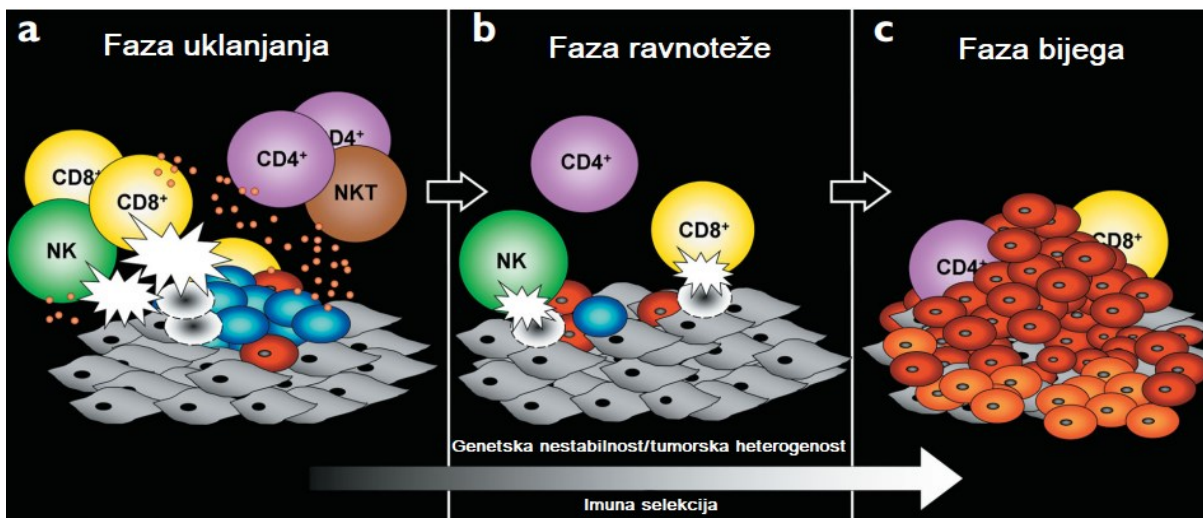
Tumorske stanice izbjegavaju imunski napad korištenjem dvije strategije; izbjegavanje imunskog prepoznavanja i razvojem imunosupresivnog TME. U prvom slučaju tumorske stanice gube ekspresiju tumorskih antigena na staničnoj površini čime izbjegavaju prepoznavanje od strane citotoksičnih stanica T. Oko 40% nemalostaničnih tumora pluća gubi heterozigotnost u

HLA sustavu što dovodi do imunosnog bijega jer predočavaju manje antigena (McGranahan i sur., 2017.). Mutacije i delecije mogu rezultirati “down-regulacijom” antigen predočnog sustava i donijeti rezistentnost prema T-staničnim efektorskim molekulama poput TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  (Patel i sur., 2017.). U svrhu izbjegavanja napada stanica NK u eksperimentalnom modelu metastaza, stanice karcinoma dojke i pluća smanjuju stanične aktivatore stanica NK na površini stanice i postaju nevidljive nadzoru stanica NK (Malladi i sur., 2016.) U drugom slučaju, čimbenici nastali iz tumorskih stanica potiču imunotolerantan TME na više načina: 1. sekrecijom supresivnih molekula poput IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandin E2 i VEGF (Bottcher i sur., 2018.); 2. ekspresijom inhibitornih molekula kontrolnih točaka poput PD-L1, CTLA-4 i VISTA (engl. *V Domain Immunoglobulin Suppressor Of T-Cell Activation*) (Boger i sur., 2017.); 3. indukcijom novačenja TAM, MDSC (engl. *Myeloid Derived Suppressor Cell*) i Treg pomoću kemokina poput CCL2, CSF1, CCL5, CCL22, CXCL5, CXCL8 i CXCL12 (Mantovani i sur., 2017; Tanaka i Sakaguchi, 2017.). Zajedno, navedeni sustavi rezultiraju kompleksnim i učinkovitim sustavom bijega od imunosnog nadzora. Multimodalne terapije koje ciljaju različite aspekte imuno-tolerantnog mehanizma mogle bi promijeniti učinkovitost postojećih imunoterapija.

### **2.7.2. Imunoeditiranje**

Prvu ideju o funkciji imunosnog sustava u kontroli karcinogeneze predložio je Paul Erlich 1909. U to vrijeme imunologija nije bila razvijena kao znanost, tako da nije bilo moguće dati konkretna objašnjenja sve do 1950-tih godina kada je postalo evidentno da uz humoralnu postoji i stanični oblik imunosti (Kaufmann, 2019.). Hipotezu imunonadzora predložili su Lewis Thomas i Sir Macfarlane Burnet u kasnim 1950tim godinama (Thomas, 1959.; Burnet, 1979.) izjavom da su genske promjene česte u somatskim stanicama i dio tih promjena predstavlja iskorak prema malignitetu te da postoji mehanizam koji uklanja opasne mutirane stanice i da je on vjerovatno imunosnog karaktera. U isto vrijeme Miller je otkrio ulogu timusa u razvoju stanične imunosti (Miller, 1961.). Također je pokazao da neonatalno timektomirani miševi nisu odbacivali alogenu i ksenogenu kožu i da su bili osjetljiviji na razvoj karcinoma nakon primjene karcinogena u odnosu na normalne miševe (Miller, 1963.). Teorija imunonadzora nije bila generalno prihvaćena. Više istraživanja bilo je protiv teorije. Na primjer, atimični, T-stanično deficijentni miševi nisu razvili više karcinoma nego normalni miševi (Outzen i sur., 1975.). Danas znamo da atimični miševi nisu potpuno imunokompromitirani, njihove T $\gamma\delta$  i NK stanice su intaktne (Szadvari i sur., 2016.). Oponenti teorije također su ukazivali da u imunoprivilegiranim mjestima

poput prednje očne komore i mozga nije došlo do stvaranje prekomjernog broja tumora. Na kraju 20tog stoljeća vjerovalo se da imunski sustav štiti od virusne etiologije malignoma, ali uloga u sprečavanju spontane karcinogeneze i dalje je bila kontraverzna. Hannahan i Weinberg (2000.) dajući 6 obilježja potrebnih za rast tumora nisu spomenuli ulogu imunskog sustava u procesu tumorske inicijacije i progresije. Početkom 21. stoljeća razvojem spoznaja o mehanizmima karcinogeneze došlo je do uvođenja teorije imunskog nadzora (Slika 14). Interes se probudio nakon otkrića postojanja tumor specifičnih antigena u spontano nastalim tumorima (Minati i sur., 2020.) i iz istraživanja na animalnim modelima koja su pokazala promociju rasta u miševa sa deficitom IFN- $\gamma$  (Castro i sur., 2018.) ili perforina (Street i sur., 2001.) Perforin je element stanica T i litičkih granula stanica NK, važan za ciljano ubijanje stanica, uključujući tumorske (Smyth i sur., 2000.). Olakšan razvoj tumora opažen je u RAG1<sup>-/-</sup> ili RAG2<sup>-/-</sup> miševa (Shultz i sur., 2014.). Navedeni miševi nemaju rekombinantnu aktivnost gena koja je potrebna za proizvodnju T, B i NKT receptora za antigene. Istraživanja Roberta Schreiber (2001.) potvrdila su da imunosuprimirani miševi nisu samo prijemčljiviji tumorigenezi induciranoj karcinogenom u odnosu na imunokompetentne miševe nego da su i kvalitativno različiti. Tumorske stanice iz primarnog tumora koje su rasle u imunokompetentnom mišu, kada bi bile injicirane u naivni divlji tip primaoca, razvile su progresivno rastuće tumore u 100% miševa. Nasuprot tome, tumorske stanice izdvojene iz imunodeficientnog miša kada bi bile injicirane u naivni divlji tip životinja razvile su progresivni tip tumora u samo u polovici miševa, dok su u drugoj polovici se smanjili (Shankaran i sur., 2001). Zaključeno je da su karcinogenom inducirani tumori iz imunokompetentnog miša slabije imunogeni i agresivniji u usporedbi sa tumorima iz imunodeficientnog miša, budući su prethodni doživjeli “editiranje” od strane intaktnog imunskog sustava. Na tom istraživanju je postavljena teorija imunoeditiranja tumora, danas široko prihvaćena koja govori da imunski sustav ne kontrolira samo rast (kvantitetu) tumora, već i kvalitetu tumora. Imunski sustav utječe na ekspresiju antigena tumorskih stanica (imunogenost), a ne samo na njihovu proliferaciju. Prema tome imunski sustav ima dvojaku ulogu u interakciji s tumorskim stanicama, s jedne strane ih uništava, ali im isto tako omogućava da se razvijaju do stanica koje imunski sustav sam više ne može detektirati. Smatra se da se imunsko uređivanje tumora odvija u tri faze: uklanjanje, ravnoteža i bijeg (Slika 14).



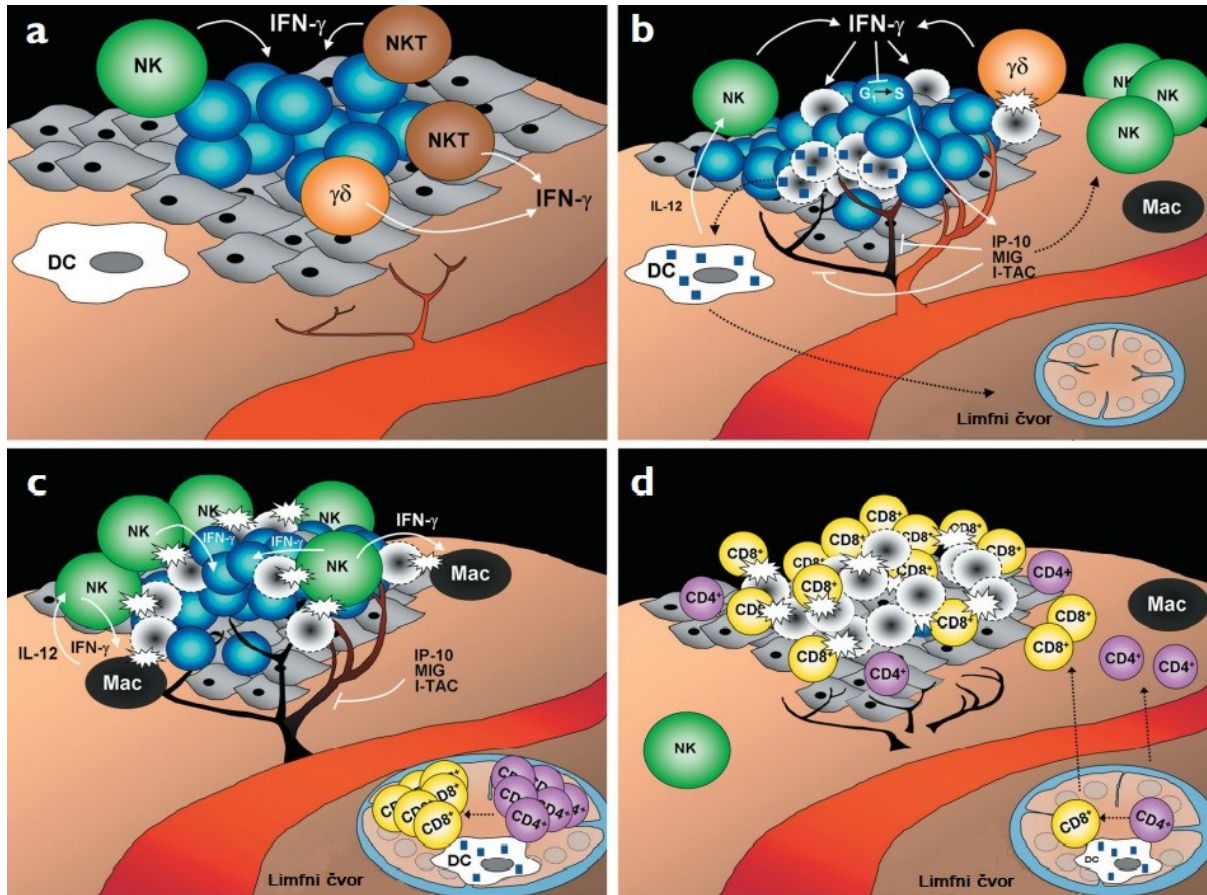
**Slika 14.** Faze imunog uređivanja.

Tumorske stanice u razvoju prikazane su plavom bojom. Varijante tumorskih stanica prikazane su crvenom bojom. Podliježeća stroma i netransformirane stanice prikazane su sivom bojom. Dodatne varijante tumora nastale kao rezultat faze ravnoteže prikazane su narančastom bojom. Preuzeto i prilagođeno prema Dunn i sur., 2002.

### 2.7.2.1. Faza uklanjanja

Imunosnim se nadzorom (engl. *immunosurveillance*) naziva fiziološka funkcija imunskog sustava nadgledanja vlastitih stanica, odnosno sposobnost prepoznavanja i uništavanja vlastitih transformiranih stanica. Uslijed otkrivanja nepravilnosti imunskim nadzorom pokreće se imunski odgovor i faza uklanjanja (engl. *tumor elimination phase*). Stanice nespecifične i specifične imunosti se udružuju kako bi se što učinkovitije uklonile stanice koje bi mogle biti opasne za organizam. Imunosna se reakcija odvija određenim redoslijedom. Stanice nespecifične imunosti prepoznaju razne ugroze za organizam. Glavni protagonisti nespecifične imunosti su prirodenoubilačke stanice čime se pokreće lučenje citokina i proupalnih tvari (Slika 6.a). Citokini dovode do poticanja proizvodnje kemokina (CXCL10 ili IP-10, od engl. *Interferon-Inducible Protein-10*; CXCL9 ili MIG, od engl. *Monokine Induced By IFN- $\gamma$* ; CXCL11 ili ITAC, od engl. *Interferon-Inducible T Cell A Chemoattractant*) koji mogu imati i negativan učinak na angiogenezu, čime je otežana daljnja proliferacija tumora. Lučenjem citokina IFN- $\gamma$  NK-stanice aktiviraju makrofage i dendritičke stanice, koje sakupljajući i prerađujući tumorske antigene mrtvih stanica, pospješuju aktivaciju specifične imunosti (Slika 6.b). Stanice koje predočavaju antigene putuju do lokalnih limfnih čvorova, gdje ovisno o predočenom antigenu posreduju

aktivaciji T-limfocita (Slika 6.c). Uspješna aktivacija T-limfocita CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> specifičnih za transformirane stanice omogućuje organizmu napredak u obrambenom mehanizmu (Slika 6.d) (Dunn i sur., 2002; Dunn, Old i Schreiber, 2004; Hanahan i Weinberg, 2011; Schreiber, Old i Smyth, 2011; Vesely i Schreiber, 2013.). Određeni citokini mogu djelovati na endotelne stanice upalnog područja tako da na površini ekspimiraju adhezijske molekule (selektine, VCAM-1, adhezijske molekule krvožilnih stanica-1; ICAM-1, adhezijske međustanične molekule) pomoću kojih ulaze u interakcije s nadzornim imunskim stanicama koje cirkuliraju u krvi (Slika 7.). Adhezijske se molekule endotelnih stanica povezuju s limfocitnim antigenima ekspimiranim na aktiviranim T-limfocitima (selektini P i E vežu antigen CLA, od engl. *Cutaneous Lymphocyte Antigen*; VCAM-1 veže antigen VLA-4, od engl. *Very Late Antigen-4*; ICAM1 veže antigen LFA-1, od engl. *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*), što T-limfocitima omogućuje ekstravazaciju u upalno područje i tumorski mikrookoliš. Ukoliko dođe do mutacija, bilo adhezijskih molekula, bilo receptora na T-limfocitima, onemogućuje se infiltracija, što može biti i način onesposobljavanja T-limfocita od strane tumorskih stanica. Tumorske stanice koje prežive fazu uništavanja ulaze u fazu ravnoteže (engl. *equilibrium state*) (Dunn i sur., 2002.; Dunn, Old i Schreiber, 2004.; Hanahan i Weinberg, 2011.; Schreiber, Old i Smyth, 2011.; Vesely i Schreiber, 2013.; Martinez i Moon, 2019.).



**Slika 15.** Faza uklanjanja.

**a)** prepoznavanje tumorskih stanica od stanica nespecifične imunosti; **b)** priprema dendritičkih stanica za prezentiranje antigena; **c)** aktivacija T-limfocita  $CD4^+$  i  $CD8^+$  specifičnih za transformirane stanice unutar limfnih čvorova; **d)** mobilizacija T-limfocita  $CD4^+$  i  $CD8^+$  specifičnih za transformirane stanice na mjesto gdje se nalazi tumor. Preuzeto i prilagođeno prema Dunn i sur., 2002.

### 2.7.2.2. Faza ravnoteže

Eliminacijskom fazom imunskog uređivanja može se ukloniti značajan broj transformiranih stanica. Međutim, neke tumorske stanice mogu izdržati težak pritisak nametnut od strane imunskog nadzora. Postoji period latencije između kraja eliminacijske faze do početka faze bijega i pojave klinički očite maligne bolesti. Taj potencijalno dulji period interakcije tumora sa imunskim sustavom koji se zbiva prije otkrivanja kliničke pojavnosti bolesti zove se faza ravnoteže. Tumorski čvor na koji imunostne stanice kontinuirano djeluju može sadržavati tumorske stanice koje posjeduju tisuće mutacija (Loeb i sur., 2003.). Veliki plasticitet genoma



tumorskih stanica potječe iz nekoliko tipova genetske nestabilnosti uključujući nestabilnost popravka nukleotida ekscizijom, mikrosatelitna nestabilnost i kromosomska nestabilnost (Shi i sur., 2023.). Stalna genska metamorfoza tumorskih stanica može biti podloga za nastajanje novih fenotipova koje karakterizira manja imunogenost. Stvaranje varijacija u imunogenosti tumorskih stanica je stohastičke prirode, tumor koji na kraju nastaje iz faze ravnoteže je oblikovan cijelih repertoarom imunskih uređivača u lokalnom okolišu i time kondicioniran prema napretku u fazu bijega imunskog uređivanja. Klinička pojava koja pokazuje fazu ravnoteže kod ljudi je prijenos tumora od darivatelja organa prema primateljima. Transplantirani organi su morfološki uredni prilikom eksplantacije. Dok su neki donori potvrđeni naknadno kao nosioci bolesti, drugi nemaju pozitivnu anamnezu za tumor ili su u dugoj remisiji od malignoma prije transplantacije. Jedno istraživanje pokazalo je nastanak metastatskog melanoma 1-2 godine nakon transplantacije u dva primatelja alo-presatka koji su primili bubrege od istog donora (MacKie i sur., 2003.). Naknadnim istraživanjem nađeno je da je donor liječen radi primarnog melanom 16 godina prije smrti, ali je smatran izliječenim prilikom eksplantacije. Ovaj rad ukazuje da je farmakološka supresija imunskog sustava primatelja presatka olakšala brz i progresivan rast okultnih tumora koji su bili zadržani u fazi ravnoteže pomoću intaktnog imunskog sustava donora. Proces imunskog uređivanja nema uvijek linearan tijek. Proces može biti završen u fazi eliminacije ako je imunski nadzor uspješan. Postoje tri ishoda za tumor koji senalazi u fazi ravnoteže: eliminacija putem imunskog sustava, trajno održavanje u fazi ravnoteže staničnim i molekularnim mehanizmima, bijeg od imunskog nadzora. Za održavanje ravnoteže su ključni T-limfociti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> te citokini interleukin 12 (IL-12) i IFN- $\gamma$ , koji posreduju u povećanju citotoksičnosti i novačenju imunskih stanica (Dunn i sur., 2002.; Dunn, Old i Schreiber, 2004.; Hanahan i Weinberg, 2011.; Schreiber, Old i Smyth, 2011.; Juretić i Bašić Koretić, 2017.).

### **2.7.2.3. Faza bijega**

U fazu bijega (engl. *tumor escape phase*) od imunskog sustava ulaze tumorske stanice koje su stekle sposobnost zaobilaženja imunskog sustava pa budući da su neprepoznatljive, više se ne mogu ukloniti. S obzirom da u fazi ravnoteže dolazi do uređivanja populacija tumorskih stanica pri interakcijama s imunskim sustavom, tumorske stanice faze bijega razlikuju se od početnih time što su manje imunogene. Gubitak tumorskih antigena je stoga najbolje istražen mehanizam bijega. Predložena su tri potencijalna načina bijega: prevladavanjem i umnožavanjem onih stanica koje se pojavljuju, a nemaju eksprimirane antigene koji potiču imunsku reakciju;

gubitkom antigena glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC-I) kojim ostvaruju interakcije s T-limfocitima; ili inhibicijom antigen predočnih stanica (APC). Smatra se da su izmjene tumorskih stanica pokrenute kombinacijom procesa imunoselekcije i genetske nestabilnosti, te sklonosti mutacijama. Do faze bijega tumora može doći nizom mehanizama, ne samo promjenama u ekspresiji gena, već i uspostavom imunosupresivnih uvjeta unutar staničnog mikrookoliša tumora čime dolazi do slabljenja imunskog odgovora i povećanja otpornosti na obrambene citotoksične tvari, što dovodi do iscrpljivanja imunskih stanica. Tumorskim je stanicama zadnja prepreka imunski sustav, stoga su tumorske stanice u fazi bijega, one kojima imunski sustav više nije prijetnja, sposobne formirati vidljive tumore. Uspješnost se tumorskog bijega osigurava i održavanjem uvjeta u kojima samo uređene tumorske stanice mogu preživjeti, stoga prerastaju normalne stanice (Dunn i sur., 2002.; Dunn, Old i Schreiber, 2004.; Gajewski i sur., 2006.; Hanahan i Weinberg, 2011.; Schreiber, Old i Smyth, 2011.).

## 2.8. POLARIZACIJA MAKROFAGA

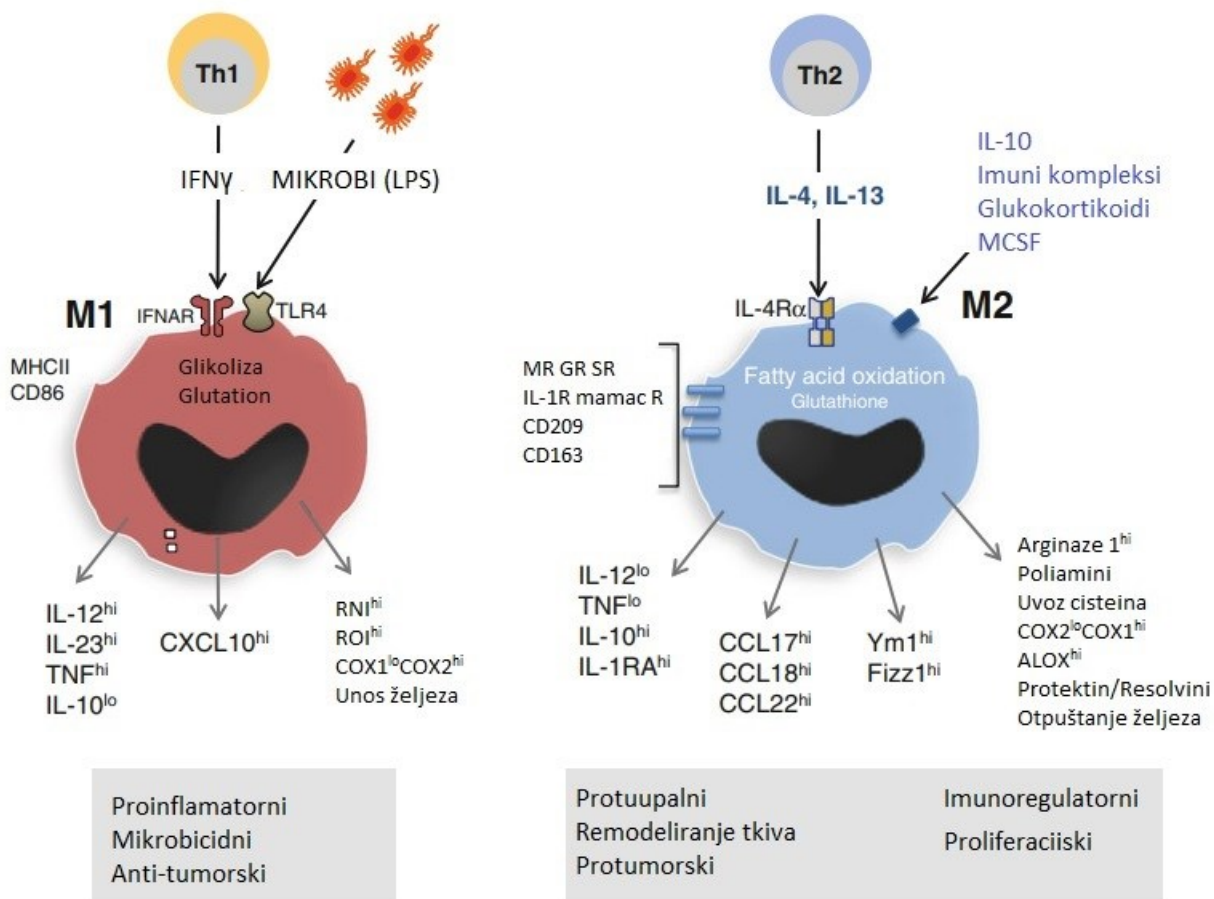
Monociti i makrofazi su ključni čimbenici urođenog imunskog sustava. Otkrivaju i reagiraju na patogene u krvi i tkivima započinjanjem i razvojem imunoupalne reakcije koja na kraju dovodi do uklanjanja patogena i ponovnom uspostavom homeostaze organizma. Kao odgovor na patogene i znakove iz tkiva makrofazi prolaze dubinske promjene fenotipa koje im pomažu u adaptaciji na mikrookoliš i kreiranju odgovarajućeg odgovora (Stout i Suttles, 2004.; Biswas i Mantovani, 2010.). Adaptivne promjene su ključne u razumijevanju raznolikosti ovih stanica. Funkcionalna raznolikost makrofaga vidljiva je njihovom ulogom u različitim procesima poput obrane domaćina, razvoja i metabolizma (Olefsky i Glass, 2010.).

Makrofazi predstavljaju ključnu staničnu komponentu mijelomonocitne loze sa ključnom ulogom u urođenoj imunosti. Glavna odlika makrofaga je funkcionalna raznolikost (Gordon i Martinez, 2010.). Funkcionalna raznolikost makrofaga pripisuje se njihovoj sposobnosti reakcije na različite mikrookolišne znakove razvojem podjednako raznolikog funkcionalnog fenotipa. Postoje dva glavna tipa fenotipa makrofaga koja odražavaju Th1/Th2 polarizacijsku shemu (Slika 16). Klasično aktivirani (M1) makrofazi ili alternativno aktivirani (M2) makrofazi (Mantovani i sur., 2008.). Th1 vezani citokini poput IFN $\gamma$  kao i mikrobnii stimuli poput lipopolisaharida (LPS) polariziraju makrofage prema M1 fenotipu. M1 makrofage karakterizira IL-12<sup>hi</sup>, IL-23<sup>hi</sup>, IL-10<sup>lo</sup> fenotip i imaju ulogu u upalnim, mikrocidnim i tumoricidnim aktivnostima. Th2 citokini poput IL-4 i IL-13 polariziraju makrofage prema alternativno aktiviranom (M2) fenotipu. Ove makrofage karakterizira IL-12<sup>lo</sup>, IL-10<sup>hi</sup>, IL-1decoyR<sup>hi</sup>, IL-1RA<sup>hi</sup> fenotip, pojačana aktivnost fagocita i visoka ekspresija receptora čistača, manoznih i galaktoznih receptora (Mantovani i sur., 2008.). IL-4 polarizirani mišji makrofazi izražavaju specifične biljege M2 polarizacije poput onih nađenih u upalnoj zoni 1 (Fizz1) i Ym1 (Gordon, Martinez, 2010.). M2 makrofazi oslabljuju upalu, potiču popravak i remodeliranje tkiva, pomažu u uklanjanju parazita i progresiji tumora i posjeduju imunoregulatorne funkcije. Ostali podražaji, poput IL-10, glukokortikoidni hormoni, apoptotske stanice i imunski kompleksi također induciraju makrofage prema M2, imunosupresivnom fenotipu. Analize fenotipa i transkriptoma makrofaga u odgovore na M1 i M2 podražaje otkrile su odnos kemokina i metabolizma. M1 makrofazi izražavaju Th1 privlačeće kemokine poput CXCL9 i CXCL10, dok M2 makrofazi izražavaju kemokine CCL17, CCL22,

CCL24 (Martinez i sur., 2006.). M1 i M2 makrofazi pokazuju karakteristične metaboličke karakteristike koje se odnose na metabolizam glukoze, amino kiselina, lipida i željeza. M1 makrofazi koriste inducibilnu dušik oksid sintazu (iNOS, engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*) da kataliziraju L-arginin u reaktivne međuprodukte dušika (RNI, engl. *Reactive Nitrogen Intermediates*) koji imaju snažna mikrobicidne svojstva. M2 makrofazi upreguliraju enzim arginazu I (Arg 1) i kataliziraju L-arginin u ornitin i poliamine koji potiču fibrozu i funkcije remodeliranja tkiva (Slika 16).

Prema tome, povećana regulacija enzima Arg I uglavnom je prisutna kod M2 makrofaga koji luče proangiogene čimbenike poput VEGF-a, MMP-2 i MMP-9 te posjeduju protuupalno svojstvo popravka oštećenog tkiva, dok je iNOS više prisutna kod M1 makrofaga koji luče proupalne citokine te imaju pojačano protumikrobno djelovanje. Zbog svega navedenog, svi čimbenici koji kontroliraju brzinu toka L-arginina između Arg-1 i iNOS mogu biti važni u regulaciji staničnog rasta kako ne bi došlo do pojave kroničnog oboljenja.

Također su nedavno primijećene razlike u metabolizmu drugih aminokiselina poput triptofana i cisteina/cistina (Grohman i Bronte, 2010.). U smislu metabolizma glukoze IFN $\delta$ /LPS polarizirani M1 makrofazi usmjeravaju se prema glikolizi (Rodriguez-Prados i sur., 2010.), dok IL-4 polarizirani M2 makrofazi koriste oksidativnu fosforilaciju (Vats i sur., 2006.). U smislu metabolizma lipida, M2 makrofazi upreguliraju gene vezane za oksidaciju masnih kiselina, dok M1 makrofazi pokazuju sniženu regulaciju istih gena (Vats i sur., 2006.). M1 i M2 polarizirani ljudski makrofazi pokazuju različitu regulaciju gena enzima vezanih za metabolizam arahidonata poput ciklooksigenaze 1 (COX1), COX2 i arahidonat 5-lipoksigenaze (ALOX5) (Martinez i sur., 2006.). Polarizacija makrofaga veže se i uz različit metabolizam željeza na način da M1 potiču zadržavanje željeza, dok M2 potiču izvoz željeza (Cairo i sur., 2011.). Također se razlikuju i razine glutationa ovisno o polarizaciji (Murata i sur., 2002.). M1 i M2 aktivacijski statusi predstavljaju ekstreme spektara funkcionalnih fenotipova koji se viđaju *in vivo*, tijekom različitih zbijanja u organizmu, viđa se mješavina različito polariziranih makrofaga.



**Slika 16.** Polarizacija makrofaga. Preuzeto i prilagođeno prema Biswas i sur., 2012.

### 2.8.1. Funkcionalna raznolikost makrofaga

Makrofazi imaju raznoliku biološku ulogu koja uključuje predstavljanje antigena kao antigen predočne stanice (APC, engl. *Antigen Presenting Cells*), citotoksičnost prema ciljnim stanicama, uklanjanje oštećenih stanica i remodeliranje tkiva, regulaciju upale, induciranje imunskog odgovora, tromboze i raznih oblika endocitoze (Shapouri-Moghaddam i sur., 2018.). Kada su aktivirani mogu izazvati smrt neoplastičnih stanica (citotoksičnost, apoptoza) i/ili izazvati štetne reakcije putem promjena tumorske mikrovaskulature (Ngambenjawong i sur., 2017.).

Nastaju iz mijeloidnog progenitora koštane srži kao nezreli monociti koji ulaskom u krvotok migriraju u okolna tkiva i organe gdje se konačno diferenciraju u lokalne makrofage uključujući

Kupfferove stanice u jetri, alveolarne makrofage u plućima i osteoklaste u kostima (Auffray i sur., 2009.).

### **2.8.2. Tumoru pridruženi makrofazi**

Solidni tumori razvijaju složen sustav koji uključuje aktivnu interakciju tumorskih i stromalnih stanica (McAllister, Weinberg, 2014.). Upalne stanice čine bitnu proporciju ukupne tumorske mase i među njima makrofazi nazvani tumoru pridruženi makrofazi TAM (engl. *Tumor Associated Macrophages*) predstavljaju najbrojniju stromalnu komponentu tumorskog mikrookoliša TME. TAM imaju dominantnu ulogu u orkestriranju upale povezane sa tumorom koja je prepoznata kao čimbenik koji ubrzava progresiju tumora i ograničava odgovor na antitumorski imunitet (Noy i Pollard, 2014.; Mantovani i sur., 2017.). TAM se mogu nakupiti i remodelirati strukturu izvanstaničnog matriksa što omogućuje tumorskim stanicama invaziju kroz TME i interakciju sa drugim tumorskim stanicama ili stromalnim stanicama preko sekrecije čimbenika rasta citokina i kemokina (Slika 17).

Makrofazi mogu biti embrionalno prisutni u tkivima gdje se zadržavaju preko samoobnove ili nastaju preko monocitnih prekursora koji infiltriraju tkiva i diferenciraju se kao odgovor na mikrookoliš (Guerriero, 2018.). Smatra se da TAM u animalnim mišjim modelima nastaju iz cirkulirajućih monocita iz koštane srži vođeni upalnim znakovima tumorskih stanica primarnih i metastatskih tumora gdje se diferenciraju u TAM i olakšavaju progresiju tumora (Qian i sur, 2011., Arwert i sur., 2018.). U tumorima poput glioma i raka gušterače TAM mogu nastati iz mijeloidnih progenitornih stanica razvijenih u žumanjčanoj vreći tijekom embrionalnog razvoja (Bowman i sur., 2016; Zhu i sur. 2017.; Chen i sur., 2017.). U oba slučaja, signali iz tumorskih stanica, limfocita i stromalnih stanica utječu na funkciju TAM.

Kao odraz velike raznolikosti i plasticiteta makrofaga fenotip i sastav makrofaga variraju između različitih tipova tumora. TAM mogu pokazivati pleiotropna protumorska djelovanja, dok također pridonose protutumorskom imunitetu zavisno o ontogenezi, tkivno-ovisnoj regulaciji i stadiju tumora.

U tumorima u nastajanju TAM pokazuju M1 fenotip i sposobni su eliminirati neke imunogene tumorske stanice. Progresija tumora udružena je sa izmicanjem i subverzijom funkcije makrofaga

sa znakovima unutar TME koji mogu pobuditi M2 polarizaciju TAM koja je protumorska (Lewis i sur., 2006.; Mantovani i sur., 2017.).

TAM promiču tumorsku inicijaciju i malignu progresiju stimulacijom angiogeneze, promicanjem metastaziranja, invazije i intravazacije, otpornosti na kemoterapeutike i supresijom protutumorskog imuniteta (Slika 17) (Qian i Pollard, 2010.; De Palma i Lewis, 2013.).

Obzirom na višeznačnu ulogu TAM u razvoju tumora, selektivno ciljanje imunosupresivnih TAM u TME na sinergistički način sa pospješenom imunoterapijom predstavlja zanimljiv pristup u onkološkom liječenju (Pathria i sur., 2019.).

### **2.8.3. TAM u funkciji imunosupresivnog okoliša**

Solidni tumori su složeni ekosustavi definirani međudnosom velikog broja staničnih i topivih sastavnica. Makrofazi su jedni od glavnih sastavnica leukocitnog infiltrata u TME i igraju značajnu ulogu u izbjegavanju imunskog odgovora i njihovo sakupljanje se generalno smatra povezanim sa lošom prognozom kod solidnih tumora (Noy i Pollard, 2014.).

Brojna istraživanja su pokazale da TAM mogu potisnuti proliferaciju naivnih limfocita T *in vitro* što sugerira da bi makrofazi mogli direktno potiskivati funkciju stanica T (DeNardo i sur., 2011., Ruffell i sur., 2014.) TAM mogu inhibirati citotoksičnu funkciju stanica T na razne načine: 1. iscrpljenjem metabolita ključnih za proliferaciju stanica T; 2. inhibicijom funkcija stanica T proizvodnjom protuupalnih citokina; 3. aktivacijom blokade kontrolnih točaka stanica T preko inhibitornih receptora.

Metabolizam arginina ima ključne uloge u aktivaciji stanica T i modulaciji imunskog odgovora (Geiger i sur. 2016.). TAM mogu inhibirati aktivnost stanica T iscrpljenjem L-arginina u TME sekrecijom arginaze 1 (Arg1) koja je tipično izražena u M2 makrofazima i mnogim populacijama TAM. L-arginin koji je potreban za funkciju T stanica može biti metaboliziran u L-ornitin kao i u druge protuupalne spojeve poput uree pomoću Arg 1 u TME. Osiromašenje L-arginina rezultira nemogućnošću ponovne ekspresije CD3 C lanca u T staničnom receptoru i nemogućnošću reagiranja na tumorski antigen i tako suprimira aktivaciju efektorske stanice T (Geiger i sur., 2016.).

L-arginin je supstrat inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS-engl. *Inducible Nitric Oxid Synthase*). Oba puta katabolizma L-arginina posredsvom Arg 1 i iNOS vode T staničnoj supresiji, ali preko drukčijih mehanizama (Bronte i Zanovello, 2005.).

Pod utjecajem čimbenika koje luči tumor TAM mogu lučiti spektar citokina uključivši IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandin E2 koji dalje inhibiraju imunosni odgovor posredovan stanicama T u svrhu postizanja samoodrživog imunosupresivnog TME (DePalma i Lewis, 2013.; Ruffell i sur., 2014.; Noy i Pollard, 2014.). TGF- $\beta$  igra značajnu ulogu u razvoju i regulaciji razvoja tumora i metastaziranju. Ima utjecaj na adaptivne imunosne stanice, regulirajući efektorne i regulatorne stanice T i citotoksične limfocite (CTL) uz davanje potpore stvaranju imunosupresivnih stanica. TGF- $\beta$  u kombinaciji sa IL-2 potiče supresorski fenotip u naivnim CD4 T-stanicama *ex vivo* poticanjem ekspresije FOXP3 – glavnog transkripcijskog čimbenika regulatornih stanica T (Chen i sur., 2003.). Makrofazi u intestinalnom imunosnom sustavu induciraju regulatorne stanice T sekrecijom IL-10 i TGF- $\beta$  (Denning i sur., 2007.). IL-10 također može suprimirati funkciju multiplih imunosnih stanica čime smanjuje antitumorski imunitet uz poticanje tumorigeneze, drugim rječima IL-10 je pleotropan citokin koji potiče raznolike učinke na većinu imunosnih stanica s mogućnošću inhibicije aktivacije i efektorne funkcije stanica T kao i monocita i makrofaga. Protuupalni makrofazi koji ekspimiraju IL-10 su odgovorni za indukciju regulatornih stanica T (Savage i sur., 2008.). Stvaranje IL-10 od strane TAM može oslabiti protutumorske odgovore inhibicijom funkcije antigen predočnih stanica (APC) i time blokirajući efektornu funkciju stanica T poput citotoksičnosti. Pokusi u miševa pokazali su da IL-10 može suprimirati sazrijevanje intratumorskih dendritičkih stanica i njihovu produkciju IL-12 i time ograničavati citotoksične odgovore stanica T tijekom kemoterapije (Ruffell i sur., 2014.). IL-10 može direktno djelovati na CD8 T-stanice u svrhu ekspresije specifičnih inhibitornih učinaka povećanjem grananja N-glikana i time smanjujući ko-lokalizaciju CD8<sup>+</sup> proteina sa T staničnim receptorom (Smith i sur., 2018.). Glikoproteini koji vežu galektin 3 na površini stanica T igraju ključnu ulogu u IL-10 induciranoj redukciji osjetljivosti CD8<sup>+</sup> stanica na antigen.

TAM potaknuta imunosupresija posredovana je ekspresijom inhibitornih receptora što uključuje klasične i neklasične MHC molekule skupine I (MHC-I) koje su udružene sa predočavanjem antigena stanicama T. Makrofazi mogu ispoljavati molekule HLA sustava (engl. *Human Leukocyte Antigen*) poput HLA-C (klasične), HLA-E i HLA-G (neklasične) koje mogu inhibirati



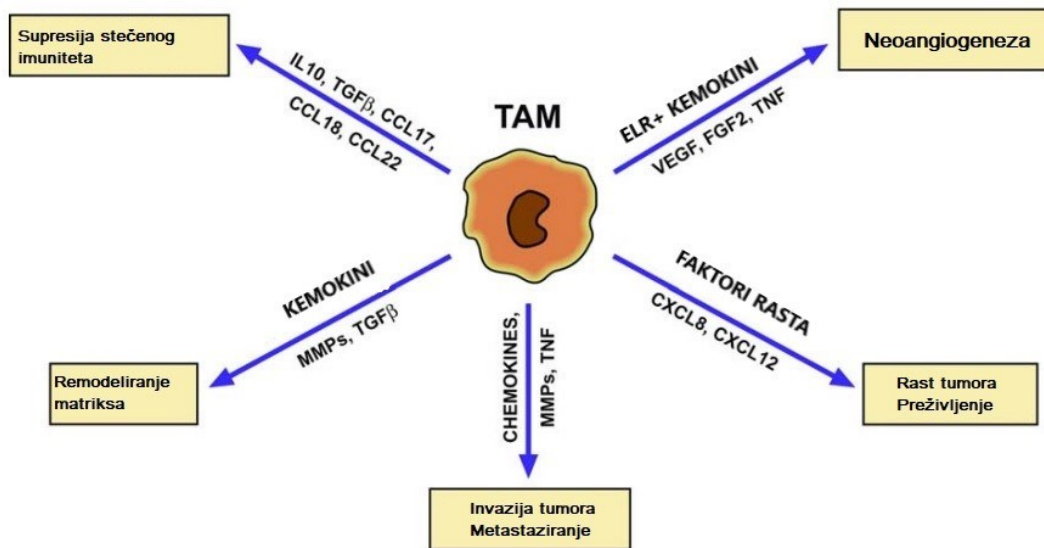
aktivaciju stanica NK i podgrupe aktiviranih stanica T nakon njihovog vezivanja na CD94 i leukocitni imunoglobulinu slični receptor podgrupe B (LIR1). TAM također pokazuju ekspresiju liganda inhibitornih receptora proteina programirane stanične smrti 1 (PD-1) i PD-L2, te CD80 i CD86, i citotoksičnog T limfocitnog antigena 4 (CTLA-4) koji su u normalnim uvjetima upregulirani u aktiviranim imunskim efektornim stanicama uključivši stanice T, B, i NK u sklopu sigurnosnog mehanizma koji kontrolira intenzitet imunskog odgovora (Guerriero, 2018.; DeNardo i Ruffell, 2019.). TAM mogu direktno inhibirati funkciju stanica T preko liganda kontrolnih točaka i istovremeno lučiti IL-10 i TGF- $\beta$  i izazvati imunosupresivnu funkciju.

Drugi imunski ligandi kontrolnih točaka izraženi od TAM mogu imati direktni supresivni učinak na stanice T koje infiltriraju tumor poput B7-H4 i V-domena koja sadrži IG supresor T stanične aktivacije (VISTA) koji mogu dodjeliti makrofazima imunosupresivne mogućnosti (Gao i sur., 2017.). B7-H4 izražen na TAM je udružen sa supresijom T-stanične aktivacije (Li i sur., 2018.). Stanice koje pokazuju ekspresiju B7-H4 mogu djelovati kao negativni regulatori T-staničnog odgovora inhibicijom T-stanične proliferacije, progresije staničnog ciklusa i produkcije citokina (Prasad i sur., 2003.). Dokazano je da površinski B7-H4 na TAM, ali ne i unutarstanični B7-H4 u stanicama raka jajnika suprimira sa tumorom udruženu antigen specifičnu T-staničnu imunost (Kryczek i sur., 2006.). Inhibicija B7-H4 obnavlja funkciju stimulacije stanica T od strane TAM koja pridonosi regresiji tumora i smanjuje rast potkožno implantiranih tumorskih stanica u miša smanjenjem CD8<sup>+</sup> T stanične potrošnje (Kryczek i sur., 2006.). B7-H4 ekspresija na TAM pozitivno je udružena s kliničkim statusom onkoloških pacijenata (Ceeraz, 2013.), premda je uloga B7-H4 najvjerojatnije ovisna o vrsti tumora.

VISTA je još jedan imunoregulatorni protein sa sličnom strukturom poput B7 Ig supreobitelji eksprimiran na limfoidnim i mijeloidnim stanicama (Nowak i sur., 2017.). VISTA djeluje kao imunosupresivna molekula i kao ligand na APC i kao receptor na stanicama T što rezultira povećanom produkcijom citokina stanica T, blokadom T-stanične proliferacije i indukcijom Foxp3 ekspresije i samim time ograničavanjem broja regulatornih stanica T (Nowak i sur., 2017.). Ekspresija VISTA na stanicama T koje infiltriraju tumor i TAM bila je povišena kod bolesnika s rakom prostate i melanomom koji su prošli liječenje ipilimumabom s većim udjelom makrofaga s VISTA ekspresijom koja je imunosupresivnog M2 fenotipa, što upućuje da je VISTA mogući kompenzatorni mehanizam rezistencije (Gao i sur., 2017.).

Drugi mogući mehanizam kojim makrofazi mogu inhibirati funkciju efektornih stanica T indirektno je preko stvaranja kemokina koji novače regulatorne stanice T prema TME i preko sekrecije cijelog spektra citokina koji induciraju regulatorne stanice T i podržavaju preživljenje. Kemokini otpušteni od TAM uključivši C-C ligand kemokina CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-20 i CCL-22 dalje pridonose novačenju regulatornih stanica T u TME (Mantovani i sur., 2004.; DeNardo i Rufell, 2019.). Uz funkciju novačenja moguće je da su makrofazi uključeni u restrikciju naseljavanja stanica T unutar tumora, ali taj mehanizam još nije poznat. Fibroza je mehanizam kojim makrofazi štite TME od infiltracije stanica T. Makrofazi aktivno sudjeluju u remodeliranju tkiva interakcijom sa fibroblastima pri čemu se kolagen sintetizira, secernira i organizira. Pokazano je da TAM proizvode i remodeliraju kolagen izvanstaničnog matriksa (Afik i sur., 2016.). TAM su glavni proizvođači TGF- $\beta$  u mnogim tipovima tumora. TGF- $\beta$  može imati utjecaj na uređeni i adaptivni imunski sustav (Ghiringhelli i sur., 2005.) i sudjeluju u izbjegavanju imunskog nadzora (Mariathasan i sur., 2018.). TGF- $\beta$  utječe na TAM povećavanjem njihove imunosupresivne aktivnosti. Moguće je da makrofazi djeluju preko aktivacije TGF- $\beta$  na izbivanje stanica T iz tumora. TGF- $\beta$  inhibitori se nisu pokazali uspješni radi pleiotropne aktivnosti TGF- $\beta$ .

TAM djeluju kao glavni pokretači imunosupresivnog TME preko ekspresije staničnih površinskih receptora, secerniranih citokina, kemokina i enzima koji reguliraju novačenje i funkciju multiplih imunskih subtipova (Slika 17).



**Slika 17.** Funkcija TAM. Preuzeto i prilagođeno prema Sicca i sur., 2006.

## 2.9. INVAZIVNOST I METASTAZIRANJE TUMORA

Kirurška resekcija i adjuvantna terapija može izliječiti dobro ograničene primarne tumore. Nasuprot tome, metastatska bolest je u visokom postotku neizlječiva radi sistemske prirode i otpornosti proširenog tumora na postojeću terapiju.

Metastaze karcinoma nastaju nakon završetka kompleksnog slijeda stanično bioloških događaja objedinjenih pod nazivom invazijsko-metastatska kaskada gdje epitelne stanice u primarnim tumorima slijede slijedeće korake: 1. stjecanje lokalne invazivnosti; 2. intravazacija u lumen krvnih žila; 3. preživljenje u cirkulaciji; 4. zastoj u distalnim organima; 5. ekstravazacija u parenhim distalnih tkiva; 6. stvaranje mikrometastaza; 7. stvaranje detektabilnih metastaza.

### 2.9.1. Stjecanje lokalne invazivnosti

Lokalnom invazivnošću smatra se prelazak tumorskih stanica iz dobro ograničenog primarnog tumora u okolnu tumoru pridruženu stromu i zatim u susjedni normalan tkivni parenhim. U svrhu invazije strome, tumorske stanice prvo moraju probiti bazalnu membranu (BM), specijaliziranu vrstu izvanstaničnog matriksa koja igra važnu ulogu u organizaciji epitelnih tkiva u smislu ograničavanja epitelnih od stromalnih sastavnica. Dijelovi bazalne membrane sadrže uskladištene čimbenike rasta koji mogu biti otpušteni preko proteaza otpuštenih iz tumora. Bazalna membrana je bitna i zbog provođenja signala između tumorskih stanica koji dovode do promjena u staničnom polaritetu (Bissell i Hines, 2011.). Klinički, proboj bazalne membrane znači progresiju iz Tis u T1 stadij tumora. Za razliku od normalnih stanica koje ulaze u apoptozu nakon gubitka doticaja sa nativnim izvanstaničnim matriksom, tumorske stanice razvijaju mehanizam odvajanja od primarnog tumora. Promjena koja omogućuje tumorskim stanicama postizanje migracije i invazivnosti je epitelno-mezenhimalni prijelaz (EMT, engl. *Epithelial-Mesenchymal Transition*). Tijekom EMT dolazi do nestajanja adherentnih i uskih spojeva između stanica i gubitka staničnog polariteta, razdvajanja stanica unutar epitelnih skupina u pojedinačne stanice koje pokazuje mnoge mezenhimalne karakteristike uključujući povećanu invazivnost (Thiery i sur., 2009.). EMT je upravljan preko skupine pleiotropno djelujućih transkripcijskih čimbenika uključujući Slug, Snail, Twist, ZEB1 i ZEB2 koji upravljaju ulaskom u mezenhimalno stanje supresijom ekspresije epitelnih biljega i ekspresijom drugih biljega karakterističnih za mezenhimalno stanje (Thiery i sur., 2009.). Nekoliko od navedenih čimbenika direktno smanjuje

razine E-kadherina, ključnoga za epitelno stanje. Gubitak barijere bazalne membrane dozvoljava direktnu invaziju tumorskih stanica u stromu. Aktivna proteoliza uglavnom od strane MMP glavni je pokretač gubitka bazalne membrane. Tijekom razgradnje bazalne membrane i ostalih komponenti ECM koji leže na stazi invadirajućih tumorskih stanica, stanice koje izražavaju MMP mogu oslobađati čimbenike rasta i poticati proliferaciju tumorskih stanica (Kessenbrock i sur., 2010.). Kada tumorske stanice razgrade bazalnu membranu ulaze u stromu. Ovdje su u odnosu sa mnoštvom tumoru-pridruženih stromalnih stanica čiji sastav određuje stanje tumorske progresije. Kako progresija primarnog tumora napreduje stroma postaje sve reaktivnija i stječe mnoga svojstva strome tkiva koja zacijeljuju ili su kronično upaljena (Grivennikov i sur., 2010.). Neke od tih stanica su fibroblasti, miofibroblasti, endotelne stanice, adipociti, stanice podrijetlom iz koštane srži poput mezenhimalnih matičnih stanica, makrofaga i drugih imunskih stanica (Joyce i Pollard, 2009.). U ovoj sredini, različite stanice oblikuju tumorski mikrookoliš i proizvode kompleksnu mješavinu citokina, kemokina, čimbenika rasta, upalnih i enzima oblikovanja matriksa (Balkwill i sur., 2012.). Na primjer, citotoksični CD8<sup>+</sup> T-limfociti kontroliraju proces uklanjanja tumorskih stanica i tumori sa visokom CD8<sup>+</sup> infiltracijom obično imaju povoljniju prognozu i manje metastaziraju, dok CD4<sup>+</sup> limfociti potiču tumorsku invaziju stimulacijom TAM.

### **2.9.2. Intravazacija**

Intravazacijom se označuje proces ulaska lokalno invazivnih tumorskih stanica u lumen limfnih ili krvnih žila. Limfogeni rasap tumorskih stanica se učestalo opaža kod ljudskih tumora i predstavlja bitan prognostički čimbenik, ali hematogeni rasap je glavni mehanizam rasapa metastatskih stanica (Gupta i Massague, 2006.). Intravazacija može biti olakšana molekularnim promjenama koje potiču sposobnost tumorskih stanica u prelasku pericita i endotelnih staničnih barijera koje tvore zidove mikrovaskulature. TGF- $\beta$  potiče intravazaciju kod karcinoma dojke povećanjem prolaska tumorskih stanica kroz stijenku mikrovaskulature ili generalnim povećanjem invazivnosti (Giamperi i sur., 2009.). Intravazacija stanica karcinoma dojke može biti potaknuta perivaskularnim TAM preko pozitivne povratne sveze sastavljene od recipročne sekrecije EGF (engl. *Epidermal Growth Factor*) i CSF-1 (engl. *Colony-Stimulating Factor-1* (CSF-1) od strane TAM i tumorskih stanica (Wyckoff i sur., 2007.). Mehanika intravazacije pod utjecajem je strukturalnih karakteristika krvnih žila pridruženih tumoru. Preko mnogih mehanizama od kojih se većina oslanja na djelovanje VEGF tumorske stanice stimuliraju

stvaranje novih krvnih žila unutar lokalnog mikrookoliša procesom neoangiogeneze. Tumorska neovaskulatura je sklona propuštanju i u stanju je kontinuiranog rekonfiguriranja (Carmeliet i Jain, 2011.). Slabe veze između susjednih endotelnih stanica koje tvore tumoru pridruženu mikrovaskulaturu i odsustvo ekstenzivne pokrivenosti pericitima olakšava intravazaciju. Glavni medijatori stimuliranja neoangiogeneze i stvaranja propustljivih krvnih žila su COX-2, epiregulin (EREG), MMP-1 i MMP-2).

### **2.9.3. Preživljenje u cirkulaciji**

Jednom kada tumorske stanice uđu u lumen krvnih žila mogu široko diseminirati preko venske i arterijske cirkulacije. Tehnološkim napretkom moguće je otkrivanje cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC, engl. *Circulating Tumor Cells*) unutar krvotoka onkoloških pacijenata (Nagrath i sur, 2007., Pantel i sur., 2008). CTC predstavljaju tumorske stanice na putu između primarnih tumora i mjesta diseminacije i predstavljaju metastatske posrednike. CTC moraju preživjeti razne stresove unutar cirkulacije u svrhu dolaska na udaljeno mjesto implantacije. Primjerice, navedenim stanicama nedostaje svojstvo adhezije na komponente ECM ovisno o integrinu što je kod normalnih stanica esencijalno za preživljenje. U odsustvu takvog vezivanja epitelne stanice prolaze anoikis - oblik programirane stanične smrti koja se javlja u stanicama ovisnim o usidrenju kada se odvoje od okolnog izvanstaničnog matriksa (Guo i Giancotti, 2004.). Kao dodatak stresovima nastalim otimanjem iz matriksa, tumorske stanice u cirkulaciji moraju nadvladati sile koju nanose hemodinamski stresovi i postojanje stanica urođenog imunskog sustava, osobito stanica NK. U svrhu samozaštite, tumorske stanice stvaraju relativno velike emboluse interakcijom sa trombocitima procesom koji je posredovan ekspresijom tkivnih čimbenika i/ili L- i P- selektina od strane tumorskih stanica čime se štite od fizičkih stresova i izbjegavaju imunski nadzor (Joyce i Pollard, 2009.). Tumori prekriveni trombocitima imaju bolje preživljenje unutar cirkulacije do trenutka dok se ne nastane u distalnim tkivima, a i radi veličine imaju veće izgleda za implantaciju.

### **2.9.4. Zastoj u distalnim organima**

Pojedini tumori stvaraju metastaze u određenoj skupini ciljnih organa (Fidler, 2003.). Neriješena dilema je da li CRC zastaju u kapilarnom spletu ciljnih organa samo radi veličine nametnute promjerom kapilare ili se pak CRC nastanjuju zahvaljujući aktivnim mehanizmima posredovanim odnosom ligand-receptor. Primjer prve teorije su hematogene metastaze kolorektalnog karcinoma

u jetri koje određuje portalni venski sustav koji odvodi mezenterijalnu krv direktno u jetru (Gupta i Massague, 2006.), premda neke stanice mogu izbjeći zastoj u jetri zbog plasticiteta ili slučajnog prolaska kroz „AV shunt“ i biti zaustavljene u nekom od distalnijih organa.

S druge strane, neki tumori mogu stvarati adhezivne interakcije u pojedinim tkivima koje pospješuju naseljavanje tumorskih stanica. Na primjer, ekspresija metadherina u stanicama karcinoma dojke olakšava naseljavanje u plućima olakšavanjem vezanja za pulmonalnu vaskulaturu (Brown i Ruoslahti, 2004.). Ulazak stanica kolorektalnog karcinoma u jetrenu mikrovaskulaturu pokreće proupalnu kaskadu koja rezultira otpuštanjem kemokina iz Kupferovih stanica koji upreguliraju razne vaskularne adhezijske receptore i time omogućavaju adheziju CTC na mikrovaskulaturu jetre (Auguste i sur., 2007.).

### **2.9.5. Ekstravazacija**

Kada se nastane u mikrovaskulaturu distalnih organa CTC počinju intraluminalni rast i stvaraju mikrokolonije koje s vremenom probijaju stijenku kapilara koje ih okružuju i time stavljaju tumorske stanice u direktan doticaj sa tkivnim parenhimom (Al-Mehdi i sur., 2000.). U drugom slučaju, tumorske stanice mogu izaći iz lumena žile u parenhim probijanjem sloja endotelne stanice i pericita procesom koji se zove ekstravazacija. U svrhu prelaženja fizičkih barijera ekstravazacije u tkivima sa niskom intrinzičnom permeabilnosti, primarni tumori luče čimbenike koji mijenjaju udaljeni mikrookoliš i pokreću vaskularnu permeabilnost. Na primjer, secernirani protein Angptl4 (engl. *Angiopoietin-like-4*) kao i pleotropne djelujući čimbenici EREG, COX-2, MMP-1 i MMP-2 prekidaju endotelne međustanične spojeve u pulmonalnoj vaskulaturi u svrhu poticanja ekstravazacije stanica karcinoma dojke u pluća (Gupta i sur., 2007.; Padua i sur., 2008.). Angpt2, MMP-3, MMP-10, PDGF, VEGF koje luče više vrsta primarnih tumora sposobni su inducirati pulmonalnu hiperpermeabilnost prije dolaska tumorskih stanica u pluća, čime olakšavaju ekstravazaciju CTC (Weis i sur., 2004.; Huang i sur., 2009.). Upalni monociti unovačeni u pulmonalne metastaze CCL-2 ovisnim mehanizmima potiču ekstravazaciju stanica karcinoma dojke u pluća sekrecijom VEGF (Qian i sur., 2011.).

### **2.9.6. Stvaranje mikrometastaza**

U svrhu stvaranja mikrometastaza, stanice dopremljene ekstravazacijom moraju preživjeti u stranom mikrookolišu kojeg susreću u parenhimu udaljenih tkiva. Mikrookoliš metastatskog mjesta uobičajno se znatno razlikuje od onoga na mjestu stvaranja primarnog tumora. Samim tim

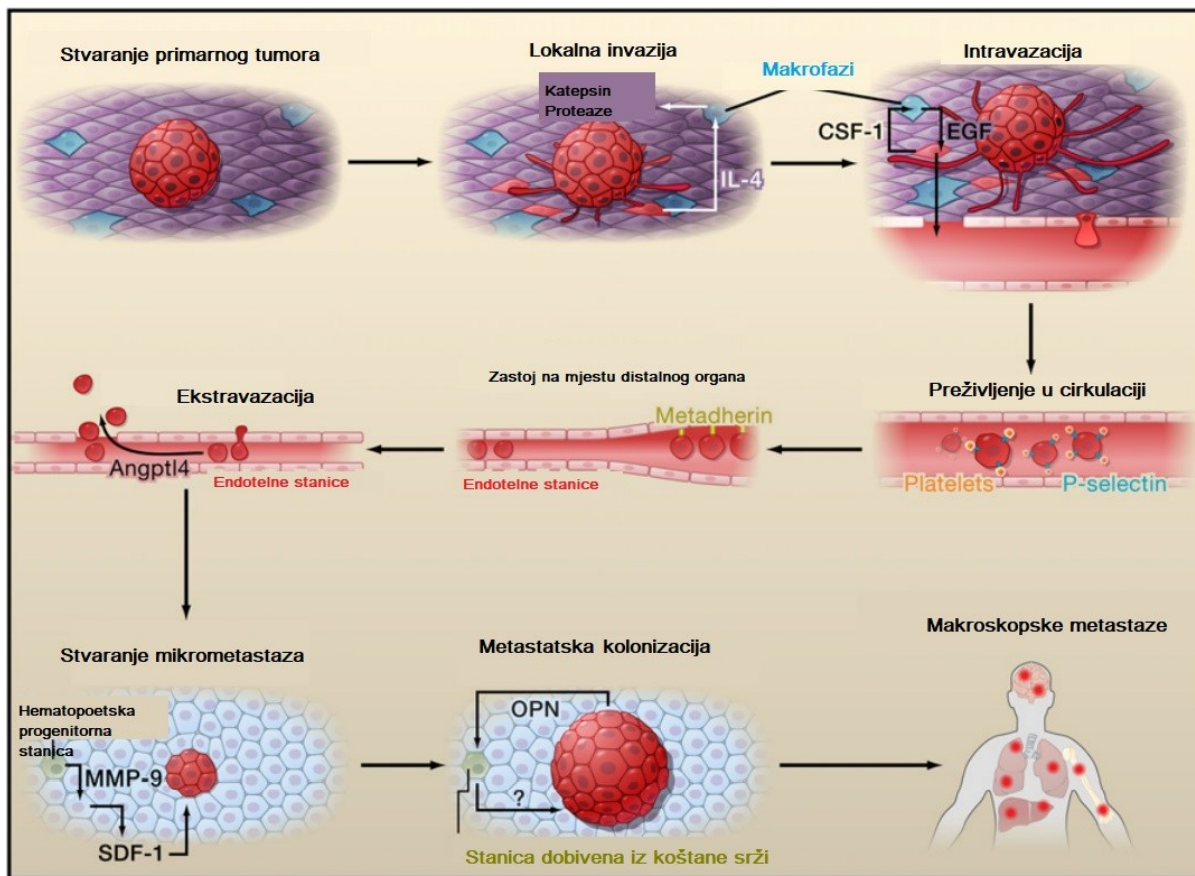
diseminirane tumorske stanice su na početku slabo adaptirane na novo okruženje. Mikrookolišne razlike uključuju razlike u stromalnim stanicama, sastavnicama ECM, dostupnim čimbenicima rasta i citokinima i mikroarhitekturi tkiva. Predložen je model opisan u poglavlju o MMP – premetastatskih niša. Po tom modelu primarni tumori otpuštaju sistemske signale tipa lizil oksidaze (LOX) (Psalia i Lyden, 2009.) koji induciraju organ-specifičnu „upregulaciju“ fibronektina iz rezidentnih tkivnih fibroblasta. Isto dovodi do mobilizacije VEGFR1 pozitivnih hematopoetskih progenitornih stanica iz koštane srži do mjesta budućih metastaza preko navodećeg signala između otpuštenog fibronektina i njemu srodnog receptora, integrina  $\alpha 4\beta 1$  koji je izražen u hematopoetskim progenitornim stanicama. Iste mogu mijenjati lokalne mikrookolišne uvjete sekrecijom MMP-9. Aktivacija MMP-9 na mjestima budućih metastaza rezultira stimulacijom raznih integrina kao i oslobađanjem molekula koje su bile sekvstrirane u ECM poput kemoatraktanta karcinomskih stanica SDF-1 (engl. *Stroma Derived Factor 1*) (Psalia i Lyden, 2009.). Svi navedeni događaji zbivaju se prije dolaska tumorskih stanica na mjesto budućih metastaza. Stvaranje premetastatskih niša moglo bi predstavljati važnu determinantu sklonosti metastaziranju i tkivnom tropizmu budući se spektar organ specifičnih metastaza stvorenih diseminacijom karcinoma pluća može mijenjati preusmjeravanjem hematopoetskih stanica koje stvaraju niše u druge organe (Psalia i Lyden, 2009.).

### **2.9.7. Stvaranje detektabilnih metastaza**

U slučaju kada diseminirane karcinomske stanice prežive početni doticaj sa mikrookolišem stranog tkiva i nastave postojati, i dalje nemaju sigurnost proliferacije i stvaranje velike makroskopske metastaze (Slika 18). Velika većina tumorskih stanica polako izumire kroz tjedne i mjesec ili perzistiraju kao mikrokolonije u stanju dugotrajne dormancije (Chambers i sur., 2002.). Diseminirane stanice mogu biti uglavnom utišane sa defektnom proliferacijom na metastatskom mjestu kao posljedicom nekompatibilnosti sa stranim mikrookolišem koji ih okružuje (Chambers i sur., 2002.). Sposobnost diseminirane tumorske stanice da izbjegne dormanciju i počne aktivnu proliferaciju ovisi o staničnim neautonomnim mehanizmima potrebnim za preobrazbu stranog mikrookoliša u pristupačniju sredinu. Na primjer, porast indolentnih diseminiranih tumorskih stanica ovisi o aktivaciji i mobilizaciji u cirkulaciju stanica proizašlih iz koštane srži i daljnjem angažiranju tih stanica na mjesta metastaza. U nekim slučajevima ti procesi mogu biti stimulirani sistemskim signalima otpuštenim od karcinomskih stanica poput osteopontina (OPN) ili SDF-1 (McAllister i sur., 2008.). Tumorske stanice u



mikrometastazama mogu kontinuirano proliferirati, međutim ukupan prirast može biti gotovo nikakav radi kontra učinka visoke razine apoptoze. Smatra se da je nemogućnost pokretanja neoangiogeneze od strane tumorskih stanica uzrok apoptoze (Chambers i sur., 2002.). Mikrookoliši specifičnih organa su različito prijemčljivi za proliferaciju i razvoj određenih tipova diseminiranih tumorskih stanica. Primjerice, stanice melanoma lako metastaziraju na potkožni presadak tkiva pluća, ali ne uspjevaju razviti rast na jednako postavljen i podjednako vaskulariziran potkožni presadak tkiva bubrega potvrđujući klinička opažanja da melanomi često daju plućne metastaze (Kudchadkar i sur., 2020.). Pronađeni su brojni geni čija ekspresija olakšava metastatsku kolonizaciju karcinoma dojke ciljano u kosti (Kang i sur., 2003.), pluća (Minn i sur., 2005.), mozak (Bos i sur., 2009). Navedeni geni određuju organ-specifični metastatski tropizam pomoću sposobnosti kompenzacije i nadvladanja nekompatibilnosti između intrinzičnih programa rasta diseminiranog tumora i potreba nametnutih od strane pojedinih mikrookoliša stranih tkiva okolo njih. Uspjeh metastatske kolonizacije ovisi i o svojstvu stanica sastavnica – iste moraju imati visok kapacitet samoobnavljanja ukoliko žele postići velik maligni rast. Samo pojedine subpopulacije neoplastičnih stanica prisutnih unutar tumorske mase, tzv. tumor inicijacijske stanice (TIC, engl. *Tumor-Initiating Cells*) posjeduju dovoljno jak kapacitet samoobnove. Po toj teoriji, jedna ili više samoobnovljivih TIC mora dieminirati tijekom maligne progresije da bi se mogla pojaviti makroskopski vidljiva metastaza (Slika 18). EMT promocijski transkripcijski čimbenici poput Snail, Twist i ZEB1 potiču ulazak maligne stanice u TIC status (Thiery i sur., 2009.). Isti čimbenici, kako je ranije rečeno potrebni su tumoru za pojačavanje lokalne invazivnosti. Konvergencija molekularnih puteva koji potiču invazivnost i samoobnavljanje tumorskih stanica je bitna, budući ti isti čimbenici olakšavaju fizičku diseminaciju tumorskih stanica i nakon diseminacije proliferaciju tih istih stanica na distalnim mjestima. Istovremeno rješavajući mikrookolišne inkompatibilnosti i aktivirajući puteve samoobnavljanja, samo mali broj diseminiranih tumorskih stanica može uspjeti u procesu metastatske kolonizacije i stvoriti makroskopske, klinički uočljive metastaze (Slika 18). Skupljanjem genetskih i/ili epigenetskih promjena kao i sa suradnjom sa neneoplastičnom stromom, karcinomske stanice uspjevaju završiti taj multifazični proces koji kulminira stvaranjem makroskopskih, smrtonosnih izraslina na mjestima distalnih organa.



**Slika 18.** Put od invazivnosti do metastaziranja. Preuzeto i prilagođeno prema Valastyan i Weinberg, 2011.

## 2.10. EPIGENETSKE PROMJENE TUMORA

Tumorska epigenetika proučava epigenetske modifikacije DNA tumorskih stanica koje ne uključuju promjene u slijedu nukleotida, već u načinu ekspresije genetskog koda. Epigenetski mehanizmi su nužni za održavanje ekspresije normalnih sekvenci tkivno specifičnih gena i bitni su za normalni razvoj (Sharma i sur., 2010.). Ovi mehanizmi podjednako su bitni, ako ne i bitniji od genskih mutacija tijekom maligne transformacije stanice. Poremećaj epigenetskih procesa u tumorima može dovesti do gubitka ekspresije gena koji se događaju do deset puta učestalije transkripcijskim utišavanjem (uzrokovano hipermetilacijom epigenetskog promotora CpG otočića) nego mutacijama. Manipulacija epigenetskim promjenama važan je čimbenik pri istraživanju prevencije, detekcije i terapije tumora (Novak, 2004.). U različitim tipovima tumora, razni epigenetski mehanizmi mogu biti poremećeni, poput utišavanja tumor supresor gena i aktivacije onkogeno promijenjenim obrascima metilacije CpG otočića, histonskim modifikacijama i disregulacijama DNA vežućih proteina.

### 2.10.1. DNA metilacija

Najistraživaniji epigenetski proces je DNA metilacija. DNA metilacija je proces u kojem se s univerzalnog staničnog metil donora S-adenozil metionina (SAM), metilna skupina dodaje na DNA. Tim dodavanjem se mijenja funkcija DNA. Dva od četiri DNA nukleotida mogu biti metilirana – citozin i adenin. Iako se CpG dinukleotidi (metilirani i nemetilirani) mogu naći u relativno niskoj frekvenciji posvuda u ljudskom genomu, frekvencija im značajno raste u kratkim odsječcima DNA nazvanima po gustoći CpG dinukleotida tzv. CpG otocima. CpG otoci se mogu definirati kao odsječci DNA dulji od 0,5 kb gdje suma gvanina i citozina iznosi više od 55% ukupnog broja baza. Reakcija DNA metilacije je katalizirana pomoću DNA metil-transferaza, odnosno DNMT. Metilacija DNA se odvija neposredno nakon replikacije prijenosom metilne skupine s donora S-adenozil-L-metionin (SAM ili AdoMet) u reakciji kataliziranoj pomoću DNA-metiltransferaze (DNMT, engl. *DNA Methyltransferases*). U sisavaca su pronađene tri specifične DNA-metiltransferaze. DNMT1 preferira hemimetilirane DNA *in vitro* što je u suglasju s njenom ulogom očuvanja metilacije, dok DNMT3a i DNMT3b metiliraju nemetiliranu i metiliranu DNA istim tempom, što je u izravnoj vezi s *de novo* metilaznom ulogom. DNA metilacija kod ljudi razlikuje se kod normalnih i tumorskih stanica. Normalni profil CpG

metilacije često bude promijenjen u stanicama koje postaju tumorske (Esteller, 2007.). CpG otoci koji prethode promotorima gena uobičajno nisu metilirani i budu transkripcijski aktivni, dok drugi individualni CpG dinukleotidi kroz cijeli genom budu uobičajno metilirani. U tumorskim stanicama, CpG otoci koji prethode promotorima tumor supresijskih gena često su hipermetilirani, dok je CpG metilacija regija onkogenih promotora i parazitarnih ponavljajućih sekvenci smanjena (Wong i Wei, 2011.).

Hipermetilacija promotorskih regija tumor supresorskih gena može rezultirati utišavanjem tih istih gena. Takav tip epigenetskih mutacija dozvoljava stanicama nekontrolirani rast i razvoj što vodi prema tumorigenezi (Esteller, 2007.). Dodatak metilne skupine citozinu uzrokuje čvrsto omatanje DNA oko histonskog proteina, što uzrokuje sprečavanje transkripcije iz DNA (utišavanje DNA). Geni koji su često uključeni u transkripcijsko utišavanje radi hipermetilacije promotora: ciklin ovisan inhibitor kinaze p16, inhibitor staničnog ciklusa MGMT, gen za popravak DNA *APC*, regulator staničnog ciklusa *MLH1* i *BRC1*, gen za popravak DNA (Jones i Baylin, 2002.). Hipermetilacija može dovesti do nestabilnosti mikrosatelita, koji su ponavljajuće sekvence DNA. Mikrosateliti su česti u normalnim DNA i uglavnom se sastoje od ponavljajućih citozin-adenin dinukleotida. Previše metilacije na promotoru gena za popravak DNA *MLH1* može uzrokovati nestabilnost mikrosatelita i produljiti ili skratiti ih. Nestabilnost mikrosatelita se povezuje s razvojem mnogih tumora, uključujući kolorektalni, endometrijalni, tumor jajnika i želuca.

### **2.10.2. Mikro RNA utišavanje gena**

Kod sisavaca, mikroRNA (miRNA) regulira oko 60% transkripcijske aktivnosti gena koji kodiraju proteine (Friedman i sur., 2009.). Neki miRNA također prolaze metilacijsko utišavanje u tumorskim stanicama (Saito i sur., 2006.). Let-7 i miR15716 igraju važnu ulogu u „down-regulaciji“ *RAS* i *BCL2* onkogeni i njihovo utišavanje se viđa u tumorskim stanicama (Baylin i Jones, 2002.). Smanjena ekspresija miR-125b1, miRNA koja djeluje kao tumor supresor viđa se u tumorima prostate, jajnika, dojke i tumorima glijalnih stanica. *In vitro* eksperimenti pokazuju da miR-125b1 cilja na dva gena, *HER2/neu* i *ESR1* koji se vežu uz karcinom dojke. DNA metilacija, posebno hipermetilacija jedan je od glavnih načina kako se miR-125b1 epigenetski utišava. Neki miRNA epigenetski su utišani u ranoj fazi karcinoma dojke, te bi stoga isti mogli biti korisni kao rani tumorski biljezi (Soto-Reyes i sur., 2012.). Epigenetsko utišavanje miRNA gena aberantnom

DNA metilacijom čest je događaj u tumorskim stanicama, trećina miRNA promotora aktivnih u normalnim mamarnim stanicama nađeno je hipermetilirano u stanicama karcinoma dojke.

### **2.10.3. HDAC**

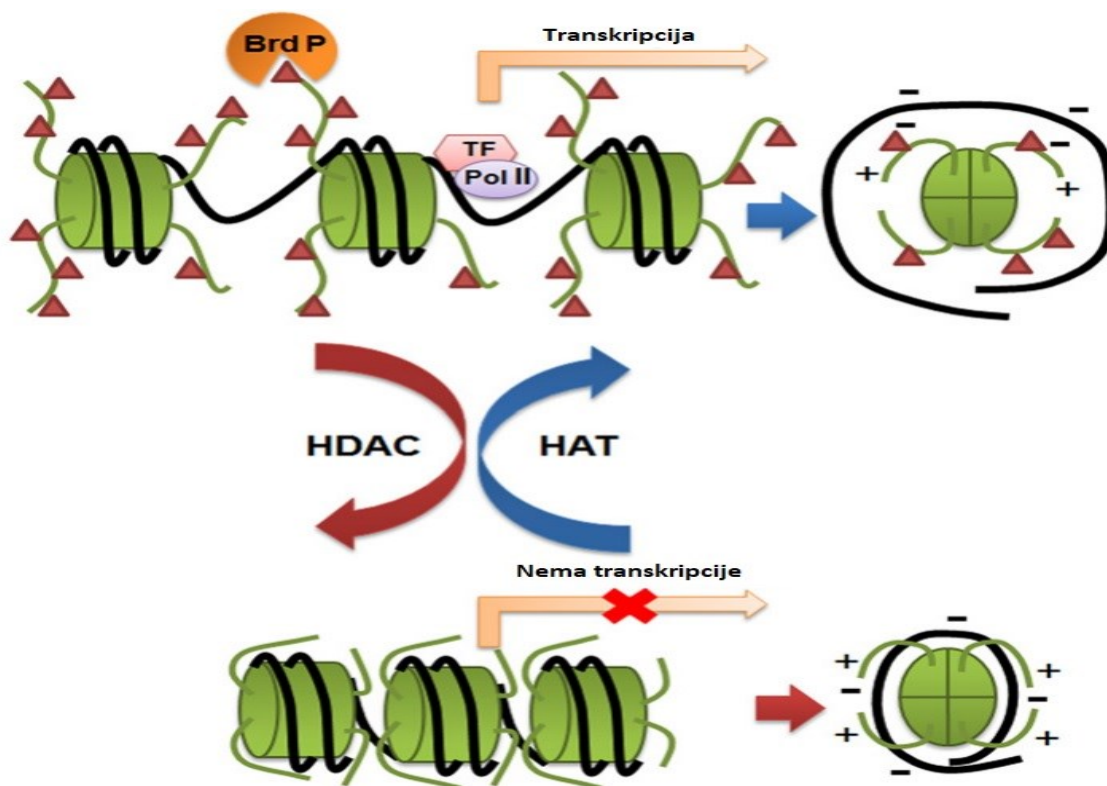
#### **2.10.3.1. Struktura kromatina**

Dvostruka zavojnica DNA formira se kada se dvije antiparalelne niti drže zajedno vodikovim vezama između komplementarnim purinskih i pirimidinskih baza. Svaka ljudska diploidna stanica sadrži preko dva metra DNA. Da bi sav taj materijal stao u jezgenu stanicu, koja je u prosjeku promjera 9 mikrometara, DNA se mora sabiti 10,000-20,000 puta (Woodcock i Ghosh, 2010.). Histoni su mali proteini koji služe kao jedinice za sabijanje kromatina. Blisko vezivanje DNA i histona zavisno je o međusobnom naboju; DNA je negativno nabijena molekula radi postojanja fosfatnih skupina, tako da snaga interakcije između DNA i histona ovisi o posttranslacijskoj modifikaciji repova histona koji mogu mijenjati svoj naboj. Isto je moguće radi posebne strukture histonskih proteina. Globularni dio predstavlja centralni dio histona dok repovi predstavljaju dio koji sadrži NH<sub>2</sub> i COOH skupine. Repovi se mogu modificirati brojnim posttranslacijskim modifikacijama poput metilacije i acetilacije. Te modifikacije kojima stanica regulira pristup DNA ovisi o enzimima koji se često nazivaju pisačima i brisačima (Cohen i sur., 2011.).

#### **2.10.3.2. Histonske modifikacije i transkripcija gena**

Dio genoma koji sadrži gene koji se dinamično prepisuju mora biti oblikovan otvoreno i fleksibilno. Dio kromatina koji je tako oblikovan zove se eukromatin. Zgusnuti, zatvoreni oblik kromatina zove se heterokromatin. Postoje dva načina kako se regulira potreba za ekspresijom specifičnih gena regulira u kratkom vremenskom intervalu histonskim posttranslacijskim modifikacijama – direktno, utječući na ukupnu strukturu kromatina ili indirektno, regulacijom vezanja efektorskih molekula (Bannister i Kouzarides, 2011.).

Generalno govoreći, hiperacetilacija histonskih repova inducira transkripcijske aktivnosti, dok je hipoacetilacija udružena sa represijom transkripcije (Slika 19).



**Slika 19.** Promjene konfiguracije kromatina pod utjecajem HDAC i HAT.

Gornji dio slike prikazuje otvoreni kromatin sa izloženim veznim mjestima za transkripcijski aparat. Donji dio slike prikazuje kompaktnu, transkripcijski inaktivnu formu kromatina. Ilustracije s desne strane prikazuju elektrostatske interakcije histona i DNA u otvorenoj i zatvorenoj formi. Preuzeto i prilagođeno prema Parbin i sur., 2013.

Acetilacija lizina dinamički je proces reguliran antagonističkim djelovanjem dvije skupine enzima; histonske acetiltransferaze (HAT) i histonske deacetilaze (HDAC). Posljedica lizinske acetilacije koja se zbiva po prijenosu acetilne skupine na  $\epsilon$ -amino skupinu lizinskog lanca je neutralizacija lizinskog pozitivnog naboja i posljedično slabljenje interakcije između histona i DNA. Kao posljedica kumulativne neutralizacije naboja na multiplim lizinskim mjestima, kromatin zauzima otvorenu, transkripcijski aktivnu konformaciju (Zentner i sur., 2013.). Proces je brz i odvija se u svega nekoliko minuta. HDAC su negativni regulatori genske aktivnosti. Treba naglasiti da ovi enzimi imaju i druge supstrate osim histona koji su uključeni u važne stanične funkcije uključivši staničnu proliferaciju i staničnu smrt. Ti supstrati su između ostalog transkripcijski čimbenici, hormonski receptori, citoskeletni proteini, proteini pratioci i razni signalni medijatori.

HDAC mogu također regulirati ekspresiju velikog broja gena direktnom interakcijom s transkripcijskim čimbenicima poput E2f, Stat3, p53, NF- $\kappa$ B, TFIIE (Lin i sur., 2006.). HDAC su uključeni u deacetilaciju i nehistskih proteina koji reguliraju važne stanične funkcije i homeostazu (progresija staničnog ciklusa, diferencijacija, apoptoza) (Minucci i Pelicci, 2006.).

Do sada je otkriveno 18 HDAC u sisavaca koji se mogu podijeliti u tri skupine prema sličnosti sa HDAC kvasca. Skupina I obuhvaća HDAC 1, 2, 3 i 8 i smješteni su u staničnoj jezgri. Izraženi su u svim ljudskim staničnim linijama i tkivima. Skupina II se dijeli u dvije podskupine; IIa (HDAC 4, 7 i 9), te HDACIIb (HDAC 6 i 10). Skupina II posjeduje tkivno-specifičnu ekspresiju i može se seliti između jezgre i citoplazme što je indikativno da ova skupina HDAC može biti uključena u acetilaciju ne-histskih proteina. Skupina III nazvana sirtuini (SIRT 1-7). Unutarstanična raspodjela i tkivna specifičnost su nepoznati. U skupini IV nalazi se samo HDAC11 i homologan je sa klasom I i II. Skupina I i II HDAC podliježe inhibiciji HDAC inhibitoru trichostatinu A (TSA), dok je skupina III rezistentna prema istome.

Histska metilacija odvija se na lizinskim i argininskim amino ostacima. Ove modifikacije nisu ovisne samo o ostacima (K4, K9, K27, K36, K79 u histonu 3 (H3)), već su ovisne i o statusu (mono, di- i trimetilacije). H3K4me<sub>2/3</sub>, H3K36me<sub>1/3</sub> i H3K79me<sub>1/2</sub> i H4K20me<sub>1</sub> modifikacije povezuju se sa aktivacijom transkripcije, dok se H3K9me<sub>2/3</sub>, H3K4me<sub>2/3</sub> i H4K20me<sub>3</sub> udružene s represijom transkripcije (Islam i sur., 2011.).

Histska metilacija ovisi o aktivnosti histon metilirajućih (KMT, histon lizin metiltransferaze) i demetilirajućih (KDM, histon lizin demetilaze) enzima. Obje skupine enzima imaju važnu ulogu u inicijaciji i razvoju karcinoma i njihove mutacije su dokazane u više vrsta malignoma. Metilacijske oznake na histonima su visoko specifične, odnosno mijenjaju ekspresiju na način koji je jedinstven za određeni tip normalne ili karcinomske stanice (Islam i sur., 2011.).

### **2.10.3.3. Uloga HDAC u karcinomima**

Karakteristika humanog karcinoma je deregulacija metilacije DNA i posttranslacijske modifikacije histona, posebice histonska acetilacija što ima negativne posljedice na transkripciju gena. Gubitak acetilirane Lys16 i trimetilirane Lys20 histona H4 učestalo se događa u ljudskim karcinomima (Fraga i sur., 2005.) što se povezuje sa hipometilacijom ponavljajućih sekvenci. Ove promjene događaju se rano u tumorogenezi, što pokazuje da je globalni gubitak

monoacetiliranih i trimetiliranih oblika histona H4 bitan događaj u karcinogenezi (Fraga i sur., 2005.). Druga istraživanja pokazala je da se smanjenje histonske acetilacije ne odvija samo u tumorigenezi, već i kod tumorske invazije i metastaziranja (Yasui i sur. 2003.).

Mehanizmi hipoacetilacije objašnjavaju se smanjenom HAT aktivnošću kao posljedicom mutacija ili kromosomskih translokacija karakterističnih za leukemije ili promjenama koje dovode do pojačane aktivnosti HDAC. Prema istraživanjima, postoji više načina kako HDAC djeluje u razvoju tumora. Današnje teorije fokusiraju se prema aberantnom novačenju HDAC na specifične promotore preko interakcije sa fuzijskim proteinima što rezultira kromosomskim translokacijama koje su tipične za neke hematološke malignome. Primjer je akutna promijelocitna leukemija (APL). Genetsko obilježje ove bolesti je kromosomska translokacija kojom nastaje fuzijski protein koji sadrži RAR-PML i RAR-PLZF. Ovi fuzijski proteini vežu se za elemente odgovora retinoične kiseline RARE (engl. *Retinoic Acid Responsive Elements*) i novače kompleks HDAC represora visokim afinitetom i sprječavaju vezanje retinoične kiseline i ekspresiju gena koji reguliraju normalnu diferencijaciju i proliferaciju mijeloidnih stanica (Lin i sur., 2001.). Ovo je izolirani primjer genske ekspresije HDAC, no ne postoji uniformni mehanizam djelovanja, već se razlikuje od tumora do tumora. HDAC1 je povišen u karcinomu želuca (Choi i sur., 2001.), prostate (Halkidou i sur., 2004), debelog crijeva (Wilson i sur., 2006.) i dojke (Zhang i sur., 2005.). HDAC2 je povišen u karcinomima cerviksa (Huang i sur., 2005.), želuca (Song i sur., 2005.).

Te spoznaje navode da represija transkripcije tumor supresor gena pretjeranom ekspresijom i aberantnim novačenjem HDAC na regije promotora može biti u sklopu nastanka i progresije tumora.

HDAC skupine III ili sirtuini su posljednje vrijeme u predmet mnogih istraživanja. Isti su bitni u regulaciji ekspresije gena, apoptozi, odgovoru na stres, popravku DNA, staničnom ciklusu i genomskoj stabilnosti što je indikativno da je ova skupina HDAC ključna u regulaciji normalnog staničnog rasta i proliferacije. Najistaknutiji član obitelji SIRT1 regulira razinu acetilacije histona (Pruitt i sur., 2006.) i acetilaciju transkripcijskih čimbenika poput p53 (Vaziri i sur., 2001.), p300 histonsku acetiltransferazu (Bouras i sur., 2005.), NF- $\kappa$ B (Yeung i sur., 2004.). Deregulacija sirtuina prema tome ima važnost u karcinogenezi. U više radova pokazuje se povišena ili smanjena regulacija SIRT gena u karcinomima. SIRT1 je povišen u karcinomu pluća (Yeung i



sur., 2004.), karcinomu prostate (Kuzmichev i sur., 2005.), dok je smanjen u karcinomu debelog crijeva (Ozdogan i sur., 2006.). Razine acetilacije K16-H4 i K9-H3, histonskih substrata SIRT1 promijenjene su u mnogih karcinoma. Terapija SIRT1 inhibitorima pokreće reekspresiju tumor supresor gena zajedno sa porastom razina acetilacije K16-H4 i K9-H3 u staničnim linijama karcinoma dojke i debelog crijeva (Pruitt i sur., 2006.).

Povišena regulacija SIRT1 ekspresije u humanim karcinomima može inducirati deregulaciju ključnih proteina koji reguliraju bitne stanične funkcije. Porast ekspresije SIRT1 u stanicama karcinoma deacetilira i inaktivira p53 čime inhibira tumor supresorsku funkciju ovog proteina (Chen i sur., 2005.). Ku70 je protein induciran stresom kojeg regulira SIRT1. SIRT1 inhibira stresom induciranu staničnu smrt preko deacetilacije Ku70 koji je čimbenik popravka DNA čime omogućava preživljenje tumorske stanice (Cohen i sur., 2004.). Interakcija SIRT1 sa transkripcijskim čimbenikom E2F1 smanjuje njegovu transkripcijsku aktivnost i apoptotsku funkciju (Wang i sur., 2006.).

#### **2.10.3.4. Terapijske implikacije inhibitora HDAC**

Promijenjena ekspresija HDAC može dovesti do promijena u karcinogenezi i progresiji tumora što čini HDAC atraktivnom metom antitumorske terapije. Do danas je otkriven širok spektar prirodnih i sintetskih spojeva koji mogu inhibirati djelovanje klasa I, II i IV HDAC. Po kemijskom sastavu i mehanizmima inhibicije djele se na hidroksaminske kiseline, karboksilne kiseline, benzamide, epoksidge i cikličke peptide (Villar-Garea i Esteller, 2004.).

Acetilirano stanje histona H3 i H4 udruženo je s aktivnim kromatinom i ekspresijom gena, po čemu bi terapija HDAC inhibitorima trebala dovesti do općeg povećanja genske ekspresije, međutim dostupni podaci pokazuju da HDAC inhibitori dovode do transkripcijskih promjena samo nekih skupina gena (Marks i sur., 2004.) i da je broj aktiviranih i deaktiviranih gena vrlo sličan nezavisno o HDAC inhibitorima što implicira da je struktura kromatina i transkripcija regulirana pomoću više mehanizama koji uključuju druge histonske modifikacije, DNA metilaciju i vezanje multiproteinskog kompleksa. Mnogi geni pod utjecajem HDAC inhibitora su ključni regulatori bitnih bioloških procesa u tumorskoj progresiji. Tretman HDAC inhibitorima inducira ekspresiju ciklin-ovisnog inhibitora p21<sup>Waf1</sup>. HDAC inhibitori pokazuju antiangiogeno djelovanje snižavanjem regulacije proangiogenih gena poput VEGF, bFGF i HIF-1 $\alpha$  (Qian i sur., 2006.). Drugi učinak HDAC inhibitora je i inhibicija popravka DNA, tako da mogu senzibilizirati

tumorske stanice na kemo i radioterapiju povećavajući učinke oštećenja DNA ovim terapijama (Munshi i sur., 2005.).

Od inhibitora sirtuina treba naglasiti nikotinamid, ujedno i prvi otkriveni inhibitor, zatim sirtinol, cambinol, dihidrokumarin i indoli. Svima je zajednička karakteristika inhibicija stanične proliferacije povećanjem razine acetilacije K16-H4 i ponovna ekspresija utišanih tumor supresor gena u karcinoma (Pruitt i sur., 2006.).

Uspješnost HDAC inhibitora poput TSA, SAHA, MS-275 u terapiji karcinoma pokazana je u modelima raznih solidnih i hematoloških malignoma i eksperimentalnih životinjskih modela. Ovi inhibitori pokazuju dobru antitumorsku aktivnost bez očite štetnosti u animalnim modelima (McClure i sur., 2018.). U tijeku je nekoliko kliničkih ispitivanja faze I i II HDAC inhibitora kao samostalnih ili u kombinaciji sa drugim lijekovima (Lin i sur., 2006.) dok je SAHA odobrena kao lijek za kutani T-stanični limfom, oblik non-Hodgkin limfoma.

#### **2.10.3.5. Uloga polifenola u inhibiciji staničnog rasta i smrti**

Svi do danas istraženi polifenoli induciraju apoptozu i autofagiju tumorskih stanica bez utjecaja na normalne stanice. Epikatehin i kvercetin stimuliraju autofagiju simultanom promocijom deacetilacije citoplazmatskih proteina (Pietrocola i sur., 2012.). Neki polifenoli mogu inducirati G0/G1 (učinak zastoja rasta) i/ili G2/S (antimitotički učinak) faza zastoja staničnog ciklusa raznih linija humanih karcinomskih stanica (Casagrande i sur., 2001.). Indukcija autofagije i apoptoza su vrlo bitni mehanizmi prevencije karcinoma polifenolima iz prehrane. Isti predstavlja vrlo učinkovit protutumorski sustav koji se temelji na blokiranju ili supresiji višeslojnog procesa karcinogeneze koji se dovodi u vezu sa šest osnovnih postulata karcinoma: samodostatna proliferacija, neosjetljivost na antiproliferativne signale, izbjegavanje apoptoze, nelimitirani potencijal replikacije, održavanje vaskularizacije i tkivna invazija i metastaziranje (Hanahan i Weinberg, 2011.). Kemoprevencija bazirana na dietarnim polifenolima lišena je nuspojava budući da pokazuje selektivnu toksičnost na maligne stanice.

Polifenoli izazivaju zastoj rasta i povećavaju apoptozu karcinomskih stanica na različite načine. Antiproliferativni učinci dietarnih polifenola povezuju se s njihovom mogućnošću regulacije odgovora na oksidativni stres i/ili oštećenje DNA, supresiju angiogeneze i inhibiciju raznih proliferativnih signalnih puteva. Imaju utjecaj na sve aspekte karcinogeneze u pojedinim

stadijima preko inhibicije raznih puteva preživljenja vezanih za NF- $\kappa$ B, PI3K, AKT i MAP kinaze kao i stimulacijom ekspresije tumor supresor gena (*p53*, *BRCA1*, *BRCA2*) (Surh, 2003.; Hanahan i Weinberg, 2011; Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). Svi istraženi polifenoli osim apigenina mogu modificirati redoks procese stanice kao potentni sakupljači radikala. Također su direktni inhibitori enzima uključenih u proizvodnju reaktivnih endogenih radikala. Polifenoli su također modulatori ekspresije proteina vezanih na stanične antioksidativne mehanizme i detoksifikaciju, najčešće preko regulacije transkripcijske aktivnosti Nrf2.

#### **2.10.3.6. Uloga resveratrola u epigenetskim promjenama**

Antitumorski učinak resveratrola preko djelovanja na HDAC dokazan je u brojnim tumorima, *in vitro* i *in vivo* (Pervaiz, 2003.).

Kod karcinoma prostate tumor supresor gen *PTEN* (homolog fosfataze i tenzina) izbrisan je na kromosomu 10 ili inaktiviran negativnim regulatorom MTA1/HDAC (metastazama pridružen protein1). Resveratrol djeluje na MTA1/HDAC kompleks dokidanjem njegovog negativnog epigenetskog učinka i može reaktivirati tumor supresor gen *PTEN* (Dhar i sur., 2015.). Sniženom regulacijom MTA1 resveratrolom raskida se MTA1/HDAC kompleks, aktiviraju se proapoptotski geni *Bax* i *p21* i pokreće apoptoza u staničnoj liniji raka prostate (Kumar i sur., 2015.). Snižena regulacija MTA1 resveratrolom posredovana je preko p53 acetilacije (Kai i sur., 2010.). Kumar i suradnici su također pokazali da SIRT1 posreduje pri inhibiciji fosforiliranog ribosomskog proteina S6 kinaze (pS6K) nakon aplikacije resveratrolom u staničnoj liniji raka prostate. Resveratrol je inhibirao stanični rast induciranjem apoptoze preko inhibicije SIRT1 posredovane S6K fosforilacije (Li i sur., 2013.).

Kod karcinoma kolona SIRT1 je sniženo reguliran, dok je razina NF- $\kappa$ B povišena. Primjenom resveratrola odnos se mijenja (Singh i sur., 2010.). Pretjerana ekspresija SIRT1 pokazuje antiproliferativni učinak na staničnu liniju karcinoma kolona (Firestein i sur., 2008.). U staničnoj liniji karcinoma kolorektuma resveratrol inhibira staničnu proliferaciju, invaziju i metastaziranje moduliranjem regulatornih gena staničnog ciklusa i pospješivanjem apoptoze pozitivnom regulacijom p53 i inhibicijom antiapoptotskih gena. Inhibicija NF- $\kappa$ B nuklearne translokacije prestaje sa smanjenim razinama SIRT1 mRNA što sugerira da resveratrol djeluje u ovisnosti o SIRT1 (Buhrmann i sur., 2016.).

## 2.11. OKSIDACIJSKI STRES I TUMOR

### 2.11.1. Učinak ROS-a na angiogenezu i rast tumora

Reaktivne vrste kisika su kratkoživi, nestabilni derivati kisika koji su visoko reaktivni i stvaraju se kao nusprodukti staničnog metabolizma. Superoksidni anion ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksil radikal ( $\cdot OH$ ) primjeri su radikalnih i neradikalnih oblika koji su stvoreni djelomičnom redukcijom kisika. Navedene molekule igraju središnju ulogu u staničnoj signalizaciji i nužne su za normalnu funkciju kako normalne, tako i tumorske stanice (Snezhkina i sur., 2019.). Održavanje regulacije redoks homeostaze je neophodno za normalne fiziološke funkcije stanice i preživljenje (Ray i sur., 2012.). Bilo kakva promjena u unutarstaničnoj koncentraciji ROS-a doprinosi raznim patološkim stanjima. Tumorske stanice sadrže visoke unutarstanične razine ROS-a u komparaciji sa normalnim stanicama radi visoke razine aerobne glikolize koja uzrokuje oksidativni stres (El Sayed i sur., 2013.). Visoke razine ROS-a nakupljaju se kao posljedica neravnoteže produkcije i eliminacije. Visoka razina ROS-a mijenja razne signalne puteve koje imaju utjecaj na stanični metabolizam. Kod tumorskih stanica, uz povišene razine ROS-a viđa se „upregulacija“ antioksidativnih obrambenih mehanizama (Gorrini i sur., 2013.). Daljnji porast razina ROS udružen je sa „downregulacijom“ staničnih antioksidativnih obrambenih sustava u malignomima preko raznih molekularnih ciljeva uključujući NF- $\kappa$ B i nuklearni respiratorni čimbenik 2 (Nrf2) (Morgan i Liu, 2011.). Visoke razine ROS-a oštećuju staničnu DNA (Cook i sur., 2004.), proteine (Stadtman i Levine, 2000.) i lipide (Fruhwrth i Hermetter, 2008.) što potiče genomsku nestabilnost i onkogenezu. Visoka razina oksidativnog stresa gura stanicu prema apoptozi, ali velik antioksidativni kapacitet tumorske stanice se dodatno povećava u svrhu prevencije stvaranja visoke razine ROS-a i održavanja redoks ravnoteže. Visoka razina ROS enzima za čišćenje kalibrira ROS stvaranje i dozvoljava aktivaciju pro-tumorigenih signalnih puteva bez induciranja stanične smrti u tumoru (Gorrini i sur., 2013.). Tumorske stanice, naspram normalnih imaju promijenjen redoks okoliš i to svojstvo ih čini osjetljivijima na promjene ROS i redoks manipulacije (Weinberg i sur., 2019.). Eliminacija ROS preko enzima za čišćenje ili povećana produkcija ROS-a mogle bi biti učinkovite mjere u terapiji karcinoma (Wang i sur., 2021.).

### **2.11.2. Homeostaza ROS-a**

Trajno stvaranje i detoksifikacija ROS-a strogo je kontrolirano redoks homeostazom u normalnim stanicama. Nejednakost između stvaranja oksidansa i njihovog uklanjanja zaštitinim mehanizmima ili antioksidansima zove se oksidativni stres. Oksidativni stres dovodi do nakupljanja ROS-a u stanici što dovodi do poremećaja u redoks procesima što pak može štetiti vitalnim staničnim komponentama poput proteina, lipida i DNA i potencijalno povećati rizik somatskih mutacija i neoplastičke transformacije. U stanici je prisutno više vrsta slobodnih i neslobodnih radikala ROS-a. Glavni izvor stvaranja ROS-a smješten je unutar mitohondrijskog elektronskog prijenosnog lanca od kuda elektroni mogu skrenuti sa puta i reagirati sa kisikom (Poyton i sur., 2009.). Stimulacija receptora čimbenika rasta koja aktivira reduciranu NADPH oksidazu može proizvest ROS i pretvoriti NADPH u superoksid. Snažan antioksidacijski sustav koji čisti ROS drži pod kontrolom ekvilibrij staničnog redoks sustava. Većina superoksida transportira se u mitohondrijski matriks gdje ih enzimi superoksid dismutaze dismutiraju u superoksid dismutazu ovisnu o manganu (MnSOD) ili superoksid dismutazu 2 (SOD2). Neki superoksidi se transportiraju u citosol gdje su dismutirani do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citosolnim enzimom SOD1 (Fukai i sur., 2011.). Glutation (GSH) je najvažnija neenzimatska komponenta unutarstaničnih antioksidativnih mehanizama budući regulira unutarstanične razine NADPH u smislu postizanja ekvilibrija redoksa (NADP/NADPH odnos i reducirani glutation (GSH)/oksidirani glutation(GSSG)) (Moreno-Sanchez i sur., 2017.). Nesrazmjer NADPH sinteze i potrošnje određuje unutarstaničnu razinu NADPH. Put pentoze fosfata (PPP, engl. *Pentose Phosphate Patway*) i mitohondrijski metabolizam su glavni izvori unutarstaničnog NADPH. Glavni potrošač unutarstaničnog NADPH je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoksifikacija pomoću glutation peroksidaze (GPX) i peroksiredoksina (PRX) i sinteze masnih kiselina (Schafer i Buettner, 2001.). Proizvodnja i potrošnja NADPH unutar stanice trebala bi biti usklađena na način da održava NADPH homeostazu. Isto je posebno bitno tijekom stvaranja solidnog tumora i kada su tumorske stanice pod energetske stresom tijekom metastaziranja.

### **2.11.3. ROS i karcinogeneza**

Oksidativni stres se povezuje sa razvojem tumora i progresijom na način da povećana učestalost DNA mutacija rezultira oštećenjem DNA, genomskom nestabilnosti i proliferacijom stanice (Visconti i Grieco, 2009.). Tumorske stanice proizvode više prostorno koncentriranog ROS-a od normalnih stanica što pojačano aktivira puteve staničnog signaliziranja potrebne za staničnu

transformaciju i karcinogenezu. U odnosu na normalnu stanicu, jedna od najkarakterističnijih karakteristika tumorskih stanica je njihovo trajno pro-oksidativno stanje koje može voditi prema unutarnjem oksidativnom stresu (Toyokuni i sur., 1995.). Pretjerano stvaranje ROS-a i niska razina ili deaktivacija antioksidativnih mehanizama uzrokuju povećan oksidativni stres u tumorskoj stanici. Tumorske stanice imaju osmišljene načine samozaštite od unutrašnjeg oksidativnog stresa i razvile su sofisticirane adaptivne načine koje uključuju efektivnu reorganizaciju antioksidativnih funkcija i dozvoljavaju „upregulaciju“ molekula vezanih za preživljenje (Huang i sur., 2000.). Osim porasta razine mutacija, ROS imaju ulogu u nastajanju karcinoma osim porastom učestalosti mutacija i oslabljivanjem pro-tumorigenih signalnih puteva. Disulfidne veze u pojedinim proteinima oksidirane su preko ROS-a što ima utjecaja na njihovu aktivnost, posebno u superobitelji tirozin fosfataza (Tonks, 2006.). Tumor supresorski gen *PTEN* (engl. *Phosphatase And Tensin Homolog*) inaktiviran oksidacijom je najbolje objašnjenje vezano uz rast tumora (Silva i sur., 2008.). PI3K/Akt signalni put, koji je jedan od najčešće aktiviranih puteva u tumorskim stanicama je hiperaktivan kada je *PTEN* inhibiran od strane ROS-a. Drugi primjer inhibicije fosfataze preko ROS-a je MAPK koja povećava aktivnost izvanstanične signalom regulirane kinaze (ERK). Aktivacija ovih puteva povećava unutarstaničnu koncentraciju ROS inhibicijom transkripcijskog čimbenika FOXO (engl. *Forkhead Box Transcription Factor*) koji povećava stvaranje antioksidansa poput SOD2, katalaze i sestrin3 (Nogueira, 2008.).

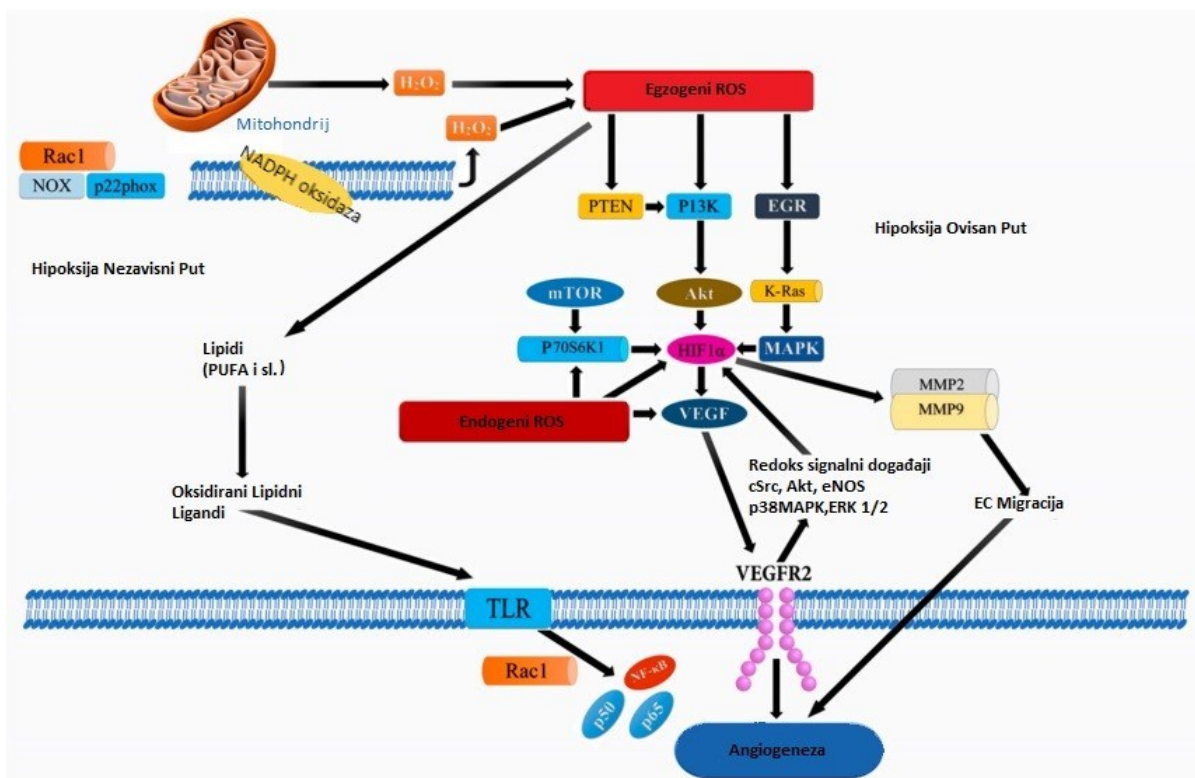
#### **2.11.4. ROS i metastaziranje**

ROS ima bitnu ulogu u migraciji i invaziji tumorskih stanica. TGF- $\beta$ 1 se udružuje sa aktivatorom plasminogena urokinaznog tipa (uPA) i MMP-9 proteinima u svrhu ubrzavanja pokretljivosti stanica i invazije na priležće ili distalne regije preko ROS ovisnih procesa (Tobar i sur., 2010.). Drugo istraživanje je pokazalo da ROS povećava migraciju tumorskih stanica uzrokovajući hipoksiju, posredovanu ekspresijom MMP i katepsina (Kamiya i sur., 2016.). TGF- $\beta$ 1 inducirana epitelno-mezenhimalna tranzicija u MDA-MB-231C i MCG-10A staničnim linijama zahtjeva o NOX4 ovisno ROS stvaranje (Zhang i sur., 2013.). p53 je uključen u staničnu migraciju i koristi citokin TGF- $\beta$ 1 (Marine i Berx, 2009.). Mitohondrijska greška uzrokuje visoke razine ROS-a, što utječe na CXCL14 ekspresiju preko AP-1 signalizacije što utječe na mobilnost stanice porastom unutarstaničnog  $Ca^{2+}$  (Pelicano i sur., 2009.). ROS također može uzrokovati promjene u epigenetici u promotorskoj regiji E-kadherina i drugih tumor supresijskih gena što dovodi do

razvoja tumora i metastaziranja. Povećana Snail ekspresija uzrokuje hipermetilaciju u genu promotoru. Snail koristi HDAC1 i DNMT1 da uzrokuje DNA metilaciju (Lim i sur., 2008.).

### **2.11.5. ROS i angiogeneza**

ROS ovisna angiogeneza (Slika 20) započinje preko tumorske proliferacije koja pojačava metabolizam što dovodi do stvaranje visoke razine ROS-a (de Sa Junior i sur., 2017.). Povišene razine ROS-a dovode do oksidativnog stresa u tumorskom mikrookolišu koji započinje sekreciju angiogenih modulatora (Dewhirst i sur., 2008.). Endogeni i egzogeni ROS pokreće stimulaciju čimbenika rasta, citokina i transkripcijskih čimbenika poput VEGF i HIF-1 $\alpha$  koji potiču migraciju tumora i proliferaciju preko ROS ovisnog staničnog signaliziranja (Ushio-Fukai, 2004.). Signalna kaskada preko ROS medijacije pokreće VEGF sekreciju i aktivaciju PI3K/Akt/mTOR puta preko hipoksija nezavisnih ili zavisnih mehanizama (preko stabilizacije HIF-1 $\alpha$  koji povećava stvaranje VEGF) (Karar i Maity, 2011.). Signalni put Ras također upregulira VEGF sekreciju (Rezatabar i sur., 2019.). Mutantni *p53* također modulira angiogeni odgovor u tumorskoj proliferaciji preko ROS posredovane aktivacije VEGF-A i HIF-1 u HCT116 stanicama ljudskog karcinoma kolona (Khromova i sur., 2009.). Mehanizam ROS posredovane angiogeneze ekstenzivno je proučavan da bi se razumjela signalna kaskada koja modulira progresiju tumora (Slika 20). U istraživanju na MDA-MB-231 tumorskim stanicama karcinom dojke deferoksamin (DFO) je inducirao HIF-1 $\alpha$  preko ERK1/2 fosforilacije koja je potaknula tumorsku migraciju u metastaziranje (Liu i sur., 2014.). Povišene koncentracije EGF mogu potaknuti stvaranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji stimulira p70S6K1 preko PI3K/Akt puteva koji vode prema nizvodnoj aktivaciji VEGF i HIF-1 $\alpha$  (Han i sur., 2014.). EGF vodi do povećanog stvaranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u OVCAR-3 stanicama karcinom jajnika što aktivira AKT7p70S6K1 put i rezultira pojačanom VEGF ekspresijom (Liu i sur., 2006.). Pretjerana ekspresija katalaze i rapamicina smanjuje angiogenezu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivira PI3K/Akt/mTOR signalnu kaskadu Ras inaktivacijom fosfataze i PTEN reverzibilnom oksidacijom u fosfatazama cisteinske tiolne skupine (Brewer i sur., 2015.). Terapeutski ciljevi sa antioksidativnim potencijalom i ciljanje naknadnih signalnih kaskada biti će od kliničkog značaja u liječenju pacijenata preko „downregulacije“ neovaskularizacije. Različiti pristupi popravka redoks neravnoteže, jedan su od mogućih načina liječenja. Buduća istraživanja ROS-ovisnih bolesti mogla bi biti od kliničkog značaja za razvoj terapije.



**Slika 20.** Utjecaj ROS na angiogenezu.

Aktivacija angiogeneze preko ROS-a hipoksija ovisnim i hipoksija neovisnim mehanizmom. Hipoksija ovisan put povećava VEGF ekspresiju preko fosfinositid-3-kinazne regulatorne podjedinice /AKT serin/treonin kinaze/mehanističke mete rapamicin kinaze (PI3K/Akt/mTOR), PTEN i MAPK signalne kaskade preko HIF-1 $\alpha$  i p70S6K1 (ribosomski protein S6 kinaza B1) što otpušta različite citokine, čimbenike rasta i urregulira MMP što vodi prema angiogenezi. Hipoksija nezavisni put vodi prema angiogenezi preko oksidativnih lipidnih liganda koji aktiviraju NF- $\kappa$ B. Preuzeto i prilagođeno prema Vaishali i sur., 2019.

### 2.11.6. Stanična apoptoza i ROS

Gotovo svi oblici oštećenja DNA poput modifikacija baza, lomova lanaca, unakrsno povezivanje DNA i proteina su inducirani putem ROS-a što se povezuje sa tumorskom inicijacijom i razvojem (Khan i sur., 2010.). Paradoks bioloških sustava je da ROS može inducirati apoptotsku staničnu smrt što je bitan pristup u terapiji tumora. ROS oštećuje mitohondrijsku membranu i otvara mitohondrijske tranzicijske pore permeabilnosti (PTP) i time interferira sa mitohondrijskim elektronskim prijenosnim lancem i inducira oslobađanje citokroma c. U citosolu, zajedno sa Apaf-1 (engl. *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*) i prokaspazom-9, citokrom c tvori apoptosome što dovodi do aktivacije kaspaze-9 koja tada aktivira efektorne kaspaze, npr. kaspazu-3 što rezultira cijepanjem staničnih proteina i apoptotskom staničnom smrti (Danial i



sur., 2004.). Vodikov peroksid je najvažniji iz ROS skupine i direktan je i moćan pokretač apoptoze (Giorgio, 2007.). Protutumorska sredstva induciraju apoptozu tumorske stanice i autofagiju preko stvaranja ROS-a. Polifenol resveratrol inducira mitohondrijsku akumulaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulacijom antioksidantnih enzima koji induciraju apoptozu u tumorima prostate, jetre i dojke (Khan i sur., 2013.).

### ***2.11.7. Antioksidacijski mehanizmi***

Oksidativni stres se događa kada se ravnoteža stvaranja ROS-a i detoksifikacije poremeti u korist ROS-a što dovodi do poremećene funkcije stanice. ROS može ireverzibilno oštetiti molekule poput DNA, proteina ili lipide što može potaknuti karcinogenezu. Stoga je ravnoteža ROS-a vrlo bitna za normalno funkcioniranje stanice. Antioksidant je molekula koja ima mogućnost prevencije ili usporavanja oksidacije makromolekula. Uloga antioksidansa je sniziti ili prekinuti ove lančane reakcije odstranjivanjem slobodnih radikala ili inhibicijom druge oksidativne reakcije na način da sam bude oksidiran. Tako da su antioksidansi često redukcijske tvari poput polifenola ili tiola (Duarte i Lunec, 2005.). Poremećaj ili inhibicija antioksidativnih enzima dovodi do oksidativnog stresa i može dovesti do oštećenja ili lize stanice (Valko i sur., 2007.). Mehanizmi antioksidativne obrane su: 1. blokada stvaranja slobodnih radikala; 2. uklanjanje oksidansa; 3. pretvaranje toksičnih slobodnih radikala u manje toksične spojeve; 4. sprečavanje stvaranja sekundarnih toksičnih metabolita i medijatora upale; 5. blokada lančanog širenja sekundarnih oksidansa; 6. popravak oštećenih molekula; 7. inicijacija i pospješivanje endogenih obrambenih sustava. Svi navedeni obrambeni mehanizmi surađuju u svrhu zaštite od oksidativnog stresa. Antioksidativni sustavi u ljudskom tijelu sastoje se od snažnih neenzimatskih i enzimatskih antioksidanta (Halliwell, 2007.).

Antioksidativni enzimi sastoje se od tri razreda – katalaze, superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPX). Indukcija ovih enzima predstavlja specifičan odgovor na oksidativni stres Uloga SOD je uklanjanje superoksidnih radikala i pretvorba istih u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhao i sur., 2021.). Uloga GPX je redukcija vodikovog peroksida, lipidnih hidroperoksidaza i drugih organskih hidroperoksida (Handy i Loscalzo, 2022.). Glutation-S-transferaze (GST) predstavljaju veliku skupinu detoksikirajućih enzima koji čine obitelj multifunkcionalnih proteina uključenih u staničnu detoksifikaciju citotoksičnih i genotoksičnih sastojaka i u zaštiti tkiva od oksidativnog oštećenja (Strange i sur., 2001.) Osim uloga u endogenom metabolizmu ovi enzimi se povezuju

sa detoksifikacijom ksenobiotika poput lijekova, karcinogena i okolišnih zagađivača. GPX i GST se inaktiviraju hidroperoksidazama koji djeluju toksično direktno oksidacijom SH skupine proteina ili indirektno stvaranjem hidroksil radikala. SOD katalizira raspad superoksidnog aniona u kisik i vodikov peroksid (Zelko i sur., 2002.). Odstranjuje  $O_2$  katalizirajući reakciju dismutaze. U odsustvu ovog enzima, reakcija je vrlo spora.

Katalaze ( $H_2O_2$  oksidoreduktaze) sastavljene su od četiri polipeptidna lanca, svaki lanac je dugačak preko 500 aminokiselina i sadrži četiri porfirinske hem (željezne) grupe čime može reagirati sa  $H_2O_2$ . Enzimatski modusi aktivnosti katalaza i razlaganju  $H_2O_2$  su katalitički i peroksidacijski. Stopa aktivnosti katalaza je najviša među antioksidativnim enzimima.

Katalaze postoje u eukariotskim i bakterijskim stanicama. Primarna uloga katalaze u staničnom antioksidativnom obrambenom mehanizmu je smanjenje nakupljanja  $H_2O_2$  (Ho i sur., 2004.). Pretjerana ekspresija katalaza čini stanicu rezistentnijom na toksičnost  $H_2O_2$  i oksidativnu štetu. Bolesnici sa prirođenom deficijencijom katalaze skloniji su razvoju oralne gangrene radi oštećenja tkiva usljed  $H_2O_2$  koji nastaje od bakterija koji ga proizvode poput streptokoka i pneumokoka.

Glutationski sustav uključuje glutation S-transferaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze. Glutation S-transferaze su skupina enzimatskih antioksidansa koji kataliziraju raspad lipidnih peroksidaza. Glutation peroksidaze pokazuju visok stupanj aktivnosti sa vodikovim peroksidom i organskim hidroperoksidima (Sharma i sur., 2004.).

Glutation reduktaza (GR) katalizira redukciju oksidiranog glutationa u reducirani glutation (GSH). Ovaj enzim omogućava stanici održavanje adekvatne razine staničnog GSH. GR štiti organizam od kemijskog i oksidativnog stresa. Deficijenciju GR karakterizira hemoliza radi povećane osjetljivosti eritrocitne membrane na  $H_2O_2$  (Ulus i Tandogan, 2007.).

#### **2.11.7.1. Neenzimatski antioksidansi**

Tiol vezan za proteine i neproteinski tiol djeluju kao stanična redukcijske sredstva i zaštita od anorganskih zagađivača preko  $-SH$  skupine (Sánchez-Rodríguez i Mendoza-Núñez, 2019.). Tiol je često prva linija obrane od oksidativnog stresa. Razina tiola se može povećati preko adaptivnih mehanizama na blagi oksidativni stres preko povećanja sinteze, značajniji oksidativni stres može smanjiti razinu tiola radi gubitka adaptivnog mehanizma.

Glutation je stanični antioksidant koji igra centralnu ulogu u održavanju staničnog redoks statusa.

Askorbinska kiselina je antioksidans nađen u biljkama i životinjama i dobiva se iz prehrane jer se ne može endogeno sintetizirati. Može reducirati i neutralizirati ROS (Linster, Van Schaftingen, 2007.). Vitamin E štiti staničnu membranu od oksidacije odstranjenjem slobodnih radikala i reakcijom sa lipidnim radikalima (Linster i sur., 2007.). Beta karoten je moćan antioksidans, odstranjuje singlet kisik i štiti od slobodnih radikala.

#### **2.11.7.2. Prirodni antioksidansi**

Flavonoidi imaju važnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa, osobito u slučaju malignoma. Flavonoidi su široko dostupni u povrću, crvenom vinu, voću, kakau i čaju. Prirodni antioksidansi jačaju endogene antioksidativne obrambene mehanizme od ROS-a. Antioksidativni učinci fenola vezani su uz razne mehanizme, poput uklanjanja slobodnih radikala, donacije iona vodika, keliranja metalnih iona i djelovanja kao substrat za radikale poput superoksida i hidroksila (Oršolić i Jazvinščak Jembrek., 2022.).

#### **2.11.8. Protutumorska terapija i ROS**

Koncentracija ROS-a u tumorskim stanicama vrlo je važna u protutumorskoj terapiji. Visoke razine ROS-a induciraju citotoksičnost zajedno sa dokidanjem rezistencije na kemoterapeutike u tumorskim stanicama. Mehanizam povišenih razina ROS u smislu terapije malignoma temelji se na dvije postavke: povećanje stvaranja ROS-a preko vanjskih čimbenika ili inhibitorima antioksidativnog mehanizma.

##### *1. Inhibicija antioksidativnog mehanizma*

Poremećaj ili inhibicija staničnih antioksidativnih mehanizama povećava produkciju ROS-a koja potiče apoptozu malignih stanica. SOD, GSH i Tioredoxin 1 (Trx) glavni su ciljevi antitumorskih spojeva koji pojačavaju ROS. U normalnoj stanici, ROS razine su niske i samim tim su manje ovisne o antioksidativnim enzimima. Povišene stanične razine antioksidansa javljaju se prilikom razvoja kemorezistencije malignih stanica. U smislu izbjegavanja rezistentnosti na kemoterapeutike razvijeni su lijekovi koji specifično ciljaju unutarstanične razine GSH. Na primjer, primjena PEITC (fenetilzotiocijanat) u kombinaciji sa GSH ublažuje razinu GSH i potiče oksidativni stres što dovodi do citotoksičnosti u malignim stanicama. Također, SOD1 može biti specifično ciljan u cilju induciranja apoptoze u različitim tipovima tumora. U *in vitro*

istraživanjima plućnog adenokarcinoma inhibicija SOD1 smanjila je rast *KRAS* mutantnih tumorskih stanica (Glasauer, 2014.).

## 2. Stvaranje ROS-a u tumorskim stanicama

Brojni pristupi razvijeni su da bi se unijelo ROS i tvari koje stvaraju ROS *in vitro* u stanične kulture koji bi podigli razinu ROS-a i uzrokovali stanično oštećenje (Zorov i sur., 2014.). Neki od takvih lijekova odobreni su kao protutumorski lijekovi. Neki od njih poput antifolata, alkaloida i taksana poremećuju mitohondrijski prijenosni lanac što rezultira visokim O<sub>2</sub> razinama i indukcijom citotoksičnosti posredovane mitohondrijima (Yang i sur., 2016.). Drugi kemoterapeutici poput doksorubicina i cisplatine također vode prema povećanom ROS stvaranju do razina koje su citotoksične za tumorske stanice.

U normalnim stanicama redoks homeostaza je održana između ROS stvaranja i eliminacije putem antioksidansa posredstvom enzima (glutation peroksidaza, superoksid dismutaza i katalaza) i transkripcijskog čimbenika Nrf2 (Kumari i sur., 2018.). Pretjerano ROS stvaranje vodi prema zakazivanju antioksidativnih obrambenih mehanizama, nedostatnih da otklanjaju viškove ROS-a što vodi prema neravnoteži antioksidansa i prooksidansa. Novija literatura daje naglasak na dihotomnu prirodu ROS-a u malignim stanicama, ovisno o stadiju tumorske progresije. Kod tumorske stanice, povišeno stvaranje ROS-a pokreće adaptacijske reakcije koji naknadno održavaju redoks balans. Kod prekanceroza/ranih stadija tumorske progresije, blage razine ROS-a induciraju tumorigenezu, pojavnost tumora, metastaziranje i preživljenje (Kumari i sur., 2018.). Sa tumorskom progresijom visoke razine ROS-a iznad toksičnog pragavode prema staničnoj smrti, apoptozi (Assi, 2017.) i starenju (Raza i sur., 2017.). Uključivanjem dijetalnih antioksidansa, npr. fitokemikalija, razina staničnih antioksidansa može se regulirati, odnosno istim se može regulirati inhibicija rasta i stanična smrt u malignim stanicama. U MDA-MB-435, SKBR-3 i MDA-MB-231 stanicama resveratrol je smanjio akumulaciju ROS-a što je smanjilo staničnu smrt induciranu paklitakselom (Alexandre i sur., 2006.). Fitokemikalije poput vitamina C, resveratrola, apigenina, luteolina i epigalokatehin-3-galata imaju prooksidativna svojstva koja vode povišenju ROS-a i staničnoj smrti. U MCF-7 stanicama karcinoma dojke tumorske stanice i HT29 stanice karcinoma kolona oksidativni stres uzrokovan C vitaminom može voditi NAD depleciji i inhibiciji energetskeg metabolizma što uzrokuje apoptozu (Uetaki i sur., 2015.). Resveratrol ima prooksidativno djelovanje što rezultira pojačanim stvaranjem hidroksil radikala u

prisustvu iona bakra (Ahmad i sur., 2005.). Fitokemikalije se sve više istražuju u svrhu razvoja lijekova koji ciljaju ROS uništavanje tumorskih stanica.

## 2.12. TERAPIJA TUMORA

### 2.12.1. Kemoterapija

Izraz kemoterapija sročio je početkom 20. stoljeća njemački kemičar Paul Ehrlich. On je započeo sa proučavanjem animalnih modela u istraživanju djelotvornosti raznih kemikalija prema bolestima.

Cilj kemoterapije je zaustaviti staničnu proliferaciju i umnažanje tumorskih stanica te posljedičnu invaziju i metastaziranje. Isto ima toksične učinke i na zdrave stanice. Inhibicija tumorskog rasta događa se na više razina unutar stanice i njenog okoliša.

Tradicionalni kemoterapeutici utječu na sintezu makromolekula i funkciju neoplastičnih stanica pomoću interferencije sa DNA, RNA ili sinteze proteina ili utječući na ispravno funkcioniranje prethodno stvorene molekule. Kada je interferencija makromolekularne sinteze ili funkcije zadovoljavajuća, djelovanje vodi prema staničnoj smrti direktnim djelovanjem ili induciranjem apoptoze. Sa tradicionalnim spojevima, stanična smrt može biti odgođena, budući da samo dio stanica odumire na isporučenu terapiju, tako da se terapija često mora davati u ciklusima da bi se postigao odgovor. Toksičnost citotoksičnih lijekova najznačajnija je tijekom S faze staničnog ciklusa. Vinca alkaloidi i Taksani djeluju u M fazi blokirajući stvaranje mitotskog vretena.

Kemoterapija se može primjenjivati neoadjuvantno, adjuvantno ili kombinirano. Neoadjuvantna terapija daje se prije primarnog načina liječenja. Adjuvantna terapija daje se kao dodatak na inicijalnu terapiju tumora u svrhu supresije rasta ili eliminacije okultnih tumorskih stanica. Adjuvantna terapija je standard za karcinome pluća, dojke, kolorektuma i jajnika. Kombinirane metode poput kemoterapije i zračenja koriste se za smanjivanje tumora prije kirurgije tumora glave i vrata, pluća, rektuma.

Kombinacija kemoterapijskih spojeva dostavlja se ciklički, što se bazira na 3 principa:

Hipoteza frakcioniranog ubijanja – definirana koncentracija kemoterapeutika, primjenjena kroz definiran vremenski period, uništiti će konstantnu frakciju stanične populacije, nezavisno o apsolutnom broju stanica. Neoplastičke tumorske stanice imaju linearan odgovor između primjenjene doze i učinkovitosti.

Goldie-Coldman hipoteza – tumorske stanice razvijaju spontane mutacije koje uzrokuju rezistentnost na lijek (Dembic, 2020.).

Kombinantna terapija ili terapija usmjerena na više ciljeva superiornija je od terapije usmjerene samo jednom cilju kod većine tumora. Kemoterapeutici terapije izabiru se na način da imaju različit mehanizam djelovanja i nepreklapajuća toksična svojstva čime se smanjuje rezistentnost i toksičnost. Kombinantne terapije sprečavaju stvaranje rezistentnih klonova potičući citotoksičnost u mirujućim i stanicama koje se dijele.

Kemoterapeutici se dijele prema mehanizmu djelovanja.

#### **2.12.1.1. Alkilirajuća sredstva**

Način djelovanja: daju nestabilnu alkilnu grupu  $R-CH_2^+$  koja reagira sa nukleofilnim centrima na proteinima i nukleinskim kiselinama. Inhibiraju replikaciju DNA i transkripciju.

Toksičnost: limitirana dozom, mijelosupresija, mukozitis, mučnina i povraćanje, neurotoksičnost, alopecija. Dugotrajna toksičnost: plućna fibroza, sterilnost, sekundarni maligniteti.

Primjeri alkilirajućih sredstava: dušični iperiti-bemdamustin, ciklofosfamid, ifosfamid. Nitrozuree, Analози platine–karboplatina, cisplatina, oksaliplatina. Triazeni–Dakarbazin, Prokarbazin, Temozolamid. Alkil sulfonati – Busulfan. Etilenamini – Tiotepa.

#### **2.12.1.2. Antimetaboliti**

*A. Analози citidina*–azacitidin, decitabin, citarabin, gemcitabin.

Način djelovanja: direktno se ugrađuju u DNA i inhibiraju DNA metiltransferaze (azacitidin, decitabin) ili DNA polimeraze (citarabin, gemcitabin).

Toksičnost: mijelosupresija. Citarabin u visokim dozama uzrokuje neurotoksičnost, konjuktivitis. Gemcitabin povećava jetrene enzime, intersticijska pneumonija.

*B. Antagonisti folata*–metotreksat, pemetreksed.

Način djelovanja–reduciraju folat, esencijalan u sintezi purinskih nukleotida i timidilata.

Toksičnost: mijelosupresija, mukozitis, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, kožne reakcije.

*C. Analози purina*—kladribin, klofarabin, nelarabin.

Način djelovanja: strukturalni analog guanina, djeluje kao lažni metabolit.

Toksičnost: mijelosupresija, imunosupresija (suprimira CD4<sup>+</sup> stanice), rizik oportunističkih infekcija.

*D. Analози pirimidina*—floruracil (5-FU), kapecitabin.

Način djelovanja: aktivni metabolit (F-dUMP) formira stabilni kovalentni kompleks sa timidin sintazom u prisustvu reduciranog folata i time interferira sa DNA sintezom i popravkom.

Toksičnost: palmarno-plantarna eritrodisestezija, mukozitis, proljev, mijelosupresija

### **2.12.1.3. Antimikrotubularni spojevi**

*A. Inhibitori topoizomeraze II:* Antraciklini (doksorubicin, danorubicin, idarubicin, mitoksantron)

– Način djelovanja: interkalacija lijeka u nekleinsku kiselinu i inhibicija aktivnosti topoizomeraze što rezultira zaustavljanjem replikacije DNA i transkripcijskih mehanizama stanice.

Toksičnost: mijelosupresija, kardiotoksičnost, mukozitis.

*B. Inhibitori topoizomeraze I:* irinotekan, topotekan

Način djelovanja: blokiraju otpuštanje Top I iz cijepajućeg kompleksa i stvaranje ternarnog kompleksa.

Toksičnost: proljev, neutropenija, trombocitopenija.

*C. Taksani*

Način djelovanja: poremećaj ekvilibrija polimerizacije i depolimerizacije mikrotubula što uzrokuje abnormalne stanične funkcije i poremećaj replikacije što dovodi do apoptoze. Inhibicija sastavljanja mikrotubula – specifično za M fazu.

Toksičnost: mijelosupresija, periferna neuropatija, hipersenzitivne reakcije.

*D. Vinka alkaloidi:* vinblastin, vinkristin, vinorelbin.

Način djelovanja: vežu se na tubulin i inhibiraju stvaranje mikrotubula.



#### **2.12.1.4. Antibiotici**

Antibiotici koji se koriste kao kemoterapeutici: aktinomycin D, bleomicin, daunomicin.

Način djelovanja: inhibicija RNA i DNA sinteze.

Toksičnost: hiperpigmentacije, pulmonarna toksičnost.

#### **2.12.1.5. Razno**

Hidroksiurea – inhibicija ribonukleozid difosfat reduktaze.

Tretionin – derivati vitamina A, cilja RAR- $\alpha$  promovirajuću staničnu diferencijaciju.

Arsenov trioksid – inducira diferencijaciju stanice.

Inhibitori proteasoma

Kemoterapeutici se mogu aplicirati peroralno, intravenozno, potkožno, intramuskularno, intratekalno. Većina kemoterapeutika se primjenjuje intravenozno radi 100%tne absorpcije.

Većina kemoterapeutika metabolizira se i izlučuje preko jetre ili bubrega. Neki su toksični za jetru i/ili bubrege, stoga je bitno primijeniti odgovarajuću dozu po organizam. Uglavnom se primjenjuju u odnosu na površinu tijela.

Kemoterapeutici su često udruženi sa nuspojavama. Većina djeluje na stanice koje se ubrzano dijele, tako da uz tumorske pogađaju i stanice koštane srži, probavni sustav, dlačnih folikula, što se manifestira kao mijelosupresija, mučnina, povraćanje, proljev, mukozitis, alopecija, sterilitet. Također postoji rizik infekcije radi imunosupresije.

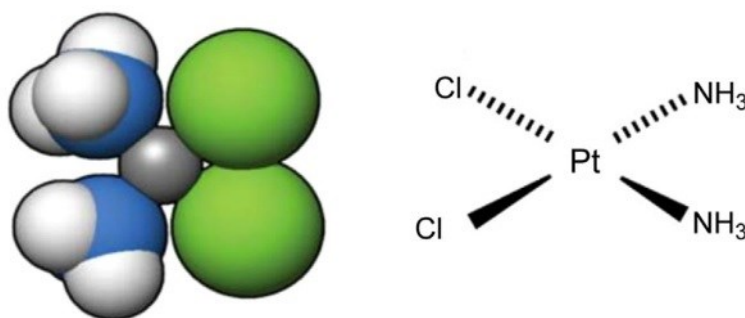
### **2. 12.2. Cisplatina**

Cisplatina (CDDP), kemoterapeutik na bazi platine, jedan je od najčešće korištenih kemoterapijskih lijekova u liječenju pacijenata s različitim vrstama tumora, kao što su tumor mokraćnog mjehura, testisa, jajnika, vrata maternice, glave i vrata, pluća, jednjaka, i dojke (Dasari i Tchounwou, 2014.).

Cisplatina i njezini analozi, karboplatina i oksaliplatina, imaju značajnu učinkovitost u liječenju karcinoma s kurativnom i palijativnom namjerom (Muggia i sur., 2015). Uz monoterapiju, antikancerogeno djelovanje cisplatine također je dokazano kada se koristi u kombinaciji s drugim

sredstvima u kemoterapiji, radioterapiji i imunoterapiji. Procijenjuje se da će približno 50% svih pacijenata oboljelih od raka biti liječeno cisplatinom u svojim antikancerogenim terapijama (Ghosh, 2019).

Molekularna struktura CDDP-a sadrži osnovni kompleks platine, dva amida i dva kloridna liganda u cis elementnoj orijentaciji (Slika 21). Ovaj prvi kemoterapijski lijek na bazi metala otkrio je talijanski kemičar Michele Peyrone 1845. godine, a njegovu sposobnost inhibiranja diobe stanica prepoznao je američki biofizičar Rosenberg 1965. godine.



**Slika 21.** Struktura cisplatine. Preuzeto i prilagođeno prema Dasari i Tchounwou, 2014.

Cisplatina se aktivira ulaskom u stanicu. U citoplazmi kloridni atomi na cisplatini zamjenjuju se molekulama vode. Hidrolizirani proizvod je snažan elektrofil koji može reagirati sa bilo kojim nukleofilom uključujući sulfhidrilnu skupinuna proteinima i atomima donorima dušika na nukleinskim kiselinama. Cisplatina se veže na N7 reaktivni centar na purinskim ostacima i kao takva može uzrokovati oštećenje DNA u tumorskim stanicama, blokirati staničnu diobu što rezultira apoptozom. 1,2- unutarlančane poprječne veze purinskih baza s cisplatinom najizrazitije su među promjenama u DNA (Dasari i Tchounwou, 2014.).

Oksidativni stres je drugi mehanizam citotoksičnosti cisplatine. Cisplatina potiče ROS koji vodi prema staničnoj smrti. Stanična smrt događa se odmah nakon aktivacije brojnih signalnih puteva, a definitivni put ovisi o tumorskoj stanici. Stvaranje ROS ovisi o koncentraciji cisplatine i vremenu izloženosti (Brozović i sur., 2010.).

### **2.12.3. Mehanizmi rezistentnosti na cisplatinu**

Cisplatina ima nisku razinu učinkovitosti protiv nekih tipova tumora poput gušterače, kolorektuma i prostate (Amable, 2016.). Postoje dva oblika otpornosti: unutarnja otpornost i stečena otpornost. Unutarnja rezistencija je rezistencija koja se javlja od početka liječenja, dok je kod stečene rezistencije djelovanje lijeka u početku primjene aktivno, ali s vremenom postaje ne učinkovito (Florea i Büsselberg, 2011.).

Postoje više mehanizama uključenih u rezistentnost cisplatine. Prvi je smanjenje unutarstaničnog nakupljanja lijeka (Fang i sur., 2017.). Smanjeno nakupljanje lijeka je značajan mehanizam koji rezultira rezistentnosti. Međutim, smanjenje nakupljanja lijeka nije direktno proporcionalno razini rezistentnosti (Sarin i sur., 2018.).

Drugi mehanizam je pojačani popravak oštećene DNA (Sarin i sur., 2018.). NER (engl. *Nucleotide Excision Repair*) je glavni put odstranjenja adukata platine kao i popravka DNA. Važnost NER-a potvrđena je istraživanjima koja pokazuju da stanični defekt NER-a uzrokuje hipersenzitivnost na cisplatinu, a kada se aktivnost NER-a ponovno uspostavi, osjetljivost se vraća na normalnu razinu (Nikounezhad i sur., 2017.).

Treći mehanizam rezistentnosti je citosolna inaktivacija cisplatine. Inaktivacija cisplatine utječe na njenu učinkovitost budući onemogućava mogućnost regairanja sa DNA. Učinak je smanjena proizvodnja DNA adukata i time manje oštećenja DNA što dovodi do povećanog preživljenja tumorske stanice. Glavni oblik cisplatinске inaktivacije je konjugacija cisplatine sa glutationom što dovodi do staničnog izvoza pomoću MRP prijenosnika (Dmitriev, 2011.).

Uz navedeno, cisplatina kao genotoksični spoj aktivira u tumorskim stanicama brojne molekularne mehanizme, uključujući gene za "heat shock" proteine koji pomažu stanicama da prežive stresne i nepovoljne uvjete.

### **2.12.4. Toksičnost cisplatine**

Liječenje cisplatinom povezano je sa raznim nuspojavama uključujući mučninu i povraćanje, nefrotoksičnost, kardiotoksičnost, hepatotoksičnost i neurotoksičnost (Tsang i sur., 2009).

Mučnina i povraćanje najčešće su nuspojave cisplatine. Cisplatina oštećuje stanice gastrointestinalnog (GI) sustava i uzrokuje o kalciju ovisnu egzocitozu 5-hidroksitriptamina (HT)<sub>3</sub>

iz enterokromafinih stanica u GI mukozi. Otpušten 5-HT<sub>3</sub> veže se na receptore na vagalnim aferentnim neuronima i aktivira centar za povraćanje. Nefrotoksičnost je druga nuspojava. Bubrezi su glavni organ ekskrecije cisplatine. Bubrež ima sklonost akumuliranja cisplatine veću od ostalih organa (Sarin i sur., 2018.). Akumulacija i koncentracija cisplatine u epitelnim stanicama proksimalnog tubula otprilike je pet puta veća od serumske. Mehanizam nefrotoksičnosti sličan je kao i tumorska citotoksičnost. Visoke doze cisplatine mogu rezultirati i hepatotoksičnosti. Ona se objašnjava kao posljedica oksidativnog stresa koji nastaje redukcijom glutationa. Očituje se povišenim razinama transaminaza i ekspresije citokroma P450-2E1. Neurotoksičnost se najčešće očituje senzornom neuropatijom. Kardiotoxičnost je najrjeđa nuspojava, najvjerojatnije se javlja kao posljedica cisplatinom inducirane lipidne peroksidacije (Bahadir i sur., 2018.).

## 2.13. HIPERTERMIJA

Hipertermija se definira kao stanje povišene temperature. Može imati patološku etiologiju, kao što su to bakterijemije ili viremije ili se može pojaviti kao posljedica toplinskog udara na organizam. U kliničke svrhe koristi se kao postupak kada se organizam izloži djelovanju temperature najčešće u rasponu od 39°C do 45°C. U tom rasponu temperature mogu oštetiti ili ubiti tumorske stanice uz minimalnu štetu normalnim tkivima. Zadnjih dvadesetak godina hipertermija se uspješno koristi kao komplementarna terapija uz standardne kemo i radio terapije. Korištenje visokih temperatura >60 °C rutinski se koristi u termoablacijskim tehnikama uništavanja tumorske mase.

### 2.13.1. Stanične promjene

Hipertermija uzrokuje mnoge promjene stanica i vodi gubitku stanične homeostaze (Lindquist, 1986., Hildebrandt i sur., 2002.). Ključni korak je denaturacija proteina i agregacija što rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa i obustavom sinteze proteina i inhibicijom popravka DNA (Lepock, 2005.). Drugi učinci hipertermije na stanicu uključuju inhibiciju sinteze DNA, transkripcije, obrade RNA i translacije (Crile, 1963.), povećanu razgradnju smotanih, odnosno krivo smotanih proteina preko proteosoma i lizosoma, promjene staničnog citoskeletona, metaboličke promjene koje vode do smanjenih razina ATP-a, promjene u membranskoj propusnosti koji dovode da povećane unutarstanične koncentracije  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ .

Proteini su prva meta hipertermije u klinički relevantnim temperaturama od 30 do 45°C. Izlaganje hipertermiji se smatra odgovornim za čitav niz posttranslacijskih procesa poput glikozilacije, acetilacije, ubikvinizacije (Hildebrandt, 2002.) U više istraživanja pokazano je da hipertermija uzrokuje fragmentaciju DNA i stvaranje lomova u dvostrukoj zavojnici što je vjerovatno posljedica inhibicije popravka DNA. Međutim, izgleda da je oštećenje nuklearnih proteina ključan čimbenik prije nego direktno oštećenje DNA. Nuklearni proteini su vrlo osjetljivi na hipertermiju i skloni su agregaciji (Hildebrandt, 2002.). Agregacija nuklearnih proteina povezana je sa inhibicijom transkripcije i DNA replikacije.

Povišena temperatura može povećati broj biokemijskih reakcija što dovodi do ubrzanja staničnog metabolizma i posredno oksidativnog stresa. Razine ROS-a povisuju se izlaganjem letalnim

(>42°C) i ne-lethalnim (40°C) temperaturama (Slimen i sur., 2014.). Razlog tome je pojačano stvaranje ROS-a poput superoksida i vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) kao posljedica disfunkcije mitohondrijskog respiratornog lanca. Drugi potencijalni izvor ROS-a može biti pojačana aktivnost enzima koji produciraju superoksidge na povišenoj temperaturi poput NADPH oksidaze i ksantin oksidaze. Hipertermija može također povećati reaktivnost ROS-a, dokazano je da je citotoksičnost vodikovog peroksida veća na povišenim temperaturama (41 do 43°C) u odnosu na fiziološku temperaturu (Lord-Fontaine i Averill, 1999.). Hipertermija također oslabljuje stanične antioksidativne obrambene mehanizme protiv vodikovog peroksida poput pentoza-fosfatnog puta (Lord-Fontaine i Averill, 2002.) koji održava unutarstanični glutation u reduciranom obliku, GSH. Povećanje stvaranja ROS-a može uzrokovati oksidativnu ozljedu proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Hipertermijom izazvano smanjenje rasta tumora udruženo je sa povećanom lipidnom peroksidacijom kod kunića (Slimen i sur., 2014.). Povećano stvaranje ROS-a pri hipertermiji također može izazvati poremećaj u mitohondrijskom membranskom potencijalu (Pallepati i Averill-Bates, 2010.). Temperaturom izazvano ubrzanje staničnog metabolizma također može izazvati acidozu tumorskog tkiva (Hildebrandt, 2002.).

### ***2.13.2. Citotoksičnost hipertermije***

Kao posljedica raznih staničnih promjena, hipertermija uzrokuje mitotsku katastrofu, trajni zastoj u G1 fazi i gubitak reproduktivnih svojstava stanice. Stanice umiru procesima poput apoptoze i/ili nekroze, ovisno o tipu stanice, temperaturi i dužini ekspozicije na temperaturi (Bettaieb i Averill-Bates, 2008.). Druga posljedica je da stanice mogu postati senzibilizirane drugim citotoksičnim spojevima poput zračenja. Ustanovljeno je da hipertermija uzrokuje centrosomalnu disfunkciju i mitotsku katastrofu (Nakahata i sur., 2002.) što ima učinke u termalnoj radio senzibilizaciji. Hipertermija uzrokuje kondenzaciju kromatina i apoptotsku DNA fragmentaciju što vodi apoptozi u više tipova stanica uključujući stanice HeLa, limfocite T, stanice leukemije HL-60, i mišje embrionske fibroblaste. U miševa izloženim hipertermiji cijelog tijela (41,5°C kroz 2h) razmjeri i kinetika hipertermijom inducirane apoptoze razlikovali su se između tipova tumora (fibrosarkom i karcinom kolona) (Sakaguchi i sur., 1995.). Isto istraživanje pokazalo je dodatnu prednost; inducirana apoptoza bila je veća kod tumorskih u usporedbi sa normalnim stanicama. Većina radova koji su istraživali mehanizam citotoksičnosti izazvane toplinskim šokom postigla je zaključak da je apoptoza glavni način stanične smrti i zagovara proapoptotske učinke hipertermije kao potencijalno korisne u terapiji karcinoma.

### **2.13.3. Hipertermija i fiziološke promjene**

Oksigenacija, pH i cirkulacija krvi čimbenici su koji utječu na osjetljivost stanica, odnosno tkiva na hipertermiju. Više istraživanja pokazuje da su tumorske stanice osjetljivije na termalne ozljede od normalnih stanica (Ahmed i sur., 2020.). Isto se može objasniti različitom ekspresijom proteina toplinskog stresa (HSP, *engl. Heat Shock Proteins*) koji su uključeni u stanične obrambene mehanizme protiv različitih stresora, između ostalih toplinskog šoka. Osjetljivost stanice na toplinu također varira ovisno o fazi staničnog ciklusa, gdje je pokazano da su stanice u S fazi i mitozu najosjetljivije (Yuguchi i sur., 2002.).

Drugi razlog primjene hipertermije u terapiji karcinoma leži u činjenici da tumori imaju potpuno drukčiju mrežu krvožilja od normalnih tkiva. Isto vodi neravnomjernom zagrijavanju, odnosno u tumorskim tkivima postižu se veće temperature nego u normalnim tkivima gdje se dio topline odvodi cirkulirajućom krvi. Hipertermija je također komplementarna drugim načinima liječenja načinom da može uništiti tumorske stanice koje su rezistentne na kemoterapiju i radioterapiju. Stanice tumora koje su smještene u hipoksičnim središtima tumora su relativno rezistentne na kemoterapiju poradi slabe dostave lijeka. Neki kemoterapeutici zahtjevaju kisik da bi stvorili slobodne radikale i time djelovali citotoksično. Nadalje, većina kemoterapeutika je učinkovitije prema proliferirajućim stanicama. Hipoksija uzrokuje smanjenu proliferaciju što dijelom može objasniti tumorsku rezistenciju na kemoterapiju (Cosse i Michiels, 2008.). Stanice smještene u hipoksičnim dijelovima tumora rezistentne su i na radijacijsku terapiju.

Zagrijavanje tumora kod čovjeka je raznoliko. Neki dijelovi tumora dostižu citotoksične temperature od 43 do 45°C dok se drugi dijelovi zagrijavaju samo do 39 ili do 42°C. Dublje smještene i volumenom veće tumore teže je zagrijavati na citotoksične temperature.

Tumori ne mogu prilagoditi svoj krvni optok učincima visoke temperature ( $\geq 42^{\circ}\text{C}$ ) čime se hipertermijom omogućuje obustava nutrijenata i kisika što dovodi do nižeg intersticijskog pH i urušaja tumorske vaskularizacije (Song, 2005.). Takvi uvjeti čine stanicu osjetljivijom na toplinsku terapiju. Stanice na nižim, kiselijim pH i nižim tlakovima kisika poput onih u središtima tumora osjetljivije su na toplinsku terapiju (Song, 2005.). Stanice koje su deficitarne nutrijentima, također su osjetljivije na povišene temperature. Ovaj učinak je u svezi sa staničnim razinama ATP-a. Stanice sa smanjenom dostavom glukoze pokazuju povećanu osjetljivost citotoksičnosti hipertermije. Ovaj učinak može se povezati smanjenjem antioksidativne obrane

koja uključuje glutation redoks ciklus budući je metabolizam glukoze potreban preko pentoza fosfatnog puta za održavanje unutarstaničnih razina GSH. S druge strane zagrijavanje na blažim temperaturama (39 do 42°C) može pospješiti cirkulaciju krvi u tumoru što vodi ka boljoj oksigenaciji tumora (Song, 2005.) što može učiniti tumore osjetljivijima na zračenje i pojedine kemoterapeutike.

Temperature u spektru od 40 do 41°C potiču razne dijelove imunskog sustava. Izlaganje imunskih efektornih stanica (makrofaga, T stanica i NK stanica) navedenim temperaturama potiče: 1. migraciju imunskih stanica na ciljno mjesto što vodi boljoj kontroli infekcije; 2. potiče ekspresiju staničnih površinskih molekula uključenih u predočavanje antigena; 3. potiče oslobađanje topivih čimbenika uključenih u aktivnost imunskih efektorskih stanica (citokini, TNF –  $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12; 4. regulira proliferaciju imunskih stanica; 5. povećava citotoksičnost imunskih stanica prema ciljnim (tumorskim) stanicama

#### ***2.13.4. Termotolerancija i HSP***

Izlaganje stanica letalnim temperaturama 43 do 45°C kroz kratki vremenski period od 10 do 30 min omogućava razvoj tolerancije prema slijedećim izlaganjima multiplim stresorima – pojava koja se zove termotolerancija (Li i Howell, 2021.). Termotolerancija je adaptivno sredstvo preživljenja stanice inducirano prekondicioniranjem toplinom pri čemu stanice postaju otporne prema slijedećim potencijalno letalnim izlaganjima poput termalnog šoka, reaktivnim kisikovim spojevima i okolišnim stresorima poput teških metala. Ako je razina stresa niska, stanice pokušavaju preživjeti aktivacijom odgovora na stres koji štite osnovne biokemijske procese poput popravka DNA, slaganja proteina i odstranjenja oštećenih proteina (Pizzinga i sur., 2020.). Kada se djelovanje stresora ukine, stanice mogu obnoviti normalnu staničnu funkciju. Ako se stres nastavi ili bude prejak stanice će najvjerojatnije umrijeti apoptozom ili nekrozom. Razvoj termotolerancije karakteriziran je brojnim biokemijskim i molekularnim promjenama. Termotolerancija je udružena akumulacijom proteina toplinskoga stresa (Malik i Lone, 2021.).

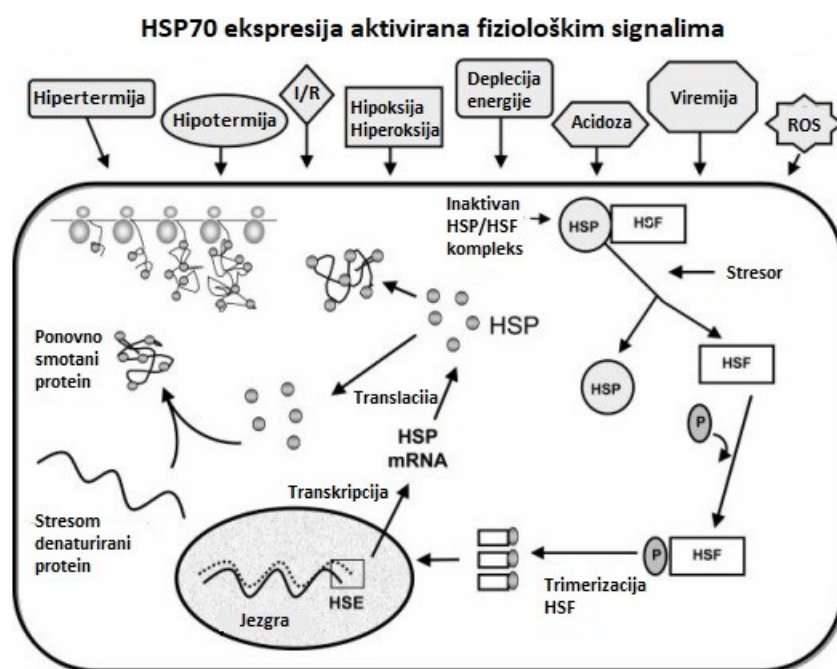
#### ***2.13.5. Proteini toplinskog stresa***

Aktivnost proteina ovisi o njihovoj trodimenzionalnoj strukturi. Unutarmolekularne veze, posebno vodikove veze održavaju navedenu strukturu. Vodikove veze se mogu raskinuti u uvjetima djelovanja vanjskih stresora što dovodi do denaturacije proteina. Proteini toplinskog stresa skupina su proteina koji se nalaze u prokariotskim i eukariotskim stanicama. Uključeni su u



širok spektar staničnih procesa poput pomaganja prilikom smatanja proteina i degradacije krivo smotanih proteina, moduliranja signalnih puteva i reguliranja imunosnog odgovora (Slika 22). Igraju ključnu ulogu u regulaciji stanične homeostaze i staničnog preživljenja. Glavni HSP nalaze se u spektru mase od 15 do 110kDa i podjeljeni su u skupine zavisno o veličini i funkciji. Nalaze se u citosolu, mitohondrijima, endoplazmatskom retikulumu ili staničnoj jezgri. Najistraženije skupine u sisavaca su onih molekularne mase 60, 70, 90 i 110 kDa. Isti su izraženi pri eutermičnim temperaturama i u uvjetima stresa (npr. toplinski stres) i imaju zasebne funkcije i stanične lokalizacije. Ekspresija HSP regulirana je transkripcijskim čimbenikom kojeg potiče stres zvanim HSF-1 (engl. *Heat Shock Factor 1*) preko interakcije istoga sa HSE (engl. *Heat Shock Elements*).

Odgovor na toplinski stres prisutan je u svim organizmima od kvasaca do ljudi (Akerfelt i sur., 2010.). Osim toplinom, odgovor na toplinski stres može biti induciran drugim stresorima poput oksidativnog stresa, infracrvenim zračenjem, teškim metalima, etanolom, toksinima, viremijom i bakterijskom infekcijom (Slika 22).



**Slika 22.** Aktivacija HSP70. Preuzeto i prilagođeno prema Kregel, 2002.

Glavne grupe HSP-a induciranih odgovorom na toplinski stres su HSP90, HSP70, HSP60 i HSP27. HSP igra važnu ulogu u termotoleranciji. Mnoga istraživanja ukazuju na korelaciju između nakupljanja HSP70 i razvoja termotolerantnog stanja u sisavaca, vodozemaca, insekata i riba. U uvjetima stresa HSP70 mogu spriječiti razvoj proteinskih nakupina (agregata) i pomoći u ponovnom slaganju agregiranih proteina u njihovu originalnu strukturu (Richter i sur., 2010.). Druga istraživanja su pokazala da stanje termotolerancije korelira sa pojačanom ekspresijom HSP 110 (Easton i sur., 2000.). HSP110 podjednako je učinkovit kao HSP70 u preveniranju agregacije proteina i sudjeluje zajedno sa HSP70 i HSP40 u ponovnom slaganju denaturiranih proteina. HSP su također zaštitnici stanice od drugih oblika stresa, poput oksidativnog stresa i zračenja (Sreedhar i Csermely, 2004.).

HSP ima važnu ulogu u regulaciji apoptoze. Razjašnjene su pojedine uloge različitih HSP-a poput HSP27, HSP60, HSP70 i HSP90 u regulaciji mitohondrijske i apoptoze preko Fas receptora. Indukcija apoptoze preko Fas receptora može biti regulirana sa HSP70 i HSP27. HSP27 i HSP70 mogu regulirati put apoptoze preko Fas receptora prevenirajući t-Bid translokaciju u mitohondrij što inhibira oslobađanje citokroma c. HSP90 je negativni regulator aktivacije kaspaze-2. HSP27, HSP70 i HSP90 mogu oslabiti apoptozu uzvodno od mitohondrija (Steel i sur., 2004.) ali i interferirati sa formiranjem apoptosoma, postmitohondrijskim događajima i aktivacijom kaspaze. HSP70 i fosforiliran HSP27 mogu zaštititi stanice od oksidativnog stresa koji je snažan aktivator apoptoze (Slimen i sur., 2014.)

Termotolerancija se može razviti izlaganjem letalnim temperaturama (42 do 45°C) kroz kraće vremensko razdoblje (~ 30 min) ili kontinuiranim grijanjem (3 do 24h) na ne-letalnim temperaturama (39 do 41,5°C) (Yeh i sur., 2012.). Razvoj termotolerancije izlaganjem blagim temperaturama (40°C) u trajanju 3 do 24h doveo je do nakupljanja HSP27, 32, 60, 70, 90 i 110. Ova pojava je vrlo bitna jer pokazuje da termotolerancija u fiziološkom spektru hipertermije može zaštititi zdrava tkiva od stresora tijekom kliničke primjene hipertermije. Izlaganje Balb/c miševa *in vivo* pri fiziološkoj hipertermiji (39,5 do 40°C) kroz 6 sati dovelo je do povišene ekspresije HSP70 i HSP110 u više uzoraka tkiva miševa (Ostberg i sur., 2002.).

Blaga termotolerancija razvijena na 40°C stvara fenotip otporan na apoptozu. Aktivacija mitohondrijskog puta apoptoze umjerenom hipertermijom (42 do 43°C) bila je oslabljena u termotolerantnim stanicama. Aktivacija signalnog puta preko Fas receptora letalnim

temperaturama (42 do 43°C) bila je inhibirana u termotolerantnim stanicama. Termotolerancija razvijena na 40°C zaštitila je stanice od induciranja apoptoze oksidativnim stresom ( $H_2O_2$ ) posredovanih preko mitohondrijskih i puteva receptora smrti (Pallepati i Averill-Bates, 2010.). Na apoptozu rezistentan fenotip posljedica je povišenih razina HSP-ova (HSP27, 32, 60, 70, 90 i 110kDa) i antioksidansa (katalaze, superoksid dismutaze, glutation). Blaga termotolerancija također inhibira hipertermijom inducirano stvaranje ROS-a (Bettaieb i Averill-Bates, 2005.), što se objašnjava inhibitornim učinkom HSP-ova na stvaranje ROS-a.

HSP igraju dvojaku ulogu u rastu i razvoju tumora promovirajući staničnu proliferaciju i inhibirajući puteve stanične smrti. HSP70 je pretjerano izražen u raznim malignim tumorima i njegova ekspresija korelira sa pojačanom staničnom proliferacijom, lošom diferencijacijom i lošim terapijskim odgovorom kod karcinoma dojke (Barnes i sur., 2001.). Povišena ekspresija HSP70 u tumorima može spriječiti aktivaciju kaspaza i proteaza i zaustaviti apoptotsku smrt stanice. Štoviše, povišena ekspresija HSP-a uključena je u razvoj fenotipova otpornih na lijekove. Nekoliko istraživanja pokazalo je da HSP27 može biti uključen u stvaranje rezistencije na neke kemoterapeutike poput doksorubicina i cisplatine (Soleimani i sur., 2019.).

### **2.13.6. Hipertermija u terapiji karcinoma**

Temperature od 42,5°C i iznad mogu uništiti tumorske stanice. U *in vitro* istraživanjima ne postoje unutrašnje razlike između termalne osjetljivosti normalnih i tumorskih stanica (Issels, 2008.). Selektivnost prema tumorskim stanicama opaža se na višim temperaturama u *in vivo* istraživanjima. Kod solidnih tumora, krvožilje je neorganizirano što rezultira dijelovima tumora koji su hipoksični sa niskim pH u odnosu na normalna tkiva što čini tumorske stanice osjetljivijama citotoksičnim učincima hipertermije. Stoga, hipertermija može uzrokovati direktnu citotoksičnost tumorskih stanica sa ogradom selektivnog razaranja tumorskih stanica u područjima hipoksije i niskog pH unutar solidnog tumora. U kliničkoj praksi, hipertermija se pokazala najkorisnijom u kombinaciji sa radio i/ili kemoterapijom.

### **2.13.7. Hipertermija u kombinaciji sa kemoterapijom**

Kombinirana upotreba regionalne hipertermije sa sistemskom kemoterapijom ima velik potencijal u liječenju karcinoma budući lokalna raspodjela topline može poboljšati citotoksičnu aktivnost protutumorskih lijekova unutar zadane ciljne regije. Postoje snažni dokazi da komplementarni učinci hipertermije i antitumorskih lijekova mogu djelovati sinergistički. Tumorske stanice koje

su smještene u slabije prokrvljenim dijelovima tumora, poput centralnog dijela mogu biti relativno rezistentne na sistemsku kemoterapiju budući su izložene nižoj koncentraciji lijeka. Prednost hipertermije je to što ubija stanice učinkovitije u uvjetima hipoksije i nižega pH. Nadalje, temperature koje se postižu u slabo vaskulariziranim dijelovima tumora uobičajno su više budući izostaje učinak hlađenja cirkulirajućom krvi. Dodatna prednost je činjenica da regionalna hipertermija na 40-43°C uzrokuje porast cirkulacije (Song i sur., 2005.). Cirkulacija i krvožilna permeabilnost koji su ujedno povišeni u hipertermiji ključni su čimbenici za unos lijeka.

Laboratorijski i *in vivo* podaci pokazuju da kombinacija hipertermije i kemoterapije dovodi do povećane citotoksičnosti nekoliko protutumorskih lijekova poput cisplatine, ciklofosfamida, ifosfamida, mitomycina (Oršolić i sur., 2020.). Optimalna sinergija topline i lijeka obično se odvija na temperaturama između 40,5 i 43°C. Najučinkovitiji način primjene je dostava lijeka prije primjene hipertermije. Mehanizmi poboljšanja citotoksičnosti lijeka hipertermijom nisu do kraja razjašnjeni. Potencijalni mehanizmi leže u boljoj dostavi lijeka zahvaljujući boljoj perfuziji, povećanom unosu lijeka u stanicu i povećanoj reakciji lijeka sa staničnim ciljevima (alkilacija lijeka, pojačana šteta DNA).

### ***2.13.8. Utjecaj hipertemije na poništenje rezistentnosti na kemoterapeutike***

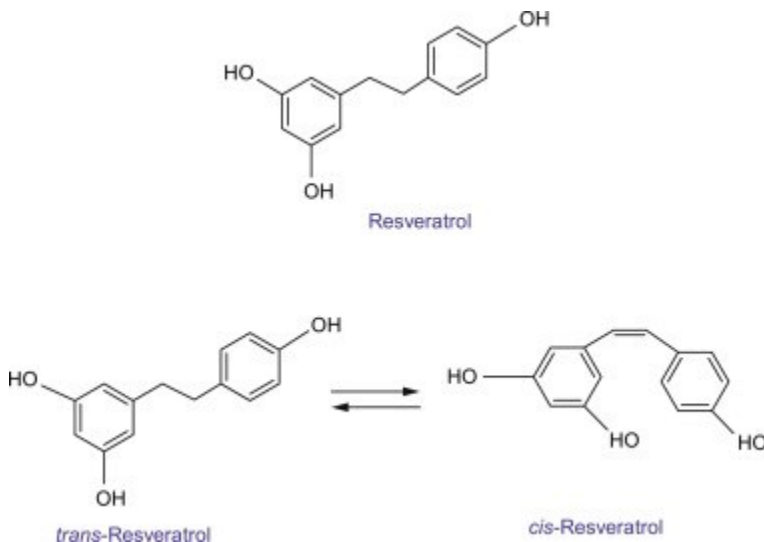
Jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika uspješne primjene kemoterapije u liječenju karcinoma razvoj je rezistentnosti na multiple lijekove protiv karcinoma (MDR, *engl. Multidrug Resistance*). Pojava se u početku vezala uz pretjeranu ekspresiju staničnog 170-kDa proteina - P-glikoprotein (Pgp) (Ling, 1997.). Pgp djeluje kao transmembranska pumpa ovisna o ATP-u. Kada lijek uđe u stanicu, Pgp ga istovremeno izbacuje iz stanice. Uz Pgp s vremenom je otkriveno još prijenosnih proteina koji su uključeni u razvoj rezistentnosti na lijekove. MRP1 (*engl. Multidrug Resistance Protein 1*), LRP (*engl. lung resistance protein*), BCRP (*engl. Breast Cancer Resistance Protein*).

Ključna uloga hipertermije je mogućnost poništenja rezistentnosti na pojedine kemoterapeutike. Hipertermija povećava citotoksičnost lijekova poput metotreksata, cisplatine i mitomicina u stanicama koje pokazuju znakove rezistentnosti na lijek (Oršolić i Jazvinšćak Jembrek, 2015.).

Važna prednost pri kliničkoj upotrebi hipertermije je da stanice koje pokazuju rezistentnost na više lijekova (MDR) i ekspresiju Pgp ili MRP1 ne pokazuju unakrsnu rezistenciju na toplinu (Souslova i Averill-Bates, 2004.). Hipertermija može uništiti subpopulacije stanica otpornih na lijekove koje su preživjele kemoterapiju zahvaljujući pretjeranoj ekspresiji Pgp i MRP1.

## 2.14. RESVERATROL

Resveratrol (3,5,4' trihidroksistilben) je fitoaleksin koji se nalazi u mnogim biljnim vrstama, uključujući jestive vrste, poput grožđa, kikirikija i bobičastog voća. Proizvode ga biljke kao odgovor na mehaničke ozljede, gljivične infekcije i UV zračenje (Langcake i Pryce, 1977). Prisutnost navedenih stresora potiče brzu aktivaciju enzima stilben sintaze koji olakšava biosintezu resveratrola djelujući na njegov prekursor – fenilalanin (Lopez-Hernandez i sur., 2007.). Najviša razina resveratrola u prirodi nalazi se u *Reynoutria japonica* (japanski dvornik), biljci koja se stoljećima koristi u tradicionalnoj azijskoj medicini za liječenje upala i drugih bolesti (Burns i sur., 2002). Postoji u obliku dva izomera: *cis*- i *trans*- (Slika 23). *Trans*- izoforma je glavna izoforma i bolje je istražen oblik. Izloženost toplini i ultraljubičastom zračenju može dovesti do toga da se *trans*-izoforma pretvori u *cis*-izofornu, čija struktura blisko podsjeća na strukturu sintetskog estrogena dietilstilbestrola. Zbog toga je resveratrol također klasificiran i kao fitoestrogen (Pasquariello i sur., 2020.).



**Slika 23.** Struktura resveratrola. Preuzeto i prilagođeno prema Zhang i sur., 2021.

Resveratrol pokazuje brojne biološke aktivnosti. Posjeduje antioksidativna i protuupalna svojstva i poništava učinke starenja kod štakora (Sato i sur., 2014.). Također ima

kardioprotektivni učinak; redovito umjereno konzumiranje crvenog vina udruženo je sa manjim rizikom kardiovaskularnih bolesti – tzv. Francuski paradoks (Carter i sur., 2014.).

Kao prirodan sastojak posjeduje protutumorska svojstva protiv raznih tumora. Njegova mogućnost suprimiranja stanične proliferacije, induciranja apoptoze i supresije invazije i metastaziranja u brojnim staničnim linijama čine ga zanimljivim prirodnim sastojkom u terapiji tumora (Shukla, Singh, 2011.).

Uporaba prirodnih sastojaka u prevenciji, supresiji ili liječenju inicijacije, promocije i progresije malignoma, supresiji angiogeneze i metastaziranja sve više dobiva na važnosti preventivno radi njihove relativne niske toksičnosti (Williams i sur., 2009.). Resveratrol, kao jedan od najistraženijih sastojaka prehrane djeluje na slijedeće molekularne ciljeve: apoptozu (p53, Bax/Bcl-2, Survivin, Kaspaze-9,8,7,3, PARP); stanični ciklus (p21,ciklini,cdk); protein kinaze (MAPK, PI3K/AKT, JAK, Wnt), čimbenike transkripcije (NF- $\kappa$ B, AP-1, Nrf-2); metastaziranje i invaziju (MMP-2, -7, -9, VEGF).

### ***2.14.1. Resveratrol i apoptoza***

Mnogi dokazi pokazali su da resveratrol inducira apoptozu više vrsta tumorskih stanica, ali način djelovanja razlikuje se između različitih tipova tumorskih stanica (Takashina i sur., 2017.). Dostupni podaci pokazuju da resveratrol potiče različite puteve apoptoze. Pokazano je da potiče zastoj staničnog ciklusa i apoptozu aktivacijom p53. Također je pokazano da može inducirati apoptozu u p53 mutantnim tumorskim stanica (Lin i sur., 2011.), što ukazuje da inducira apoptozu u p53 ovisnim i p53 neovisnim putevima.

Apoptoza se događa vanjskim putem (receptor smrti) ili unutranjim (mitohondrijskim putem). Resveratrolom inducirana apoptoza uglavnom je posredovana unutranjim putem. Pokazalo se da resveratol uzrokuje apoptozu tumora pluća, mokraćnog mjehura, tumora kože, glioma, tumora dojke, tumora kolona i akutne limfoblastične anemije preko mitohondrijskog puta apoptoze (Rauf i sur., 2018.). Indukcija apoptoze resveratrolom preko receptora smrti ostaje upitna, budući on ne upregulira ekspresiju receptora smrti (Delmas i sur., 2003.). Blokiranjem ovih receptora ne smanjuje se apoptoza pokrenuta resveratrolom (Dorrie i sur., 2001.). Fas receptor smrti posreduje resveratrolom induciranu staničnu smrt preraspodjelom Fas u membranske splavi – mala, dinamična područja obogaćena kolesterolom i sfingolipidima koja kompartmentaliziraju stanične

procesu (Delmas i sur., 2003.). Resveratrol senzitivira neke tumorske stanice na druge pokretače apoptoze (npr. TNF-u srodni ligand za indukciju apoptoze) induciranjem receptora i „downregulacijom“ staničnih proteina preživljenja (Survivin) (Fulda i Debatin, 2004.). Survivin je antiapoptotski protein koji je dokazano „downreguliran“ od strane resveratrola (Taguchi i sur., 2016.). Bax ekspresija pojavljuje se samo kod visokih doza resveratrola, dok se Bax translokacija i mitohondrijski posredovana apoptoza javljaju pri niskom dozama (Mahyar-Roemer i sur., 2002.).

Resveratrol mijenja omjere Bax/bcl2 što dovodi do gubitka mitohondrijskog transmembranskog potencijala (MTP) sa otpuštanjem citokroma c što rezultira aktivacijom kaspaza 3 i kaspaza 9 i apoptozom. Članovi Bcl-2 obitelji smatraju se potencijalnim metama za antitumorsku terapiju budući igraju ključnu ulogu u regulaciji apoptoze (Marimuthu i sur., 2017.).

Kalar i sur., 2008. pokazali su da se resveratrolom inducirana apoptoza u staničnim linijama karcinoma kože miša događa preko aktivacije p53 i proapoptotske Bax ekspresije sa konkomitantnom redukcijom antiapoptotskog proteina Bcl-2. S druge strane Chow i sur. (2010.) pokazali su da je resveratrol uzrokovao apoptozu u stanicama humanog nazofaringealnog karcinoma „downregulacijom“, N-terminalno okrnjenih izoformi p63, neovisno o p53 putu.

### ***2.14.2. Resveratrol i angiogeneza***

Resveratrol inhibira angiogenezu preko regulacije VEGF-a. Pokazano je da resveratrol inhibira ekspresiju VEGF-a u stanicama osteosarkoma (Liu i sur., 2012.). Suprimira VEGF ekspresiju u stanicama humanog karcinoma jajnika downregulacijom HIF-1 $\alpha$  (Kasiotis i sur., 2013.). Resveratrol uz inhibiciju bazalne ekspresije preko Akt i MAPK i indukciju preko IGF-1 također stimulira proteosomalnu degradaciju HIF-1 $\alpha$ .

### ***2.14.3. Resveratrol i upalni procesi***

Resveratrol može inhibirati upalni odgovor staničnih linija karcinoma kolona Caco-2 i SW480 induciranih lipopolisaharidom (LPS) preko inhibicije NF- $\kappa$ B signalnog puta direktnim djelovanjem na nuklearni transkripcijski čimbenik inhibicijom fosforilacije ili downregulacijom TLR-4. Protuupalni učinak resveratrola potvrđen je i u *in vivo* istraživanjima. U modelu HCC-a kod štakora, 20 tjedna primjena resveratrola inhibirala je hepatocitne nodule na način ovisan o dozi preko „downregulacije“ HSP70 i COX-2 ekspresije smanjenjem translokacije NF- $\kappa$ B iz



citoplazme u jezgru (Bishayee i sur., 2010.). U drugom istraživanju sa istom primjenjenom dozom resveratrola pokazalo se da razina ekspresije jetrenog TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 induciranih od DENA bude poništena. Time je pokazan antitumorski učinak resveratrola promjenama proupalnih citokina (Mbimba i sur., 2012.).

#### **2.14.4. Resveratrol i metastaziranje i invazija**

Resveratrolom tretirane HepG2 i HepG3 stanične linije HCC-a pokazuju smanjenu mogućnost migracije i invazije. Kod HepG2 stanica nađena je „downregulacija“ aktivnosti MMP-9 i „upregulacija“ ekspresije TIMP-1, dok je kod Hep3b stanica nađena smanjena aktivnost MMP-2 i MMP-9 sa porastom ekspresije TIMP-2 (Weng i sur., 2010.). Navedeni rezultati ukazuju na anti-invazivnu i anti-migratornu sposobnost resveratrola preko regulacije aktivnosti i ekspresije MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2. U procesu regulacije MMP-9, NF- $\kappa$ B ima važnu ulogu. TNF-om obrađene HepG2 stanice izražavaju visoke razine MMP-9, koji je suprimiran resveratrolom preko „downregulacije“ ekspresije NF- $\kappa$ B što rezultira smanjenjem ekspresije MMP-9 i inhibicijom invazijske sposobnosti HepG2 stanica (Yu i sur., 2008.).

#### **2.14.5. Resveratrol i oksidativni stres**

Senggottuvelan i sur. (2009.) proveli su *in vivo* istraživanje na štakorima u svrhu otkrivanja djelovanja resveratrola na ROS. Životinjama je injiciran 1,2 dimetilhidrazin (DMH) u svrhu indukcije karcinogeneze kolona uz primanje resveratrola (8-12 mg/kg dnevno) kroz dva tjedna. Rezultati su pokazali da je dugotrajni dodatak resveratrola značajno umanjio DNA oštećenja inducirana od strane DMH. Fenolna skupina resveratrola ima anti-peroksidativni učinak kojim može očistiti anionske radikale lipidnog hidroksiperoksila, hidroksila i superoksida (Murias i sur., 2005.). Dodatak resveratrola potiče antioksidativnu aktivnost u stanici podizanjem razine superoksid dismutaze (SOD), katalaze i drugih antioksidativnih enzima kao i povećanje razine brojnih kočimbenika poput glutationa, vitamina C, vitamina E i  $\beta$ -karotena (Senggottuvelan i sur. 2009). Resveratrol također povećava ekspresiju SOD u PC-3, HepG2 i MCF-7 stanicama. Budući SOD katalizira konverziju superoksidnih aniona u H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>, disproporcionalno povećanje enzima uzrokuje nakupljanje H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> u mitohondrijima što naposljetku dovodi do apoptoze.

#### **2.14.6. Resveratrol i indukcija autofagije**

Autofagija je proces samouništenja (Glick i sur., 2010.) kojim se osigurava preživljenje ili potiče smrt promijenjene ili oštećene stanice u uvjetima stresa, oštećenja, gladovanja, starenja ili

infekcije patogenom. Autofagijom se također odstranjuju krivo smotani ili agregirani proteini, pročišćuju oštećeni organeli ili eliminiraju unutarstanični patogeni (Elshaer i sur., 2018.). Resveratrol pokazuje sposobnost induciranja autofagne stanične smrti pretjeranom stimulacijom autofagije u apoptotski defektnim stanicama. Najpoznatiji signalni putevi kojim resveratrol inducira autofagiju -pojačanom aktivacijom i ekspresijom sirtuina1 (SIRT1), inhibicijom Akt/mTOR i aktivacijom MAPK kinaze što je pokazano u primjeru nemalostaničnog karcinoma pluća (Wang i sur., 2018.).

#### ***2.14.7. Resveratrol i kemoterapija***

Glavni uzrok neuspjeha konvencionalne kemoterapije je razvoj rezistentnosti. Kemosenzibilizacija je jedna od strategija prevladavanja kemorezistence. Kemosenzibilizacija je bazirana na upotrebi jednog lijeka na način da potakne drugi utječući na jedan ili više mehanizama rezistentnosti. Mnoga istraživanja pokazala su da prirodni sastojci imaju aditivne i sinergističke učinke unapređujući djelovanje kemoterapeutika i smanjujući nuspojave (Cragg i sur., 2015.). Mnogi literaturni podaci opisuju resveratrol kao kemoprotektivnu tvar (kardio i neuroprotektivne sposobnosti) sa mogućnošću smanjenja nuspojava i mogućnošću pojačanja djelotvornosti kemoterapeutika ( Berretta i sur., 2020.). Kemosenzibilizirajući učinak resveratrola očituje se sa mnogim kemoterapeuticima i može dovesti do aditivnog ili sinergističkog učinka uz bolji odgovor na primjenjeni lijek potencirajući učinke lijeka, smanjujući potrebne doze lijeka i smanjujući nuspojave.

#### ***2.14.8. Resveratrol i alkilirajući kemoterapeutici***

Ograničavajući čimbenici upotrebe cisplatine su nuspojave kao što je dozom limitirana toksičnost, osobito nefrotoksičnost. Mehanizmi toksičnosti uključuju zastoj staničnog ciklusa, stvaranje ROS-a i apoptozu (Wu i sur., 2005.). Drugi limitirajući čimbenik upotrebe cisplatine je razvoj rezistentnosti. Resveratrol pokazuje sinergističke učinke s cisplatinom kao posljedicom povećanja apoptoze udružene sa otpuštanjem citokroma c iz mitohondrija u citosol i abnormalnom ekspresijom Bcl-2 i Bax proteina. Resveratrol smanjuje apsorpciju glutamina smanjujući ekspresiju glutaminskog transportera ASCT2. Glutamin može biti direktno pretvoren u glutation, jedan od glavnih antioksidansa. Resveratrolom inducirana kemosenzibilizacija cisplatine udružena je sa porastom stvaranja ROS-a, oštećenjem DNA i apoptozom stanica

humanog HCC što sugerira da bi resveratrol mogao senzibilizirati stanice HCC-a na djelovanje cisplatine inhibicijom metabolizma glutamina (Liu i sur., 2018.).

Drugi primjer sinergije cisplatine i alkilirajućeg kemoterapeutika je temozolomid (TMZ) – zlatni standard za liječenje glioblastoma. TMZ inducira apoptozu i autofagiju u stanicama glioma preko ROS-a i aktivacijom izvanstaničnih kinaza koje reguliraju signal (ERK). Proces autofagije također vrši protektivni učinak, izbjegavanjem apoptoze (Kiskova i sur., 2020.). Najmanje 50% pacijenata pod terapijom TMZ ne reagiraju na lijek, uglavnom radi pretjerane ekspresije MGMT (O6-metilguanin metiltransferaza) i/ili smanjenjem količine popravka DNA što uključuje p53 tumor supresor MDM2 protein (Jiapaer i sur., 2018). Resveratrol povećava terapijski učinak TMZ smanjenjem ROS/ERK posredovane autofagije i povećanjem apoptoze. U staničnoj liniji SHG44 GBM resveratrol inducira adaptivni antiproliferativni učinak TMZ-a preko ROS-ovisnog AMPK/TSC/mTOR signalnog puta. Rezultati su potvrđeni *in vivo* na modelu miša gdje je zajedničko djelovanje resveratrola i TMZ dovelo do smanjenja volumena tumora i tumorske proliferacije (Yuan i sur., 2012.).

#### **2.14.9. Biodostupnost resveratrola**

Oralna apsorpcija resveratrola je visoka (cca 75%) i događa se primarno preko transepitelne difuzije (Walle, 2011.). Međutim, biodostupnost resveratrola je manje od 1% radi ekstenzivnog metabolizma u crijevima i jetri što uključuje konjugaciju sa glukuronskom kiselinom i sulfatizacija u svrhu stvaranja glavnih metabolita – trans-resveratrol-3-O- glukuronid i trans-resveratrol-3-sulfat. (Rotches-Ribalta i sur., 2012.). Slijedom navedenog, u sistemskej cirkulaciji mogu se naći samo tragovi slobodnog resveratrola (Cottart i sur., 2010.). Kod ljudi oralno primijenjen resveratrol dostiže vrh plazmatske koncentracije nakon 1h i drugi vrh nakon 6h što upućuje na enteralnu recirkulaciju što rezultira opaženim vremenom poluživota od 9,2h (Almeida i sur., 2009.). Radi povećanja biodostupnosti stvaraju se razne nanoformulacije uključujući liposome, solidne lipidne nanočestice, polimerne nanočestice i ciklodekstrine koje se međusobno razlikuju po veličini čestica.

## 2.15. NANOČESTICE

Idealan sustav za dostavu lijekova s nanočesticama trebao bi moći prepoznati, vezati i dostaviti lijek specifičnim patološkim tkivima te umanjiti ili izbjeći oštećenja na zdravim tkivima (Friedman i sur., 2013.). Fizikalno - kemijska i biološka svojstva nanočestica stoga se mogu prilagoditi manipulacijom njihovih kemijskih svojstava, veličine, oblika, strukture, morfologije i površinskih svojstava gdje je pristup konjugacije molekule lijeka i modifikacije površine vrlo bitan za učinkovitu isporuku lijeka. Molekule lijeka mogu se apsorbirati ili kovalentno vezati na površinu nanonosača, a i unutarnja jezgra ima sposobnost ugradnje molekule lijeka. Najčešći pristupi koji se koriste u modificiranju površine nanočestica je oblaganje specifičnim ciljnim ligandima koji mogu biti u obliku malih molekula, peptida, protutijela, dizajniranih proteina i aptamera nukleinskih kiselina, a isto tako se koriste hidrofilni i/ili hidrofobni polimeri poput polietilen glikola (PEG) i poli( $\epsilon$ -kapolakton)-a (PCL). Mehanizmi ciljanja dalje omogućavaju aktivan ili pasivan prijenos nanočestica (Panzarini i sur., 2013.).

Tijekom razvoja lijekova, otprilike 90% ih se može klasificirati kao slabo topivi (Loftsson i Brewster, 2010.). S obzirom na brojnost slabo topivih lijekova razvija se sve veći broj novih tehnologija za povećanje biodostupnosti lijeka. Nanokristali su perspektivan način raspodjele lijeka, budući se sastoje od čiste djelatne tvari i minimuma površinski djelatne tvari potrebne za stabilizaciju sa prosječnom veličinom čestica između 10-800 nm (Junghanns, 2008.).

Prednosti koje nudi upotreba nanočestica;

- Mogućnost primjene lijeka različitim putevima (oralno, intravenozno, intramuskularno, itd..)
- Bolja topivost u usporedbi sa konvencionalnim česticama
- Veća brzina otapanja u odnosu na konvencionalne čestice
- Mogućnost pasivne ili aktivne primjene lijeka
- Dulje vrijeme lijeka provedenog u cirkulaciji
- Smanjenje iritacije tkiva u slučaju potkožne/intramuskularne primjene

Neki od nedostataka primjene nanočestica;

- Problemi stabilnosti kao posljedica fizikalno-kemijskih svojstava
- Teškoće pri postizanju uniformne i točne doze

Pojam nanokristal se najčešće koristi za solidnu tvar u nanometrijskom spektru sa minimalno dodane pomoćne tvari. Pojam nanočestice se koristi za tvari u nanometrijskom spektru i uglavnom uključuje polimere ili lipide, npr. polimerne nanočestice.

### **2.15.1. *Proizvodnja nanokristala***

Nanokristali se mogu proizvesti silaznim (engl. *top-down*) ili uzlaznim (engl. *bottom-up*) tehnologijama. Silazne tehnologije odnose se na smanjenje velikih čestica u nanometarski spektar kao što je to sa npr. mljevenjem ili visokotlačnom homogenizacijom, dok uzlazne metode stvaraju nanočestice izgradnjom iz molekula lijeka u otopini, npr. precipitacijom (Gigliobianco i sur., 2018.). Od svih dostupnih nanoformulacija, proizvodnja nanokristala predstavlja najjednostavniji i samim tim najjeftiniji i najdostupniji način dostave lijeka u nano spektru.

### **2.15.2. *Nanokristali i biodostupnost***

Biodostupnost lijeka ovisi o sposobnosti otapanja u biološkim tekućinama i prelasku membrana da bi se postigao farmakološki cilj. Mehanizmi povećanja biodostupnosti formulacijom nanokristala uključuju:

- Smanjenje veličine čestice vodi prema povećanju površine dostupne za interakciju sa otapalom i time porasta topivosti u suglasju s modificiranim Noyes-Whitney zakonom (Mauludin i sur., 2009.).
- Porast zakrivljenosti čestica (posebno se odnosi na koloidne čestice) prema Kelvinovoj jednadžbi vodi prema porastu tlaka otapanja (Muller, 2004.).
- Povećana topljivost vodi prema povećanju koncentracijskog gradijenta na membranama i time boljoj permeabilnosti membrane (Shegokat i sur., 2010.).
- Nanokristali mogu biti primjenjeni intravenozno i mogu efikasno doseći ciljani organ sa 100%tnom biodostupnosti (Ganta i sur., 2009.).

Navedeno rezultira istodobnim smanjenjem količine potrebnog lijeka i toksičnosti doze što omogućava sigurniju isporuku toksičnih terapijskih lijekova te zaštitu zdravih stanica i tkiva od mogućih nuspojava.

### ***2.15.3. Toksičnost nanočestica***

Djelatnost nanočestica proizlazi iz njihove iznimno male veličine, manje od stanica i podstaničnih jedinica što im omogućuje prodor kroz biološke strukture i samim time mogu promijeniti ili omesti normalne stanične funkcije. Generalno govoreći, manje čestice pokazuju veću toksičnost od većih čestica tvari istog kemijskog sastava i kristalne strukture (Mostafalou i sur., 2013.). Manje čestice teže se eliminiraju od većih mehanizmima uklanjanja. Zbog male veličine, nanočestice mogu ući u stanice fagocitozom i drugim mehanizmima koji uključuju pasivni unos ili adhezivne međureakcije posredovane Van der Waalsovima silama, steričkim međureakcijama i elektrostatičkim nabojima (Geiser i sur., 2005.). Njihov unos se tako može dogoditi čak i ako nema specifičnih staničnih receptora i pridruženih substaničnih struktura. Ovisno o njihovoj unutarstaničnoj lokalizaciji, nanočestice mogu doprinijeti i nastanku oksidacijskog stresa ili oštećenju DNA, a pokazano je kako mogu sudjelovati u moduliranju imunskog odgovora (Zolnik i sur., 2010.).

## § 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

#### ***3.1.1. Pokusne životinje i održavanje uvjeta nastambe***

U istraživanju su korišteni miševi istog spola, soja Balb/C, u dobi oko 2-5 mjeseci, mase 25–35 g, iz uzgoja pogona za uzgoj laboratorijskih životinja Instituta Ruđer Bošković. Miševi su držani u kavezima s najviše 5 životinja pod standardnim uvjetima (24 °C, ciklus 12 sati svjetla i 12 sati mraka) uz stalnu dostupnost standardne hrane za glodavce (Standard Diet 4RF 21 GLP certificate, Mucedola, Italija) i vode.

Istraživanje je provedeno u suglasju s važećim etičkim principima u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine broj 135/06, Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne novine broj 176/04) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) 86-23, 1985). Nadalje, provedeno istraživanje je provedeno uz prethodno odobrenje Povjerenstvo za bioetiku i dobrobit životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (URBROJ: 251-58-10617-19-1150; datum odobrenja: 05. prosinca 2019.).

#### ***3.1.2. Ehrlichov ascitesni tumor (EAT)***

Ehrlichov ascitesni tumor je nediferencirani karcinom, podrijetlom iz mamarnih stanica miša, hiperdiploidan, ima veliku mogućnost transplantacije, brzo raste, potpuno je malignan s izrazito osjetljivim i heterogenim stanicama, i nema tumor specifične transplantacijske antigene (TSTA) što ga čini izvrsnim izborom za istraživanja. EAT je vrlo sličan ljudskim tumorima koji su najsenzitivniji na kemoterapiju zbog činjenice da je nediferenciran, angiogeneza-ovisni brzorastući tumor i kao takav prikladan za proučavanje učinka kemijskih i prirodnih sastavnica na rast tumora, angiogenezu, upalu i imunomodulaciju.

Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) održavane su u peritonealnoj šupljini Balb/C miševa intraperitonejskim (*ip*) injiciranjem EAT stanica te serijskim presađivanjem stanica svakih 7 ili 9 dana u obliku ascitesa. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 5 mL fiziološke otopine i lagane masaže trbušne stijenke, napravljen je produžni rez i otvorena peritonejska šupljina miša.

Pasteurovom pipetom uzeta je peritonejska tekućina s tumorskim stanicama i razrijeđena s fiziološkom otopinom (0,9 % otopina natrij klorida, Pliva) do ciljane koncentracije EAT stanica ( $1 \times 10^6$  stanica u 0,5 mL/ miš). Broj živih stanica određen je brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker-Türkovoju komorici. U ovom istraživanju korišten je solidni model rasta tumora prouzročen unosom EAT stanica subkutano (*sc*) u desnu femoralnu regiju miša.

### **3.1.3. Resveratrol**

Otopina resveratrola pripravljena je otapanjem resveratrola (Evolva SA, Švicarska) u vodi uz dodatak DMSO. Resveratrol je primjenjen *per os (po)* intragastričnom kanilom u dozi od 50 mg/kg.

### **3.1.4. Nanokristali resveratrola**

Nanokristali resveratrola pripremljeni su na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, modificiranom metodom prema Romero i sur., (2015). Nanokristali resveratrola otopljeni su u vodi i primjenjeni *po* u dozi od 50 mg/kg pomoću intragastrične kanile.

### **3.1.5. Cisplatin**

Citostatik cisplatin (Cisplatin, Pliva) neposredno prije uporabe pripremljen je u dozi od 5 mg/kg razrjeđivanjem u vodi za injekcije (Aqua pro injectione, Pliva) i injiciran u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10 dana i 12 dana te u dozi od 5 mg/kg 15 dana.

### **3.1.6. Reagensi i mišji kompleti**

#### **3.1.6.1. Anesteziranje životinja**

Za anesteziranje životinja korištene su slijedeće kemikalije:

- Ksilapan® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska;
- Narketan® 10, Vétquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska.



### 3.1.6.2. Izrada histoloških preparata

Za izradu histoloških preparata parafinskom tehnikom korištene su slijedeće kemikalije:

- eozin, Kemika, Hrvatska;
- etanol, apsolutni (100%), p.a. Gram-Mol d. o. o.; Hrvatska;
- formaldehid, 36-38%, Lach-Ner, Češka;
- kloroform, p.a., Kemika, Hrvatska;
- ksilen, Zorka Pharma, Srbija;
- ledena octena kiselina, p.a., Alkaloid, Makedonija;
- Mayerova otopina, Kemika, Hrvatska;
- octena kiselina, min 99,5%, Kemika, Hrvatska.

### 3.1.6.3. Određivanje razine dušikova(II) oksida (NO)

Za određivanje razine dušikova(II) oksida (NO) korišten je:

- Griess reagent system, Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 USA, Kataloški br. G2930.

### 3.1.6.4. Određivanje HDAC aktivnosti u tkivu tumora

Za određivanje HDAC aktivnosti u tkivu tumora korišten je:

- HDAC Activity Colorimetric Assay Kit, BioVision Incorporated 155 S. Milpitas Boulevard, Milpitas, CA 95035 USA, Kataloški broj K331-100.

### 3.1.6.5. Određivanje aktivnosti enzima oksidacijskog stresa

Za određivanje aktivnosti enzima oksidacijskog stresa korištene su slijedeće kemikalije:

- natrijev karbonat anhidrid ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Mr = 105,99; p. a., Applichem GmbH, Njemačka;
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), Mr = 177,99; p. a., Applichem GmbH, Njemačka;
- natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ), Mr = 358,14; p. a., Applichem GmbH, Njemačka;
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), Mr = 156,01; p. a., Kemika, Hrvatska;
- natrijev hidroksid (NaOH), Mr = 40,00; p. a., T. T. T. d. o. o., Hrvatska;

- natrij-kalij tartarat tetrahidrat ( $C_4H_4KNaO_6 \times 4 H_2O$ ), Mr = 282,23; *p. a.*, T. T. T. d. o. o., Hrvatska;
- bakrov(II) sulfat pentahidrat ( $CuSO_4 \times 5 H_2O$ ), Mr = 249,68; *p. a.*, T. T. T. d. o. o., Hrvatska;
- glutation reduktaza (enzim, iz pekarskog kvasca), 100-300 U/mg proteina, Sigma-Aldrich Corporation, SAD;
- Folin i Ciocalteu's fenol reagens, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka;
- citokrom C iz govedeg srca,  $\geq 95\%$ , 100 mg, Sigma-Aldrich Corporation, SAD;
- ksantin oksidaza, Buttermilk 50 U, 1,05 U/mg proteina, Calbiochem, SAD;
- ksantin (2,6-dihidroksipurin) ( $C_5H_4N_4O_2$ ),  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Kina;
- EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2H_2O$ ), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka;
- NADPH tetranatrijeva sol, Mr = 833,35; Applichem GmbH, Njemačka;
- DTNB (5, 5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina), Mr = 396,36; Fluka, Švicarska;
- albumin iz govedeg seruma, BSA, Sigma-Aldrich, SAD;
- SDS, natrij dodecil sulfat, Promega Corporation, SAD;
- PBS (fosfatni) pufer, Biowhittaker<sup>®</sup>, Lonza, Belgija;
- L-glutation, reducirani,  $\geq 98,0\%$ , Mr = 307,32; Sigma-Aldrich, SAD;
- TBA, tiobarbituratna kiselina, Mr = 144,15; Applichem GmbH, Njemačka;
- octena kiselina, min 99,5 %, Kemika, Hrvatska;
- klorovodična kiselina (HCl), 37%,*p.a.*, Gram-Mol d. o. o., Hrvatska;
- vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), 30%,*p.a.*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka.

### 3.1.6.6. Procjena razina HSP70 i HSP90 u tkivu tumora

Za procjenu razina HSP70 i HSP90 u tkivu tumora korištene su slijedeće kemikalije:

- Mouse Heat Shock Protein 70 (HSP70) Elisa kit (Sandwich ELISA)
- Mouse HSP90 (Heat Shock Protein 90) ELISA Kit MyBioSource, Inc. P.O. Box 153308 San Diego, CA 92195-3308 USA, Kataloški brojevi: BS722559, MBS764705

### 3.1.6.7. Određivanje MMP-2 i MMP-9

Za određivanje matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 korišteni su:

- Mouse MMP-2 ELISA Kit

- Mouse MMP-9 ELISA Kit  
7F, Bldg B, High-tech Venture Park, #107 Erlang Chuangye Rd, Jiulongpo District, Chongqing, 400039, Kina, Kataloški brojevi: BEK1157, BEK1163

### **3.1.6.8. Određivanje Arginaze**

Za određivanje arginaze korišten je:

Arginase activity assay kit, MAK112 (Sigma-Aldrich, SAD)

### **3.1.7. Hipertermija**

- Inkubator
- Kavezi za miševе
- Plastične epruvete za centrifuge zapremine 50 mL na kojima su prethodno pomoću lemilice učinjene višestruke perforacije promjera 3 mm za opskrbu zraka miševima

### **3.1.8. Instrumenti**

Tijekom istraživanja korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga Kern & Sohn GmbH, ABS 220-4, d = 0,01 g : 220 g;
- digitalna vaga Kern KB 2000-2N, d = 0,01 g : 2000 g;
- vodena kupelj GFL 1052 i Memmert WNB14 GmbH + Co. KG;
- ultrazvučni homogenizator Bandelin electronic UW 2070 suređajem Bandelin Sonoplus HD 2070;
- inkubator (sCO<sub>2</sub> sustavom) NAPCO<sup>®</sup> Model 5415 IR CO<sub>2</sub> System i JUMO ITRON 08 (bez CO<sub>2</sub> sustava);
- laminar Cleanroom Technology, Klima oprema;
- brojač stanica Differ 100, ER TEFAK;
- tresalica IKA<sup>®</sup> 130 basic;
- vorteks miješalica VORTEX GENIUS 3, IKA-Werke GmbH & CO. KG;
- magnetska miješalica i grijalica Heidolph MR 2002;
- pH metar Lab 850, Schott instruments;
- mikrotom Thermo Electron Corporation, Shandon Finesse 325;
- termostat Shel Lab SL<sup>®</sup>;
- centrifuga Centrifuge 5702, Eppendorf i Mikro 200R, Hettich;

- UV-Vis spektrofotometar: UV-160, Shimadzu i Libra S22, Biochrom;
- mikrotitarski čitač Microplate reader Model 550, Bio-Rad i iEMS Reader MF, Labsystems;
- svjetlosni mikroskop Nikon, Eclipse E600 s kamerom AxioCam ERc5s, Zeiss;
- svjetlosni mikroskop Olympus Cx21

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Plan pokusa i način obrade životinja

Miševe su injicirani sa  $1 \times 10^6$  EAT stanica (Ehrlich ascites tumor) subkutano u desni femur kako bi izazvali nastanak Ehrlichovog solidnog tumora. Prije početka pokusa, i tijekom izvođenja pokusa životinjama je pojedinačno mjerena težina na temelju čega je određena količina pojedinačnih pripravka davanih tijekom pokusa. Sve životinje su podijeljene u dvije velike grupe (I grupa – fiziološki uvjeti, II grupa-hipertermalni uvjeti), koje sadrže po 6 skupina, (N=15 životinja u svakoj skupini). Nakon injiciranja stanica tumora, intragastrično su životinje obrađene resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *po* i/ili njegovim nanokristalima tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatina injicirana kada je tumor postao vidljiv (otprilike 1000 mm<sup>3</sup> oko 10 dana) u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10 dana i 12 dana dok doza od 5 mg/kg sa i/ili bez hipertermije je injicirana 15 dana, a 24 sata poslije životinje su bile žrtvovane. Grupa II je izložena sustavnoj hipertermiji prema protokolu Duhan i sur. (2012.) s malim promjenama u temperaturi i vremenu izlaganja. Životinje su izložene zagrijavanju od 41 °C tijekom 15 min.

Plan pokusa i podjela u dvije grupe po 6 skupina su navedene kako slijedi:

#### I GRUPA

1. Kontrola
2. Resveratrol 50 mg/kg *po*
3. Nanokristali resveratrola 50 mg/kg *po*
4. Cisplatin 5 mg/kg *ip*
5. Resveratrol 50 mg/kg *po* + Cisplatin 5 mg/kg *ip*
6. Nanokristali resveratrola 50 mg/kg *po* + Cisplatin 5 mg/kg *ip*

## II GRUPA

1. Kontrola + hipertermija
2. Resveratrol 50 mg/kg *po* + hipertermija
3. Nanokristali resveratrola 50 mg/kg *po* + hipertermija
4. Cisplatin 5 mg/kg *ip* + hipertermija
5. Resveratrol 50 mg/kg *po* + Cisplatin 5 mg/kg *ip* + hipertermija
6. Nanokristali resveratrola 50 mg/kg *po* + Cisplatin 5 mg/kg *ip* + hipertermija

Nakon predviđene obrade 5 životinja je žrtvovano za uzimanje tumorskog tkiva za analizu protutumorskih i angiogenih značajki (broj krvnih žila, razine VEGF, MMP-2, MMP-9, HDAC aktivnosti, HIF-1 $\alpha$ , HSP90, HSP70, dušik oksid (NO) arginaze 1 (Arg1), te procjenu ukupne antioksidativne/prooksidativne sposobnosti. Također su prikupljeni uzorci krvi (serum) i organi kao bubreg, jetra i slezena za procjenu razine oštećenja, NO, Arg1, makrofagne polarizacije te procjenu ukupne antioksidativne/prooksidativne sposobnosti. Pluća su izolirana i stavljena u Buenovu otopinu za provjeru moguće prisutnosti metastaza. Tijekom uzimanja krvi sve životinje su adekvatno anestetizirane i analgezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin) u dozi od 25 mg/kg. Ostatak životinja (N=10) je iskorišten za praćenje rasta i veličine tumora kaliperom te praćenje težine životinja i povećanja životnog vijeka te ukupnog preživljavanja do 3 mjeseca.

### **3.2.2. Hipertermija**

Hipertermija miševa izvedena je prema protokolu Duhan i sur. (2012.). U standardni inkubator (JUMO ITRON 08) zagrijan na 41 °C postavljen je kavez predhodno zagrijan s miševima imobiliziranim u perforiranim epruvetama od 50 mL. Imobilizacija miševa izvedena je pomoću perforiranih epruveta za centrifugu u koje su miševi smješteni. Perforacije su napravljene lemlicom sa ciljem da se miševima osigura dotok zraka. Naime, imobilizacija miševa ključna je za održavanje konstantne tjelesne temperature miša, budući da miševi reagiraju na stres tijekom

pokusa hiperaktivnošću i posljedičnom hipertermijom koja se pokazala većom od zadane temperature inkubatora i do dva stupnja Celzijusa.

U svaki kavez postavljene su 4 epruvete sa miševima i po dva kaveza su stavljena u inkubator na ciklus hipertermije od 15 minuta. Da bi se spriječila dehidracija miševa, intraperitonealno je injicirano 0,5 mL fiziološke otopine.

### **3.2.3. Priprema i karakterizacija nanokristala**

Resveratrol u obliku nanokristala pripremljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju. Priprema nanokristala resveratrola temelji se na mljevenju resveratrola primjenom "*top-down approach*" metode prema modificiranoj metodi Romero i sur. (2016.). Pripremljena je nanosuspenzija resveratrola s nanočesticama veličine 200 nm koja sadrži 1% stabilizatora Pluronic F127. Prvi korak u tom procesu bio je pripremiti 5%-tnu suspenziju resveratrola (w/w) te 1%-tnu suspenziju stabilizatora Pluronic F127. Suspenzija je podvrgnuta mljevenju u minijaturnom mjerilu u okrugloj bočici (dimenzije 12 x 35 mm) sa pet cilindričnih magneta (dimenzija 10 x 6 mm). Smjesa kuglica cirkonijevog oksida stabiliziranog itrijem različitih veličina (0,1 mm; 0,2 mm te 0,4 - 0,6 mm) pomiješanih u jednakim omjerima, korištena je kao medij pri mljevenju suspenzije. Sam postupak mljevenja provodio se na miješalici Magnetic stirrer MIX 15 eco, Berlin, Njemačka. Doza (50 mg/kg) resveratrola izabrana je prema dostupnoj literaturi (Carter i sur., 2015; Kim i sur., 2017; Alobaedi i sur., 2017; Davatgaran-Taghipour i sur., 2017.). Veličinu čestica i indeks polidisperznosti (PDI, engl. *polydispersity index*) nanokristala resveratrola određen je metodom fotonske korelacijske spektroskopije pomoću instrumenta Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Morfološke značajke nanokristala resveratrola određene su pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM, engl. *Transmission Electron Microscope*) a analiza suspenzije nanokristala resveratrola pomoću Zeiss EM10A mikroskopa. Prema literaturnim podacima prikladan stabilizator za *po* primjenu nanosuspenzije resveratrola veličine čestica 200 nm izabran je biokompatibilni polimer Pluronic® F-127 (De Smet i sur., 2012.). Pluronic® F-127 je neionski, surfaktant poliol (molekularne mase cca 12,500 daltona) koji olakšava topivost vodo-netopivih bojila i drugih materijala u fiziološkom mediju.

## ***Pokazatelji protutumorske i antiangiogene aktivnosti***

### ***3.2.4. Praćenje preživljenja pokusnih životinja***

Pri praćenju preživljenja životinja poštovani su naputci Vodiča za držanje i korištenje laboratorijskih životinja te sva pravila vezana za krajnje točke pokusa. Preživljavanje pokusnih životinja pratili smo nakon terapijske obrade miševa. U pokusu je praćena dinamika rasta tumora. Dinamiku rasta tumora tijekom pokusa praćena je do točke kada životinja počinje pokazivati prve naznake boli, nelagode, stresa, narušeno opće stanje. Tijekom pokusa životinje koje pokazuju narušeno opće stanje i bol su selektivno ubijene povećanom dozom anestetika ili cervikalnom dislokacijom od strane osobe zadužene za eutanaziju, uz prisustvo ovlaštenog veterinarara. Kriteriji za selektivno ubijanje životinja bio je: gubitak težine 15-20% od normalne vrijednosti; nemogućnost uspravljanja ili kretanja; veličina tumora (promjer veći od 1,5 cm u miša); ulcerirani, nekrotični ili inficirani tumor; otežano disanje; dehidracija; abdominalna napetost; i drugi klinički znakovi (dijareja, krvarenje iz bilo kojeg tjelesnog otvora, neuredno krzno i dlaka bez sjaja, dermatitis, zgrbljeni položaj tijela, žutica, anemija, samoozljeđivanje, neurološki znakovi). Životinje su svakodnevno i redovito praćene od strane voditelja projekta, voditelja nastambe, imenovanog veterinarara ili stručno osposobljenog osoblja uključenog u izvođenje doktorata. S naznakom prvih poremećaja u većini skupina uizgledu, ponašanju i boli životinje su bile žrtvovane; najduži period držanja životinja bio je 3 mjeseca. Povećanje životnog vijeka (%ILS, engl. *Increased Life Span*) izračunato je prema sljedećoj formuli:

$$\%ILS = 100 - \left( \frac{T - C}{C} \right) \times 100;$$

T - srednja vrijednost vremena preživljenja obrađene skupine životinja;

C - srednja vrijednost vremena preživljenja kontrolne skupine životinja.

### **3.2.5. Mjerenje promjene mase životinja i volumena tumora**

Procjenu rasta tumora i učinaka terapije na razini cjelokupnog organizma praćen je vaganjem životinja tijekom pokusa te praćenjem promjene mase. Životinje su vagane na digitalnoj vagi (Kern KB 2000-2N P.b.- 0,01 g : 2000 g) tijekom pokusa svakog 5. dana. Praćen je gubitak ili prirast mase životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. Mjerenje volumena tumora vršeno je kaliperom prema formuli:

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

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

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

### **3.2.6. Određivanje broja metastaza na plućima**

Nakon žrtvovanja životinja, pluća su izdvojena te je određen broj spontano nastalih metastaza. Pluća su fiksirana u Bouenovoj otopini (15 mL zasićene pikrinske kiseline, 5 mL 35% formalina i 1 mL ledene octene kiseline). Nakon fiksacije tumorski čvorići se ističu kao bijele nakupine tkiva na površini žuto obojenog plućnog tkiva.

### **3.2.7. Prikupljanje uzoraka i priprema uzoraka tkiva tumora**

Nakon 15 dana i 8 sati gladovanja, životinje svake skupine žrtvovane su primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin) u dozi od 25 mg/kg te nakon uzimanja krvi iz aksilarnog spleta žila, uzeti su uzorci tumorskog tkiva, isjeckani i potom homogenizirani u puferu za lizu [(40 mM HEPES, 50 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 1 mM benzamidina i 1% Triton-X (Sigma)] upotrebom homogenizatora za biokemijske analize.



### **3.2.8. HDAC aktivnost u tkivu tumora**

Procjena aktivnosti HDAC provedena je prema metodi prethodno opisanoj od Baidyaroy i sur. (2002.). Aktivnost HDAC je procijenjena korištenjem kolorimetrijskog HDAC testa (HDAC Activity Colorimetric Assay Kit, Biovision). Prije analize HDAC napravljena je nuklearna ekstrakcija tkiva tumora te određivanje koncentracije proteina po Bradford-u.

#### **3.2.8.1. Nuklearna ekstrakcija**

Za nuklearnu ekstrakciju korišten je komplet *Nuclear Extraction Kit* (ab113474, Abcam, SAD). Prema naputku, prvo je pripremljen 1X pre-ekstrakcijski pufer razrijeđenjem 10X ekstrakcijskog pufera u omjeru 1:10. Za pripremu 40 mL 1X pre-ekstrakcijskog pufera, uzeto je 4 mL 10X ekstrakcijskog pufera te razrijeđeno s 36 mL dH<sub>2</sub>O). U pufer je potom dodano 40 µL DTT-a (ditiotreitol) i koktel inhibitora proteaza (PIC, engl. *Protease Inhibitor Cocktail*). Otopine DTT i PIC su dodane u ekstrakcijski pufer u omjeru 1:1000 (po 10 µL).

U epruvete s uzorcima tumorskog tkiva dodano je po 500 µL pre-ekstrakcijskog pufera te su uzorci homogenizirani. Homogenati tumora su inkubirani 15 minuta na ledu, centrifugirani 10 min pri 12 000 rpm na 4 °C a potom je nadtalog uklonjen iz epruveta.

U epruvete je potom dodano po 250 µL pripremljenog ekstrakcijskog pufera s DTT-om i PIC-om, inkubirano na ledu 15 min uz vorteksiranje (5 sekundi) svake 3 minute. Ekstrakti tkiva su dodatno sonicirani 3 puta po 10 sekundi, centrifugirani 10 min pri 14 000 rpm na 4 °C i nadtalog prebačen u nove obilježene epruvete. Uzorci su razrijeđeni 100x te je izmjerena koncentracija proteina nuklearnog ekstrakta.

#### **3.2.8.2. 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 interakcije 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 otopljeno je 100 mg CBB G-250 u 50 mL etanola (95%). Nakon otapanja boje dodano je 100 mL fosforne kiseline te nadopunjeno s dH<sub>2</sub>O do 1 L.

Za mjerenje koncentracije proteina u jažice je dodano po 20  $\mu$ L uzorka i 40  $\mu$ L Bradfordova reagensa. Kao standard korištena je otopina albumin goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*), te pripremljena serija različitih koncentracija proteina (od 2 mg/mL do 1,953  $\mu$ g/ $\mu$ L). Nakon inkubacije u trajanju od 20 min na sobnoj temperaturi mjerena je apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 595 nm. Koncentracije proteina izračunata je pomoću kalibracijske krivulje i izražena kao  $\mu$ g/ $\mu$ L.

### 3.2.8.3. Kolorimetrijsko mjerenje aktivnosti HDAC

Za mjerenje aktivnosti HDAC korišten je komplet *HDAC Activity Colorimetric Assay Kit* (BioVision, USA). Metoda je napravljena prema naputku proizvođača a temelji se 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 obrada s lizinskim razvijanjem (*Lysine Developer*) proizvodi kromofor, koji se onda jednostavno može analizirati mikrotitarskim čitačem ili spektrofotometrom.

Za standardnu krivulju korišten je deacetilirani standard iz kompleta razrijeđen u koncentracijama 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M (Tablica 2), a za 0  $\mu$ g/ $\mu$ L pripremljeno je 90  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O i 10  $\mu$ L 10x pufera HDAC.

**Tablica 2.** Priprema standardnih otopina za standardnu krivulju u svrhu mjerenja HDAC

Koncentracija	Priprema
100 $\mu$ M	2 $\mu$ L 10 mM standarda + 198 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O
50 $\mu$ M	100 $\mu$ L 100 $\mu$ M standarda + 100 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O
25 $\mu$ M	100 $\mu$ L 50 $\mu$ M standarda + 100 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O

U odgovarajuće jažice dodano je 10  $\mu$ L uzorka i 75  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. Pozitivna kontrola sadržavala je 10  $\mu$ L nuklearnog ekstrakta HeLa u 75  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, a za negativnu kontrolu korišten je uzorak u 83

$\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O s dodatkom 2  $\mu\text{L}$  trihostatina. Potom je u jažice dodano 10  $\mu\text{L}$  10x pufera HDAC te 5  $\mu\text{L}$  kolorimetrijskog HDAC supstrata. Pločica s pripremljenim uzorcima inkubirana je 1 h na 37 °C. Nakon inkubacije dodano je 10  $\mu\text{L}$  lizinskog razvijaača te ponovno inkubirano na 37 °C 30 min. Apsorbancija je mjerena pomoću čitača na  $\lambda = 400$  nm te pomoću standardne krivulje određena je i izračunata koncentracija.

### **3.2.9. Kvantitativna analiza HIF-1 $\alpha$ u tumorskom tkivu**

Nakon žrtvovanja životinja uzorci solidnog EAT tumora miševa su fiksirani u 10% puferiranom formalinu 48-72 sata te uklopljeni u parafin. Od svakog parafinskog bloka s uzorkom tumorskog tkiva izrezani su rezovi debljine od 2 – 3  $\mu\text{m}$  za postupak imunohistokemijskog bojenja HIF-1 $\alpha$ . Po jedan rez tkiva obojan je hematoksilinom i eozinom za histološku analizu.

Tkivo je termički obrađeno 20 minuta u Tris/EDTA puferu, pH = 9,0 koji istovremeno deparafinira tkivo i demaskira antigen, kako bismo postigli da željeni antigeni postanu dostupni protutijelima. Imunohistokemijsko bojanje provedeno je na sobnoj temperaturi u automatiziranom uređaju za imunohistokemijsko bojenje (Dako Autostainer, Dako Danska). Za određivanje izraženosti primarnih protutijela korištena je HRP/DAB metoda u kojoj se mjesto vezanja primarnog protutijela vizualizira pomoću „anti-mouse/rabbit“ sekundarnog protutijela i DAB kromogena koji daje smeđe obojenje. HIF-1 $\alpha$  je određena u tumorskom tkivu pomoću mišjeg monoklalnog protutijela (Ab-4 Thermo Scientific clone H1 alpha 67; 1:200) upotrebom aparata (Dako Autostainer, Universal staining system), metodom MSIP (engl. *Microwave Streptavidin Immuno Peroxidase*).

### **3.2.10. Određivanje koncentracije HSP70 i HSP90 u tkivu tumora**

Koncentracija HSP70 i HSP90 u tkivu tumora određena je pomoću komercijalnog ELISA kompleta za miša (MyBioSource, San Diego, SAD) prema naputku proizvođača. HSP70 i 90 izraženi su kao pg/mg proteina tkiva.

Ukratko, u jažice je dodno po 50  $\mu\text{L}$  standarda ili uzorka (homogenati tumora) ili 50  $\mu\text{L}$  PBS-a kao negativna kontrola. Potom je u jažice s uzorcima dodano 5  $\mu\text{L}$  „balans“ otopine uz miješanje te 100  $\mu\text{L}$  konjugata u svaku jažicu (osim negativne kontrole). Uzorci su potom inkubirani 1 h na

37 °C. Nakon ispiranje u jažice je dodano 50 µL supstrata A i po 50 µL supstrata B te dodatno inkubirano 20 minuta na 37 °C. Za prekid reakcije dodana je stop otopina (50 µL). Apsorbancija ( $\lambda=450$  nm) je mjerena pomoću čitača mikrotitarskih pločica te je preko standardne krivulje izračunata koncentracija HSP70.

Za HSP90 standard i uzorci su dodani u odgovarajuće jažice po 100 µL. Mikrotitarska pločica s uzorcima inkubirana je 90 min na 37 °C. Nakon ispiranja jažica s puferom za ispiranje (2x) dodano je 100 µL biotin-obilježenog antitijela i inkubirano 60 min na 37 °C. Nakon inkubacije i ponovnog ispiranja jažica (3x), dodano je 100 µL otopine SABC (sadrži HRP-streptavidin) te je pločica inkubirana 30 min na 37 °C. Jažice su potom ispirane 5 puta, te je dodano 90 µL supstrata TMB uz inkubaciju u mraku na 37 °C 15-ak minuta. Po završetku inkubacije reakcija je zaustavljena dodatkom 50 µL stop otopine te je apsorbancija izmjerena na  $\lambda=450$  nm pomoću mikročitača (Ao Absorbance Microplate Reader, Azure Biosystems, SAD).

### **3.2.11. Određivanje koncentracije MMP-2 MMP-9**

Koncentracija MMP-2 i MMP-9 u nadialogu tumorskih stanica određena je pomoću ELISA kita Mouse MMP-2 ELISA Kit i Mouse MMP-9 ELISA Kit proizvođača Chongqing Biospes Co., Ltd, Biospes, (Kina) prema napatku proizvođača. Ova metoda temelji se na sendvič ELISA tehnici. Anti-MMP-2 ili anti-MMP-9 poliklonalna protutijela prethodno su nanesena na pločicu od 96 jažica. Biotin konjugirana anti-MMP-2 i anti-MMP-9 poliklonalna protutijela su korištena za otkrivanje vezanih metaloproteinaza. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 100 µL standarda, uzorka i kontrole po označenom redosljedu. Slijedi inkubacija na 37 °C kroz 90 min pri čemu dolazi do vezanja MMP-2 ili MMP-9 za imobilizirano protutijelo. Nakon uklanjanja sadržaja svih jažica dodano je 100 µL Biotin-konjugiranog anti-mišjeg MMP-2 ili MMP-9 protutijela u sve jažice i uzorci su inkubirani na 37 °C kroz 60 min. Nakon ispiranja jažica puferom za ispiranje dodano je 100 µL ABC (avidin-biotin-peroksidaza) kompleksa te su uzorci inkubirani na 37 °C kroz 30 min. Slijedi ponovno ispiranje (5x) uzoraka sa puferom za ispiranje te dodatak 100 µL TMB supstrata radi vizualizacije HRP enzimske reakcije i stvaranje plavog obojenja uz inkubaciju na 37 °C u mraku tijekom 30 min. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 0,1 mL stop otopine u svaku jažicu prilikom čega obojenje postaje žuto. Intenzitet žutog obojenja proporcionalan je s količinom mišje MMP-2 ili MMP-9 vezanog na početku reakcije. Vrijednosti

apsorbancije je očitana na 450 nm na mikročitaču Microplate reader Model 550, tvrtke Bio-Rad. Standard za MMP-e je napravljen prema napatku proizvođača u rasponu koncentracija od 0 pg/mL do 20000 pg/mL, dok je standard za određivanje MMP-9 bio u rasponu koncentracija od 0 pg/mL do 5000 pg/mL. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbcije o koncentraciji standardne otopine MMP-2 ili MMP-9 određena je jednadžba pravca prema kojoj je izračunata vrijednost traženih koncentracija MMP-2 ili MMP-9 u ispitivanim uzorcima te iskazana kao pg/mL. Uzorci su rađeni u triplikatu. Osjetljivost ovog ELISA kompleta za određivanje koncentracije mišjeg MMP-2 je < 10 pg/mL, dok je za MMP-9 <20 pg/mL.

### ***3.2.12. Određivanje koncentracije VEGF-a***

Za određivanje koncentracije čimbenika VEGF korišten je mišji komplet *VEGF Quantikine*<sup>®</sup> ELISA kit (R&D Systems, Inc., SAD). Sve otopine, standardi, kontrole i uzorci su pripremljeni prema napatku u kompletu. Ukratko, u svaku jažicu je dodano 50 µL otopine RD1N a potom u odgovarajuće jažice je nanešen standard, kontrola ili odgovarajući uzorak, u volumenu od 50 µL. Inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja je dodano 100 µL mišjeg konjugata VEGF-a u jažice i ponovno inubirano tijekom 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, dodana je otopina supstrata (100 µL) i inkubirana 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Za zaustavljanje reakcije dodana je „Stop“ otopina (100 µL). Vrijednosti apsorbcije očitana je pri 450 nm uz korekciju valne duljine pri 540 nm. VEGF standard (500 pg/mL) iz kompleta otopljen je sa "Calibrator Diluent RD5T" puferom u rasponu koncentracija od 0 do 250 pg/mL. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbcije o koncentraciji standardne otopine VEGF-a određena je koncentracije VEGF-a u ispitivanim uzorcima te iskazana u pg/mL.

### ***Pokazatelji imunomodulatorne aktivnosti i polarizacije makrofaga***

Ključna molekula u regulaciji interakcije stanica tumorskog mikrookoliša je dušikov oksid (NO). Dušikov oksid je unutar i vanstanična signalna molekula bitna za brojne biološke procese uključujući vazodilataciju, neurotransmisiju i imunost posredovanu makrofazima. Sve tri izoforme obitelji dušik oksid sintaza [NOS; inducibilna (iNOS), endotelna (eNOS) i neuronalna (nNOS)] mogu biti uključene u promociju ili inhibiciju onkogeneze. NO može imati tumorocidnu

ulogu, inhibiciju rasta tumora i smanjenje plućnih metastaza ali može biti uključena i u terapijsku rezistenciju, preživljavanje stanica, angiogenezu i proliferaciju tumora.

Razina NO je ključna i u polarizaciji makrofaga, visoka razina NO doprinosi smanjenju M2 makrofaga i indukcija M1 makrofaga (iNOS). Izolacija makrofaga i praćenje makrofagne polarizacije napravljeno je prema radu (Oršolić i sur., 2016.; Oršolić i sur., 2020.) mjerenjem razine NO i arginazne aktivnosti (Arg-1).

### ***3.2.13. Mjerenje koncentracije NO po Griessu***

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

Slezena je izvagana i homogenizirana protiskivanjem kroz Miracloth mrežicu (Falcon) sa špatulom, te ispiranjem stanica slezene s mrežice s fiziološkom otopinom do 5 mL. Stanična suspenzija je potom raspršena nekoliko puta kroz iglu i špricu kako bismo što bolje razdvojili stanice, a potom propasirane stanice prebacili u epruvete i sve ih izjednačili do 6 mL s fiziološkom otopinom. Leukocitne stanice su izdvojene iz stanične suspenzije pomoću 3 mL limfoprepa u sterilnim uvjetima u laminaru Cleanroom Technology, tvrtke Klima oprema. Na 3 mL limfoprepa pod kutem od 180° nadslojili smo navedenih 6 mL stanične suspenzije i centrifugirali na 2200 rpm, 20 minuta i pri temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja, prsten stanica leukocita je izdvojen pipetom i prebačen u novu epruvetu te ispran s fiziološkom otopinom ponovnim centrifugiranjem na 2200 rpm, 10 minuta i pri temperaturi od 4 °C. Nastali talog stanica resuspendirali smo u 1 mL DMEM medija s 10% FBS-a i prebacili u jažicu pločice s 24 polja. Nakon inkubacije stanica u inkubatoru NAPCO® Model 5415 IR na 37 °C i pri 5% protoku CO<sub>2</sub> tijekom 3 sata, pažljivo samo uklonili hranjivi medij iz svake jažice, te ih lagano isprali s fiziološkom otopinom kako bismo odvojili neadherirane stanice i ponovno dodali 1 mL DMEM medija s 10% FBS-a i sa i/ili /bez 0,1 µg/mL LPS-a po jažici. Adherirane stanice makrofaga su inkubirane sljedećih 24 sata pri 37 °C i pri 5% protoku CO<sub>2</sub>. Nakon inkubacije, prebacili smo cijeli nadtalog iz svake pojedine jažice u Eppendorf epruvetu i pohranili na -20 °C, za daljnju analizu NO i Arg-1.

#### **3.2.13.2. Izolacija i priprema tumorskog tkiva za analizu NO i Arg1**

Uzorci tkiva tumora izolirani su i pohranjeni na -80 °C do pripreme za analize NO i Arg1. Sedam dana nakon pohrane, odvagano je 75 - 100 mg tkiva u Eppendorf epruvetu u koju je dodan fosfatni pufer, PBS (Lonza, Švicarska) u omjeru 1:10. Uzorci su potom sonificirani ultrazvučnim

homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka). Dobiveni homogenati su centrifugirani uporabom ultracentrifuge Mikro 200R (Hettich, Njemačka) na 15000 okretaja kroz 15 min pri 4 °C. Nakon centrifugiranja dobiveni nadtalog je odvojen u čistu Eppendorf epruvetu i razrijeđen 10 puta s PBS-om. Tako pripremljeni uzorci pohranjeni su na -80 °C do analize.

### **3.2.13.3. Određivanje dušikova (II) oksida (NO) indirektnom metodom po Griess-u**

Korišten je kit *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD), koji za analizu nitrita koristi 1% otopinu sulfanilamida pripremljenu u 5% fosfornoj kiselini i 0,1% otopinu N-1-naftiletilediamin dihidroklorida (NED) pripremljenu u vodi. Ovaj sustav otkriva ione nitrita u različitim biološkim i eksperimentalnim tekućinama poput plazme, seruma, urina i medija za kulturu tkiva pri čemu osjetljivost nitrita ovisi o vrsti tekućine, a granica detekcije je 2,5 µM (125 pmol) nitrita (u ultračistoj, deioniziranoj, destiliranoj vodi). Također bolja osjetljivost postiže se kada se ta 2 reaktanta dodaju odvojeno, budući da se otopine sulfanilamida i NED-a međusobno natječu za ione nitrita u Griessovoj reakciji (Fiddler, 1977.). Radi bolje kvantifikacije iona nitrita potrebno je pripremiti referentne krivulje standardne otopine nitrita, koristeći pri tom isti pufer ili otopinu u kojoj su i ispitivani uzorci.

Postupak se temelji na dodavanju 50 µL svakog uzorka u jažice (triplikat) na 96 mikrotitarskoj pločici. Nakon toga dodano je 50 µL otopine sulfanilamida i inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla. Po isteku inkubacije, dodano je 50 µL otopine NED i ponovno inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla. Nakon druge inkubacije pojavljuje se ružičasto obojenje uzoraka u jažicama koja potječe od nastalog azo spoja. Vrijednost apsorbancije mjerene su na 540 nm na mikročitaču ploče iEMS Reader MFtvrtke Labsystems. Za pripremu standardne otopine korišten je 0,1 M natrijev nitrit otopljen u vodi u koncentracijama od 0 do 100 µM. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine nitrita određena je jednadžba pravca. Koristeći Lambert-Beerov zakon ( $A = \log (P_0/P) = \epsilon \times b \times c$ ), iz jednadžbe pravca izračunali smo vrijednosti traženih koncentracija nitrita u ispitivanim uzorcima te smo ih iskazali kao µM.

### ***3.2.14. Određivanje koncentracije arginaze 1***

Arginaza je ključna hidrolaza u ciklusu uree koja hidrolizira L-arginin u ureu i L-ornitin. Obadvije izoforme arginaze sisavaca, arginaza 1 (Arg1) i arginaza 2 (Arg2), pojačano su uključene u različitim vrstama karcinoma, te imaju ključnu ulogu u regulaciji rasta tumora i metastaza kroz različite mehanizme kao što je regulacija metabolizma L-arginina, i utjecaj na tumorsko imunološko mikrookruženje. Temeljem navedenog farmakološki utjecaj na metabolizam L-arginina predstavlja novi pristup u liječenju tumora, autoimunih bolesti ili neželjenih imunih poremećaja te su važan cilj u terapiji tumora.

Razina arginaze mjerena je u tumorskom tkivu, slezeni i bubregu. Mjerenje razine aktivnosti arginaze iz uzoraka tkiva napravljeno je pomoću ELISA kompleta (Arginase activity assay kit MAK112, Sigma-Aldrich, SAD) za arginazu koji se temelji na konverziji L-arginina do uree i ornitina. Nastala urea specifično reagira sa supstratom pri čemu nastaje obojenje koje je proporcionalno aktivnosti arginaze. Jedna jedinica arginaze predstavlja količinu enzima dovoljnu za konverziju 1  $\mu\text{M}$  L-arginina do ornitina i uree u minuti pri pH od 9,5 i temperaturi od 37 °C. Standardna radna otopina uree pripravljena je dodavanjem 24  $\mu\text{L}$  uree standarda (50 mg/dL) i 176  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  kako bi se dobila 1 mM standardna radna otopina uree.

U mikrotitarsku pločicu dodano je 40  $\mu\text{L}$  uzorka u duplikatu s time da je dodano isto toliko uzoraka u duplikatu kao slijepa proba. Isti volumen je dodan u jažice za standardnu radnu otopinu uree i  $\text{dH}_2\text{O}$ . Nakon toga je dodano u svim uzorcima, osim uzoraka slijepe probe, 5x razrijeđenog supstratnog pufera dobivenog miješanjem 8  $\mu\text{L}$  arginin pufera sa 2  $\mu\text{L}$  otopine Mn, nakon čega je slijedila inkubacija od 2 sata pri 37 °C. Prije isteka dvosatne inkubacije, pripremljen je urea reagens dobiven miješanjem već gotovih reagensa A i reagensa B (100  $\mu\text{L}$  reagensa A i 100  $\mu\text{L}$  reagensa B pripremljenih u kitu). Po isteku inkubacije, kako bi se zaustavila reakcija dodano je 200  $\mu\text{L}$  urea reagensa u svaku jažicu uključujući i uzorke slijepe probe. Potom je dodano 10  $\mu\text{L}$  5x razrijeđenog supstratnog pufera u uzorke slijepe probe, te je provedena inkubacija od 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija na 430 nm na uređaju Ao Absorbance Microplate Reader (proizvođač: Azure Biosystems, SAD).



Aktivnost arginaze određena je pomoću sljedeće formule:

$$\text{Aktivnost arginaze} = \frac{[A(\text{uzorka}) - A(\text{prazne jažice})]}{[A(\text{standarda}) - A(\text{vode})]} \times \frac{[1 \text{ mM} \times 50 \times 10^3]}{(V \times T)}$$
 gdje je T vrijeme reakcije u minutama, V volumen uzorka dodan u jažice, 1 mM koncentracija standarda ureje, 50 reakcijski volumen, a  $10^3$  konverzijski čimbenik mM u  $\mu\text{M}$ .

### ***Pokazatelji antioksidacijske/prooksidacijske aktivnosti***

#### ***3.2.15. Izolacija i priprema tkiva***

Izolirana tkiva jetra, bubreg, slezena i tumor pohranjena su na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  do pripreme za analizu. Tjedan dana nakon pohrane, odvagano je 75-90 mg tkiva u eppendorf epruvetu, dodan fosfatni pufer, PBS (Biogmost, Hrvatska), u omjeru 1:10 i uzorci su sonificirani ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka). Dobiveni homogenati su centrifugirani (ultracentrifuga Mikro 200R, Hettich, Njemačka) pri 15000 rpm/15 min/+4  $^\circ\text{C}$ . Dobiveni nadtalog je odvojen u čistu eppendorf epruvetu te razrijeđen 10 puta s PBS-om (100  $\mu\text{L}$  nadtaloga i 900  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera). Svi uzorci pohranjeni su na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  do analize.

#### ***3.2.16. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u***

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

Uzorci nadtaloga (duplikat) su razrijeđeni u PBS-u. U epruvete je dodano kako slijedi: 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 3), inkubacija 10 min na sobnoj temperaturi (RT, engl. *room temperature*). Nakon toga dodano je 200  $\mu\text{L}$  otopine E, potom sve vorteksirano (VortexGenius 3, IKA, SAD) i inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Količina proteina određena je na spektrofotometru mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm

(Libra S22, Biochrom, UK). Kao standard upotrebljen je albumin govedeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA, Sigma-Aldrich, Njemačka) u koncentracijama od 2 mg/mL prema manjim koncentracijama (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 i 0 mg/mL). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentracije BSA određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentraciju proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli:

$c = [(A_{uzorka} - b_{st.krivulje}) / \text{nagib pravca standardne krivulje}] \times \text{razrijeđenje}$ . Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL.

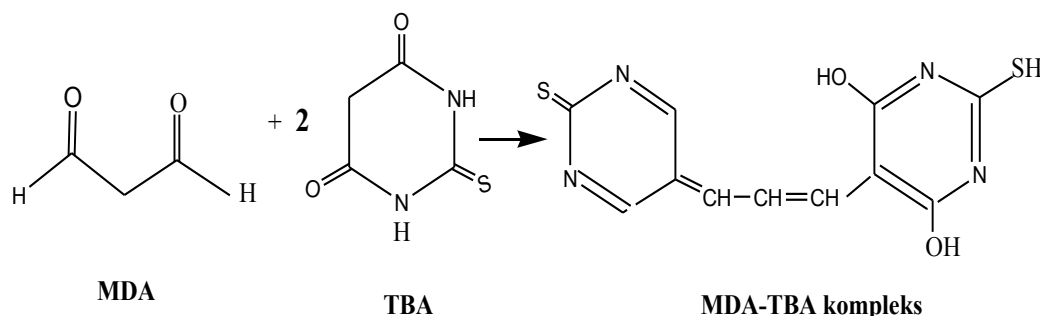
**Tablica 3.** Priprema otopina za određivanje proteina po Lowry-u

<b>Otopina D</b>	Pomiješati otopine u omjeru 48:1:1 (A:B:C)  <b>A: 2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH</b>  9,6 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 480 mL 0,1M NaOH  <b>B: 1% (w/v) natrij-kalij tartarat u dH<sub>2</sub>O</b>  0,1 g natrij-kalij tartarat + 10mL dH <sub>2</sub> O  <b>C: 0,5% (w/v) CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O u dH<sub>2</sub>O</b>  0,05 g CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O + 10 mL dH <sub>2</sub> O
<b>Otopina E</b>	Pomiješati Folin i Ciocalteu's fenol reagens i dH <sub>2</sub> O u omjeru 2:1

### **3.2.17. Mjerenje razine lipidne peroksidacije**

Razina lipidne peroksidacije određena je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (2007.). Metoda se temelji na određivanje koncentracije MDA u tkivu kroz reakciju MDA s

2-tiobarbituratnom kiselinom (thiobarbituric acid, TBA) stvarajući kompleks MDA – TBA koji daje crveno obojenje te je njegova koncentracija spektrofotometrijski mjerljiva pri valnoj duljini od 532 nm (Libra S22, Biochrom, UK). MDA je stabilni produkt u kaskadi reakcija slobodnih radikala s nezasićenim masnim kiselinama u procesu lipidne peroksidacije. Princip ove metode se zasniva na sljedećoj reakciji (Slika 24):



**Slika 24.** Mehanizam reakcije TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom. Preuzeto i prilagođeno prema Weitner i sur., 2016.

U eppendorf epruvetu stavljeno je 100  $\mu$ L nadtaloga uzorka i 1,6 mL reagensa A (Tablica 4) te stavljeno u vodenu kupelj na 95  $^{\circ}$ C/60 minuta. Nakon toga uzorci su naglo ohlađeni na ledu prilikom čega su se nastale folikule slegnule na dno. Nadtalog je odvojen i izmjerena je apsorbancija na 532 nm (Libra S22, Biochrom, UK). Ukupna koncentracija MDA izračunata je prema formuli:  $c = (A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese}) / (\epsilon \times V_{uzorka} \times C_{proteina\ uzorka})$  te je izražena kao nmol MDA po mg proteina.

**Tablica 4.** Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

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

### **3.2.18. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)**

Koncentraciju ukupnog glutationa određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969.). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) koja apsorbira pri valnoj duljini 405-414 nm. Osim TNB, stvara se i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanka TNB proporcionalna je recilirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Koncentracija ukupnog GSH mjerena je u jetri, bubregu i tkivu tumora u 96-mikrotitarskoj pločici. U jednu jažicu dodano je 20 µL razrijeđenog uzorka, 40 µL 0,035 M HCl i 40 µL 10 mM DTNB. Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 415 nm (Microplate reader Model 550, Bio-Rad, SAD). Zatim je dodano 100 µL otopine GR i NADPH te je mjerena promjena apsorbancije tijekom 5 min. Priprema navedenih otopina prikazana je u Tablici 5. Za standard korištena je koncentracija reduciranog GSH (0-100 µM). Nacrtani su pravci za sve standarde kao promjena

apsorbancije u vremenu, očitani su nagibi pravaca. Nacrtno je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema sljedećoj formuli:

$c = [(nagib\ pravca\ uzorka - nagib\ pravca\ slijepa\ probe) / nagib\ pravca\ standarda] \times razrijeđenje.$

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

**Tablica 5.** Priprema otopine za određivanje koncentracije GSH\*

0,5 M pufer PBS	17 mL 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O i (3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O i dH <sub>2</sub> O do 17 mL)  183 mL 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O (65,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12 H <sub>2</sub> O i dH <sub>2</sub> O do 183 mL)
0,5 M EDTA	37,2 g EDTA u 200 mL dH <sub>2</sub> O
0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA	200 mL 0,5M PBS + 200 mL 0,5M EDTA
0,035 M HCl	7 mL 0,1 HCl u dH <sub>2</sub> O do 200 mL
10 mM DTNB	20 mg DTNB i 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 5 mL
0,8 mM NADPH	6,67 mg NADPH i 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 10 mL
Mješavina GR	20 µL GR (50 U/mL) u 9980 µL 0,8 mM NADPH

\*Korištene su kemikalije proizvođača Sigma-Aldrich, Njemačka: GR - Glutation-reduktaza iz pekarskog kvasca (*S. cerevisiae*), 100-300 jedinica (units)/mg protein (biuret)); EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub> · 2H<sub>2</sub>O), Mr = 372,24 g/mol; DTNB, Mr = 396,35 g/mol; NADPH, Mr = 833,35 g/mol.

### 3.2.19. Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze određena je prema količini potrošenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984.). U reakcijsku smjesu u kivetu ukupnog volumena 1 mL dodano je 980 µL 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je uzorak odgovarajućeg razrijeđenja. Nakon toga na spektrofotometru (UV-160, Shimadzu, Japan) mjereno je smanjenje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri 240 nm tijekom jedne minute. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon = 39,4 \text{ mM/cm}$ ) prema formuli:  $c = (A_{uzorka} / (\epsilon H_2O_2 \times l)) \times \text{razrijeđenje}$ , gdje je  $l$  jednak

putu koji zraka svijetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm. Rezultat je izražen kao U/mg proteina što odgovara  $\mu\text{mol}$  razgrađenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  po minuti po miligramu proteina.

## ***Pokazatelji razine oštećenja***

### ***3.2.20. Histološka analiza tumora***

Nakon žrtvovanja životinja, tumorska masa Erlichova solidnog tumora (solidni EAT) je odstranjena s područja mišjeg bedra te je dio tumorskog tkiva stavljen u 10% puferirani formalin na 48 h za histokemijsku analizu. Rutinskim laboratorijskim postupkom koji se provodi u automatiziranom uređaju (histokinetu) tkivo je kroz uzlaznu seriju alkohola te zamjenskog ksilena uklopljeno u parafin. Iz dobivenih parafinskih kocki tumorskog tkiva izrezani su tkivni rezovi debljine 3–5  $\mu\text{m}$ , postavljeni na predmetno stakalce te obojeni hematoksilinom i eozinom (HE) za histološki pregled.

#### **3.2.20.1. Imunohistokemijsko bojenje tumorskog tkiva**

Postupak imunohistokemijskog bojenja (IHC) proveden je u automatiziranom uređaju Dako Autostainer Link 48. Kit koji smo koristi za vizualizaciju vezanja primarnog protutijela (EnVision™ FLEX/HRP komplet za detekciju, Dako, Danska K8000) sadrži 3 u 1 pufer za demaskiranje antigena (pH 9,0), sekundarno protutijelo, kromogen i PBS pufer za ispiranje.

Za postupak imunohistokemijskog bojenja izrezano je nekoliko tkivnih rezova koji su stavljeni na pozitivno nabijena stakalca. Potrebno demaskiranje antigena provedeno je termičkom obradom kuhanjem tkivnih rezova u PTLINK modulu upotrebom Dako 3 u 1 puferu pri čemu se tkivo istovremeno deparafinira i dolazi do oslobađanja antigena. Nakon hlađenja u PBS puferu provodi se imunohistokemijska analiza upotrebom primarnih protutijela: 1. Hipoksijom inducirani faktor-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ , zečje poliklonalno protutijelo, razrjeđenje 1:100; ABclonal, kat br. A16873); 2. Inducibilna sintaza dušikovog oksida (iNOS, zečje poliklonalno protutijelo, razrjeđenje 1:120; Abcam, kat br. ab3523); 3. Jezgrin biljeg proliferirajućih stanica (PCNA, mišje monoklonalno protutijelo, 1:100; Dako, kat. br. M0879). Primarna antitijela protiv HIF-1 $\alpha$  i PCNA nakapana su na tumorsko tkivo u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi, dok je iNOS primijenjen preko noći na

4 °C. Potom je tkivo isprano PBS puferom te primjenjeno sekundarno protutijelo u trajanju od 45 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja primjenom DAB kromogena (10 minuta) nastaje smeđe obojenje na mjestu nastalog kompleksa što omogućava vizualizaciju imunohistokemijske reakcije. Tkivni rezovi su kontrastno obojeni hematoksilinom, dehidrirani i poklopljeni.

### **3.2.20.2. Analiza uzoraka**

Kvantitativne informacije o imunohistokemijskoj reakciji izražene su kao postotak pozitivno obojenog područja, intenzitet smeđe mrlje u pozitivnim područjima i morfološke karakteristike. Budući da su istraženi proteini HIF-1 $\alpha$  i iNOS pokazali sveprisutnu raspodjelu u svim stanicama, upotrijebili smo digitalnu analizu slike za kvantificiranje intenziteta IHC bojenja (Fu i sur., 2015.). Najmanje deset digitalnih fotografija svakog IHC uzorka tkiva snimljeno je svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 200x, a digitalna analiza provedena je korištenjem softvera Zeiss ZEN 2.3 Lite. U mikroskopskim slikama, boja svakog piksela sastoji se od tri 8-bit jednobojna kanala (crveni, zeleni i plavi; RGB, od engl. *Red, Green, Blue*) što rezultira 24-bit slikom u boji. Područja kancerogenih tkiva koja pokazuju pozitivnu imunohistokemijsku reakciju imaju smeđu pigmentaciju. Medijan intenziteta RGB signala očitao je na potpuno snimljenoj slici pomoću opcije Histogram u programu, a medijan intenziteta je zabilježen za svaku pojedinačnu boju RGB spektra. Smeđa boja sastoji se uglavnom od crvene, ali također i dijela zelene, kao i plave kontrastne boje, pa smo upotrijebili matematičku jednadžbu koju su objavili Fu i sur. (2015.) za rješavanje problema preklapanja spektra boja mrlja. Koristili su ovaj matematički model za pretvaranje RGB slika u 8-bit BN slike pomoću formule  $BN = \text{Plavo} - \alpha \times \text{Crveno} - \beta \times \text{Zeleno}$ . Prema njihovom radu, kada je omjer  $\alpha$  prema  $\beta$  dva, slike proizvode bolji kontrast između smeđih tkiva obojenih DAB-om i plavih tkiva obojenih hematoksilinom. Stoga smo koristili  $\alpha = 0,5$  i  $\beta = 0,25$ . Većina DAB obojenih piksela ima niske BN vrijednosti, koje su niže kako smeđa boja postaje tamnija.

### **3.2.20.3. Određivanje gustoće krvnih žila u tumorskom tkivu**

Gustoća malih krvnih žila (MVD, engl. *Microvessel Density*) određena je Weidnerovom metodom (Weidner, 1995.). Broj krvnih žila izbrojan je u oko 20 žarišnih polja u čitavom



području tumora, pri povećanju od 200x na mikroskopu Zeiss Axio Star s vidnim poljem od 1 mm.

### **3.2.21. Statistička analiza**

Za procjenu minimalne veličine uzorka potrebne za eksperiment korištena je STATA 13.1 (StataCorp. 2013. Stata Statistical Software: Izdanje 13. College Station, TX: StataCorp LP.). Korištenjem neparametarskog Kruskal-Wallisovog testa zbroj vrijednosti s alfa razinom od 0,05, razinom snage od 0,8, veličinom učinka od 0,22, procijenjena minimalna veličina uzorka bila je 15 miševa po skupini. Statističke analize provedene su pomoću softvera STATISTICA 13 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD), a podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SP) srednje vrijednosti. Kruskal-Wallis ANOVA testom analizirani su svi podaci i napravljene su daljnje analize razlika između skupina s višestrukim usporedbama srednjih vrijednosti za sve skupine. Podaci su smatrani značajnim pri  $p < 0,05$ . Prema Kaplan-Meierovoj metodi (Kaplan i Meier, 1958.) napravljena je krivulja preživljavanja, a usporedba između krivulja preživljavanja određena je log-rank testom ( $\alpha = 5\%$ ) (Mantel i Haenszel, 1959.).

## § 4. REZULTATI

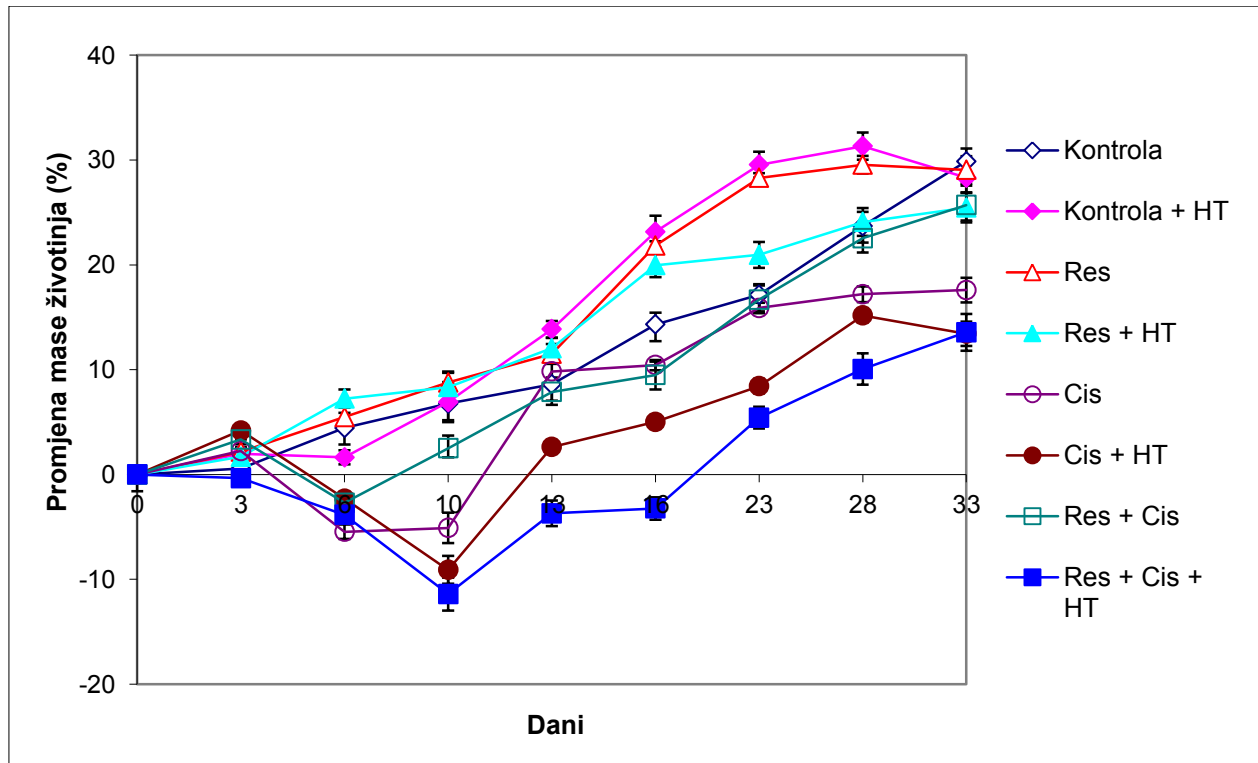
### 4.1. PROTUTUMORSKE I ANTIANGIOGENE ZNAČAJKE KOMBINACIJE RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-a

Brojni literaturni podaci ukazuju da resveratrol (3,5,4-trihidroksi-trans-stilben) inhibira sve tri razine u procesu karcinogenze: inicijaciju, promociju i progresiju tumora (Elshaer i sur., 2018.). Protutumorski učinak resveratrola uključuje proapoptotičko, anti-proliferativno, protuupalno i antiangiogenetsko djelovanje. Nadalje, resveratrol sudjeluje u regulaciji razine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), modulaciji signalnih putova, aktivaciji apoptoze i inhibiciji staničnog ciklusa. Također, potvrđen je i njegov sinergistički učinak s brojnim kemoterapeutskim lijekovima, uključujući cisplatinu, na stanice tumora te zaštitu normalnih stanica, međutim nepoznata je njegova uloga u procesu kemosenzitacije u hipertermijskim uvjetima. Temeljem navedenog, zanimalo nas je može li resveratrol, primijenjen sa i/ili bez sustavnog izlaganja hipertermiji, pojačati učinak cisplatine moduliranjem aktivnosti HDAC i razina HSP70 i HSP90, te tako pridonijeti izravnoj toksičnosti na tumorske stanice, inhibiciji angiogeneze i rasta tumora, te posljedično produžiti životni vijek Balb/c miševa nositelja solidnog oblika EAT-a.

#### *4.1.1. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na tjelesnu masu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a*

U bolesnika i životinja cisplatina uzrokuje izražene nuspojave koje povećavaju morbiditet i narušavaju kvalitetu života. Trenutno je prijavljeno oko 40 nuspojava cisplatine (Florea i sur., 2011.) , uključujući poremećaje gastrointestinalnog sustava povezane s akutnom i odgođenom mučninom i povraćanjem, zastojem u želucu, smanjenim unosom hrane i naknadnim gubitkom težine. U cilju praćenja posljedica povezanih s citotoksičnošću cisplatine, tjelesna težina svakog miša mjerena je od 0. do 33. dana tijekom eksperimentalnog razdoblja. Iako je cisplatina primijenjena u relativno niskim dozama (2,5 ili 5 mg/kg), uočeno je značajno smanjenje težine životinja u skupinama izloženim cisplatinu i hipertermiji sa i/ili bez resveratrola (Res + Cis + HT i Cis + HT), što ukazuje na izraženiji toksični učinak cisplatine u hipertermijskim uvjetima (Slika

25). U kontrolnoj skupini te skupinama kontrola + HT, Res, Res + HT ili Cis + Res nije bilo promjena u težini životinja, što ukazuje da resveratrol smanjuje toksične učinke cisplatinu u fiziološkim uvjetima.



**Slika 25.** Promjene mase miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi ( $N=10$  po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatinu injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SP. Statistička razlika između skupina po danu: 13. Kontrola vs. Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Kontrola vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Res vs. Cis ( $p \leq 0,05$ ); Res vs. Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Res vs. Res + Cis ( $p \leq 0,01$ ); Res vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ); Res + HT vs. Cis ( $p \leq 0,01$ ); Res + HT vs. Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Res + HT vs. Res + Cis ( $p \leq 0,01$ ); Res + HT vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,001$ ); 16. Kontrola vs. Res + Cis ( $p \leq 0,05$ ); Kontrola vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Res vs. Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Res vs. Res + Cis ( $p \leq 0,05$ ); Res vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Res + HT vs. Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Res + HT vs. Res + Cis ( $p \leq 0,05$ ); Res + HT vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); 23. Res + HT vs. Cis ( $p \leq 0,05$ ); Res + HT vs. Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ); Res + HT vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,001$ ).

Kratice: Res - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatinu u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatinu u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### ***4.1.2. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na stopu preživljavanja i volumen tumora miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Gubitak težine nije bio povezan samo s toksičnošću cisplatine, već i s inhibicijom rasta tumora i povećanim preživljavanjem životinja (Slika 26 i 27). Obrada cisplatinom i resveratrolom u hipertermijskim uvjetima produžila je životni vijek miševa za oko 68% i smanjila rast tumora za oko 50% u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 6, Slika 26). U odnosu na kontrolnu skupinu obrada s Cis produžila je životni vijek (ILS%) miševa za 27,79%, dok je Cis + HT produžila životni vijek za 67,90%. Skupina obrađena cisplatinom 16. dana pokazala je inhibiciju rasta tumora (TVI) od 53% u usporedbi s kontrolom, dok je skupina obrađena cisplatinom i resveratrolom 16. dana pokazala inhibiciju od 51% u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na 33. dan skupina obrađena cisplatinom pokazala je inhibiciju rasta volumena tumora (TVI) od 41% u usporedbi s kontrolom, dok je skupina obrađena cisplatinom i resveratrolom pokazala inhibiciju od 52% u usporedbi s kontrolnom skupinom. Cis + HT skupina pokazala je najveći postotak inhibicije u usporedbi s drugim skupinama (približno 64% i 52%, 16. odnosno 33. dana). Za skupinu obrađenu s Res + Cis + HT, 16. dan TVI je bio 56,50% u usporedbi s kontrolom, a 42% 33. dana. Prema dobivenim podacima, Cis u kombinaciji s HT pokazala je bolji inhibicijski učinak na rast tumora (Slika 27), ali i veću toksičnost, što je smanjilo preživljenje životinja (Slika 26), dok u kombinaciji Res + Cis + HT, resveratrol je djelomično djelovao zaštitno ili imunomodulatorno. Međutim, treba naglasiti da između ove dvije skupine (Cis + HT i Res + Cis + HT) nije bilo razlike u srednjem vremenu preživljenja i %ILS. Dobivene vrijednosti srednjeg vremena preživljenja iznosile su  $51,11 \pm 6,28$  i  $51,30 \pm 6,37$ , a za %ILS 67,90% odnosno 68,52% (Tablica 6).

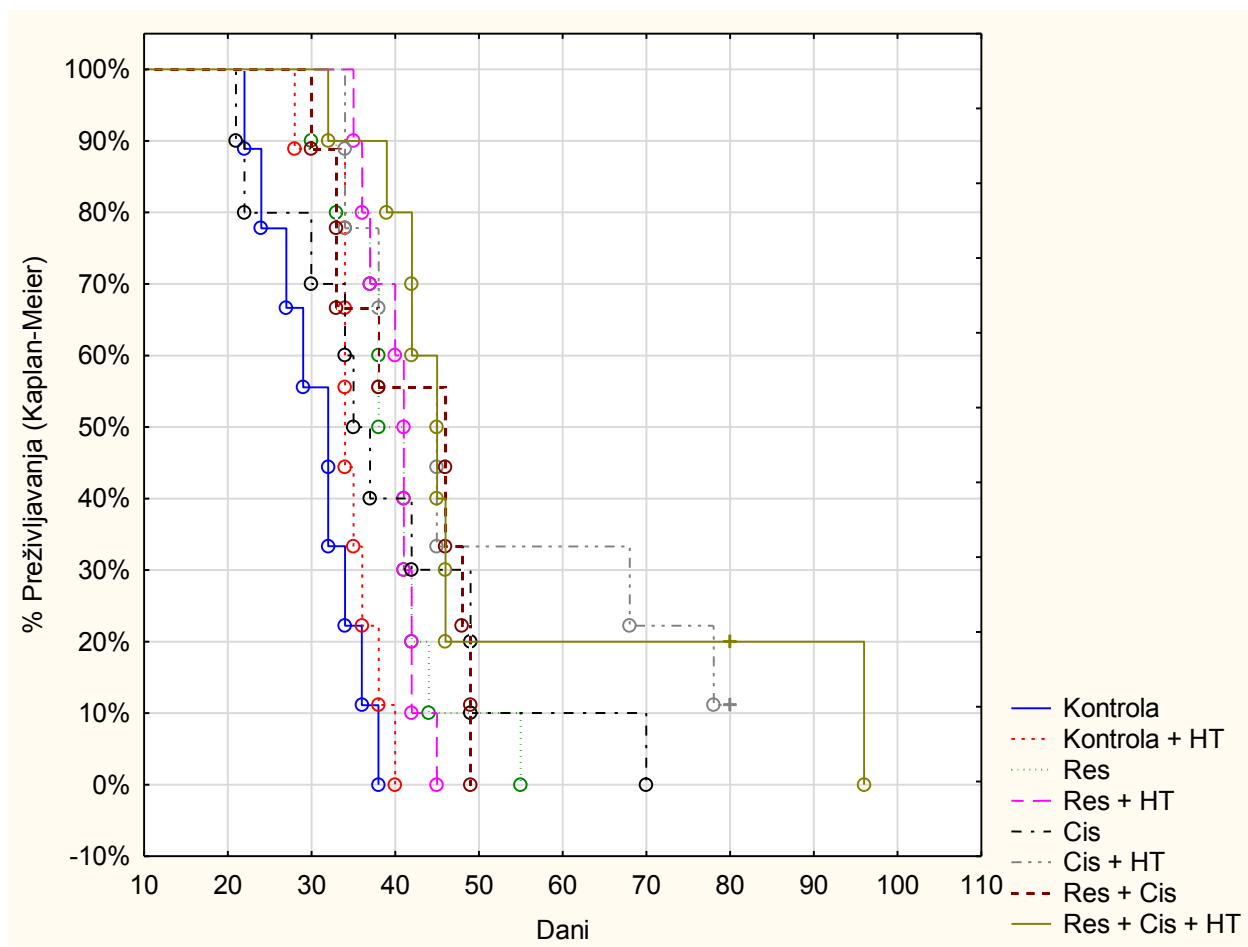
**Tablica 6.** Raspon preživljenja, srednje vrijeme preživljavanja i produljeni životni vijek (%) u miševa nositelja solidnog EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Pokusna skupina <sup>a</sup>	Raspon preživljavanja (dani)	Srednja vrijednost preživljavanja (SV±SP dani)	Median preživljavanja (dani)	Broj preživjelih životinja		Inhibicija rasta tumora (%TVI) vs. fiziološka kontrola		Inhibicija rasta tumora (%TVI) vs. hipertermalna kontrola		
				% T/C <sup>b</sup>	% ILS <sup>c</sup>	16 dan	33 dan	16 dan	33 dan	
Kontrola	22 - 38	30,44 ± 1,79	32,00	/	/	0	/	/	/	/
Kontrola + HT	28 - 40	34,77 ± 1,10	34,00	114,22	14,22	0	21,78	18,10	/	/
Res	30 - 55	39,90 ± 2,14	39,50	131,07	31,07	0	17,43	34,06	-5,56	19,48
Res + HT	35 - 45	40,00 ± 0,97	41,00	131,40	31,40	0	33,62	24,79	15,13	8,17
Cis	21 - 70	38,90 ± 4,60	36,00	127,79	27,79	0	52,77	41,95	39,62	29,12
Cis + HT	34 - 80	51,11 ± 6,28	45,00	167,90	67,90	1	64,02	51,59	54,01	40,89
Res + Cis	30 - 49	41,33 ± 2,59	46,00	135,77	35,77	0	51,26	52,87	37,69	42,45
Res + Cis + HT	32 - 96	51,30 ± 6,37	45,00	168,52	68,52	1	56,47	41,75	44,35	28,88

<sup>a</sup>Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=10) su obrađeni dozom od 50 mg/kg resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injiciran intraperitonealno (*ip*) nadozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± SP.  $bT/C\% = T/C \times 100$ ; T – prosječni dani preživljenja liječene skupine; C - prosječni dani preživljenja kontrolne skupine.  $c\%ILS$  (produženi životni vijek %) =  $(T-C)/C \times 100$ .

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

Tablica 6 jasno prikazuje inhibiciju volumena tumora 16. dana (odmah nakon terapije) i 33. dana (do kojeg je volumen tumora praćen) u usporedbi s fiziološkom i hipertermijskom kontrolnom skupinom. Preventivna obrada resveratrolom povećala je odgodu rasta tumora i preživljavanje životinja u miševa obrađenih cisplatinom (Slika 26, Slika 27 i Tablica 8). Stopa preživljavanja miševa nakon obrade s Res i/ili Cis u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima prikazana je Kaplan-Meierovom metodom (Slika 26) i analizirana long-rank testom (Tablica 7). Prema stopi preživljenja, najbolje ukupno preživljenje miševa primijećeno je nakon obrade s Res + Cis + HT u odnosu na kontrolu ili kontrolu + HT ( $p = 0,00233$  odnosno  $p = 0,00506$ ). Nedostatak razlike između Cis + HT i Res + Cis + HT također je potvrđen Kaplan-Meier analizom preživljenja; nije bilo statističke razlike između ovih skupina ( $p = 0,68082$ ). Osim usporedbe s kontrolnim skupinama (kontrola i kontrola + HT, Tablica 7), analizirali smo i odnos između ostalih skupina. Statistički značajna razlika primijećena je samo između skupina Res vs. Res + Cis + HT ( $p = 0,04231$ ) i Res + HT vs. Res + Cis + HT ( $p = 0,02158$ ) (podaci nisu pokazani u Tablici 7).



**Slika 26.** Kaplan-Meierova krivulja preživljavanja miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=10$ ) su obrađeni dozom od 50 mg/kg resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injiciran intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SP.

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

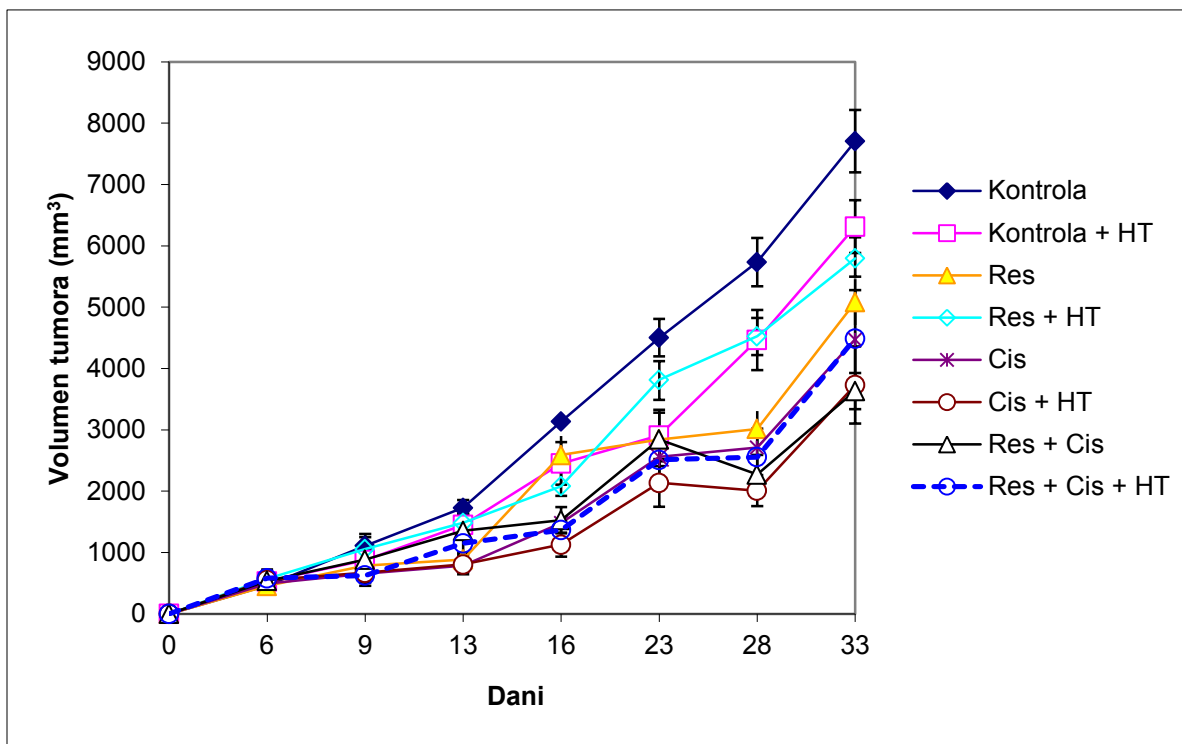
**Tablica 7.** Usporedba preživljenja miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Pokusne skupine <sup>a</sup>	%ILS Fiziološki uvjeti	%ILS Hipertermijski uvjeti	Kaplan-Meier analiza (log-rank test)	
			* <i>p</i>	<sup>◇</sup> <i>p</i>
Kontrola	-	-	-	0.1093
Kontrola + HT	14,22	-	0,1093	-
Res	31,07	14,75	0,00933	0,03685
Res + HT	31,40	15,04	0,00309	0,00659
Cis	27,79	11,88	0,08076	0,2149
Cis + HT	67,90	46,99	0,00541	0,01821
Res + Cis	35,77	18,87	0,01241	0,06584
Res + Cis + HT	68,52	47,54	0,00233	0,00506

<sup>a</sup>Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=10 po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injiciran intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Stope preživljenja izračunate su Kaplan-Meier metodom, a usporedba između krivulja preživljenja napravljena je log-rank testom ( $\alpha = 5\%$ ). \* Značajno različito u odnosu na kontrolu (log-rank test). <sup>◇</sup> Značajno različito u odnosu na kontrolu + HT (log-rank test).

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





**Slika 27.** Promjena volumena tumora miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi (N=10 po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SP.

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

**Tablica 8.** Promjena volumena tumora miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

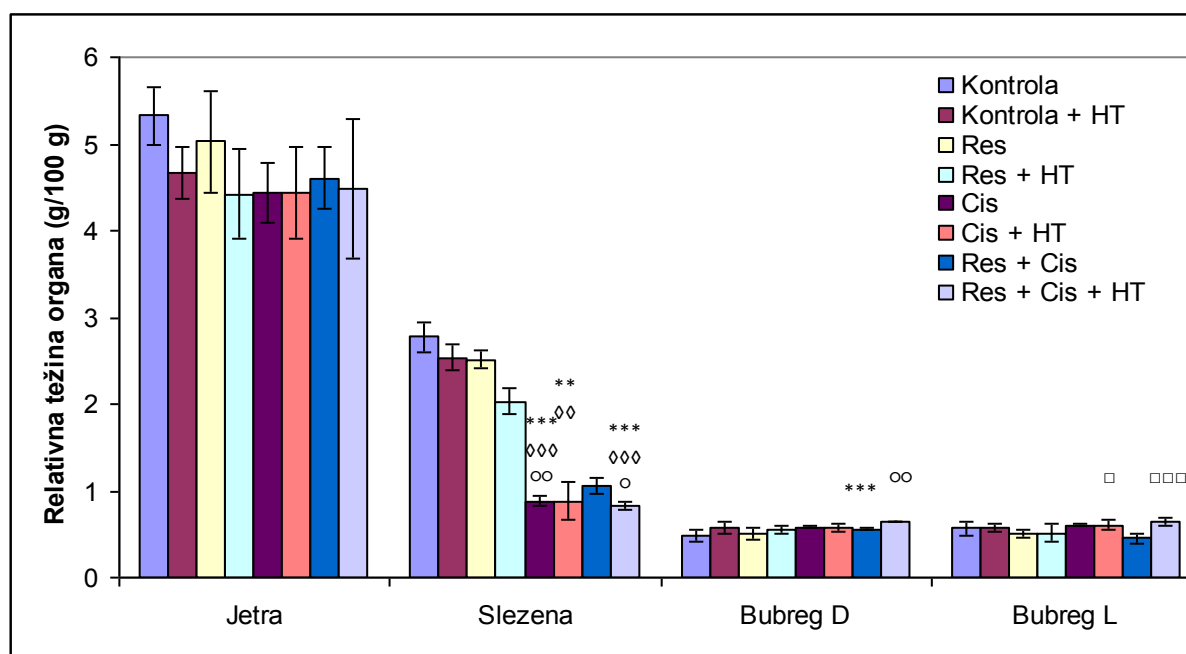
Pokusne skupine <sup>a</sup>	Volumen tumora (mm <sup>3</sup> )						
	Dani mjerenja (X± SP)						
	6 dan	10 dan	13 dan	16 dan	23 dan	28 dan	33 dan
Kontrola	461,84±84,94	1110,15±193,85	1728,64±126,43	3134,77±40,39	4501,44±305,83	5734,00±395,37	7705,72±507,3
Kontrola + HT	527,84±171,95	874,86±185,00	1449,03±171,14	2452,07±348,58	2906,80±419,93	4464,13±490,11	6310,85±430,27
Cis	494,36±62,15	657,35±144,95	787,59±113,26	1480,64±138,00	2557,37±405,68	2712,37±190,77	4473±753,09
Cis + HT	550,53±173,97	670,01±160,00	805,00±158,83	1127,75±197,03	2135,7±388,16	2008,4±251,21 <sup>*◊</sup>	3730,1±626,46
Res	454,67±79,32	787,59±121,13	886,37±103,32	2588,43±308,22	2842,33±199,77	3015,18±291,75	5081,5±373,13
Res + HT	570,32±68,96	1055,03±192,06	1483,11±156,17	2081±326,91	3815,77±305,17	4524,64±297,30	5795,28±342,80
Res + Cis	535,97±122,92	883,89±201,41	1351,71±134,90	1527,82±214,43	2842,20±435,64	2269,7±320,84	3631,6±294,89
Res + Cis + HT	581,63±112,61	625,5±169,44	1148±154,56 <sup>*</sup>	1364,53±169,29	2510,30±466,90	2554,8±465,65	4488,5±789,75

<sup>a</sup>Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi (N=10 po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± SP. <sup>\*</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ ); <sup>◊</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $p \leq 0,05$ ); <sup>Δ</sup> Statistički značajno u odnosu na Res + HT ( $p \leq 0,05$ )

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

### 4.1.3. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na promjenu relativne mase jetre, slezene i bubrega miševa nositelja solidnog oblika EAT-a

Rezultati promjene mase organa prikazani su kao relativna masa (g/100 g) vidljivi su na Slici 28. Rezultati pokazuju da nije došlo do promjene mase jetre dok su najveće promjene zapažene u slezeni, važnom limfatičkom i hematopoetskom organu, nakon obrade s Cis, Cis + HT i Res + Cis + HT u odnosu na kontrolne skupine ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,01$  i  $p \leq 0,001$ ). Nadalje, u slezeni je vidljiva značajna razlika između skupina Res vs. Cis ( $p \leq 0,01$ ) i Res vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ). U bubregu je vidljiva promjena između Res + Cis i kontrolne skupine ( $p \leq 0,001$ ) te između skupine Res vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ) te Res + Cis vs. Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ) i Res + Cis vs. Res + Cis + HT ( $p \leq 0,001$ ) (Slika 28).

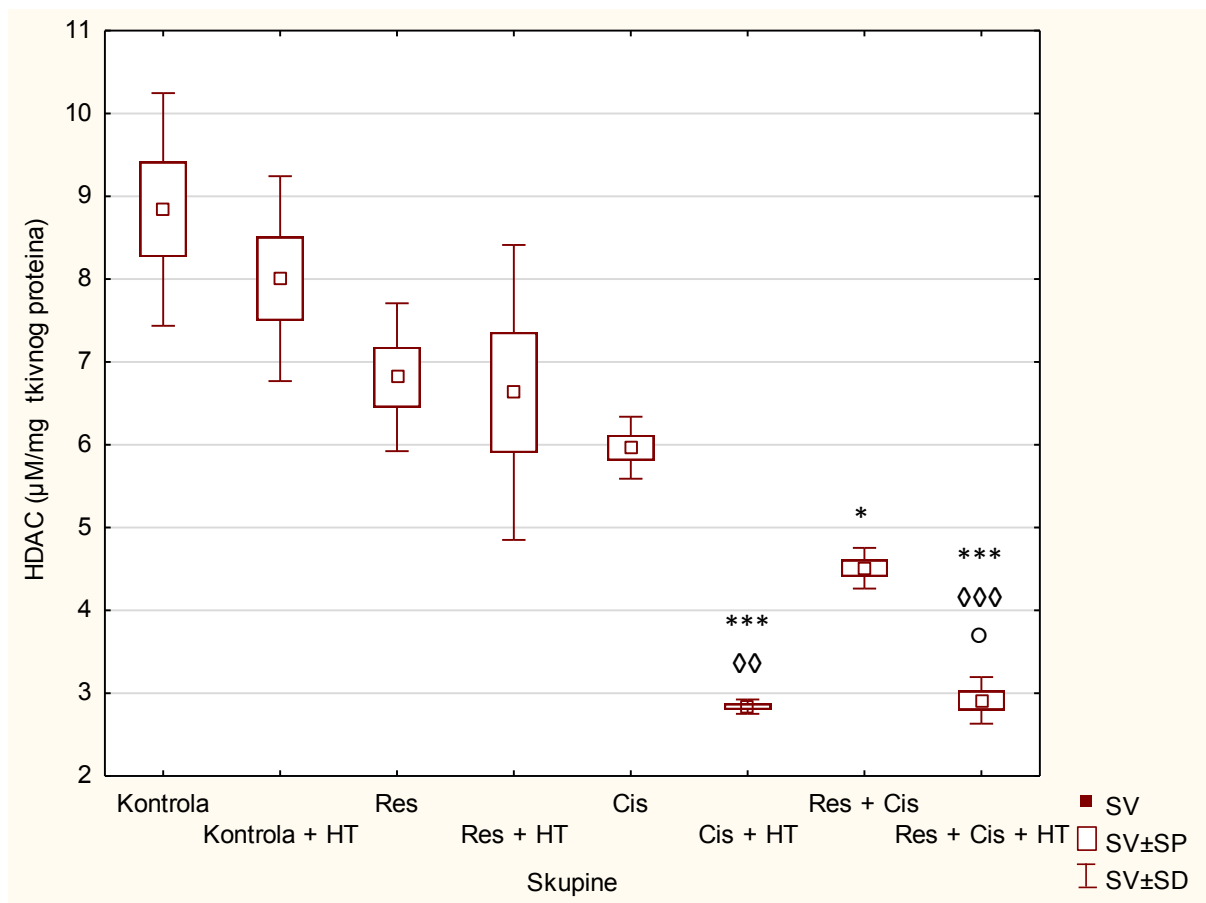


**Slika 28.** Promjena relativne mase jetre, slezene i bubrega u miševa nositelja EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom.

Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi ( $N=10$  po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SP. \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond\diamond p \leq 0,01$ ,  $\diamond\diamond\diamond p \leq 0,001$ );  $\circ$  Statistički značajno u odnosu na Res ( $\circ p \leq 0,05$ ,  $\circ\circ p \leq 0,01$ );  $\square$  Statistički značajno u odnosu na Res + Cis ( $\square p \leq 0,05$ ,  $\square\square p \leq 0,001$ ) Kratice: Res - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija.

#### ***4.1.4. Razina HDAC u uzorcima tkiva tumora obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima***

Resveratrol kao prirodni proizvod mogao bi djelomično utjecati na inhibiciju rasta tumora kroz epigenetske mehanizme, djelovanjem na HDACs. HDAC su enzimi uključeni u brojne korake tumorogeneze, uključujući inicijaciju rasta tumora, angiogenezu, metastaze i brojne druge procese progresije tumora (Li i sur., 2016.; Ramaiah i sur., 2021.). Uzimajući u obzir važnu ulogu HDAC-a u tumorogenezi, posebno u regulaciji angiogenezu, te aktivnosti HSP-a i HIF-1 $\alpha$ , dalje smo istražili može li resveratrol modulirati aktivnost HDAC-a i pojačati kemoterapijski učinak cisplatine u normalnim i hipertermijskim uvjetima djelujući kao epigenetski modulator. Prema dobivenim podacima, predobrada resveratrolom pojačala je citotoksične učinke cisplatine na aktivnost HDAC u usporedbi s kontrolnom skupinom. Vrijednosti inhibicije HDAC između skupine Res + Cis i kontrole bile su statistički značajne ( $p < 0,05$ ); vrijednost HDAC u skupini Res + Cis bila je  $4,51 \pm 0,10$  dok je u kontroli bila  $8,84 \pm 0,57$ . Međutim, hipertermija je dodatno pojačala inhibični učinak cisplatina na aktivnost HDAC. Dobivene vrijednosti inhibicije HDAC bile su:  $2,84 \pm 0,04$  (Cis + HT) i  $2,91 \pm 0,11$  (Res + Cis + HT) u odnosu na kontrolnu skupinu  $8,84 \pm 0,57$  ( $p < 0,001$  za obje skupine, Slika 29).



**Slika 29.** Aktivnost HDAC u tkivu tumora u miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 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 kontrolu (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ); ◊ Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (◊◊  $p \leq 0,01$ , ◊◊◊  $p \leq 0,001$ ); ° Statistički značajno u odnosu na Res (°  $p \leq 0,05$ ).

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

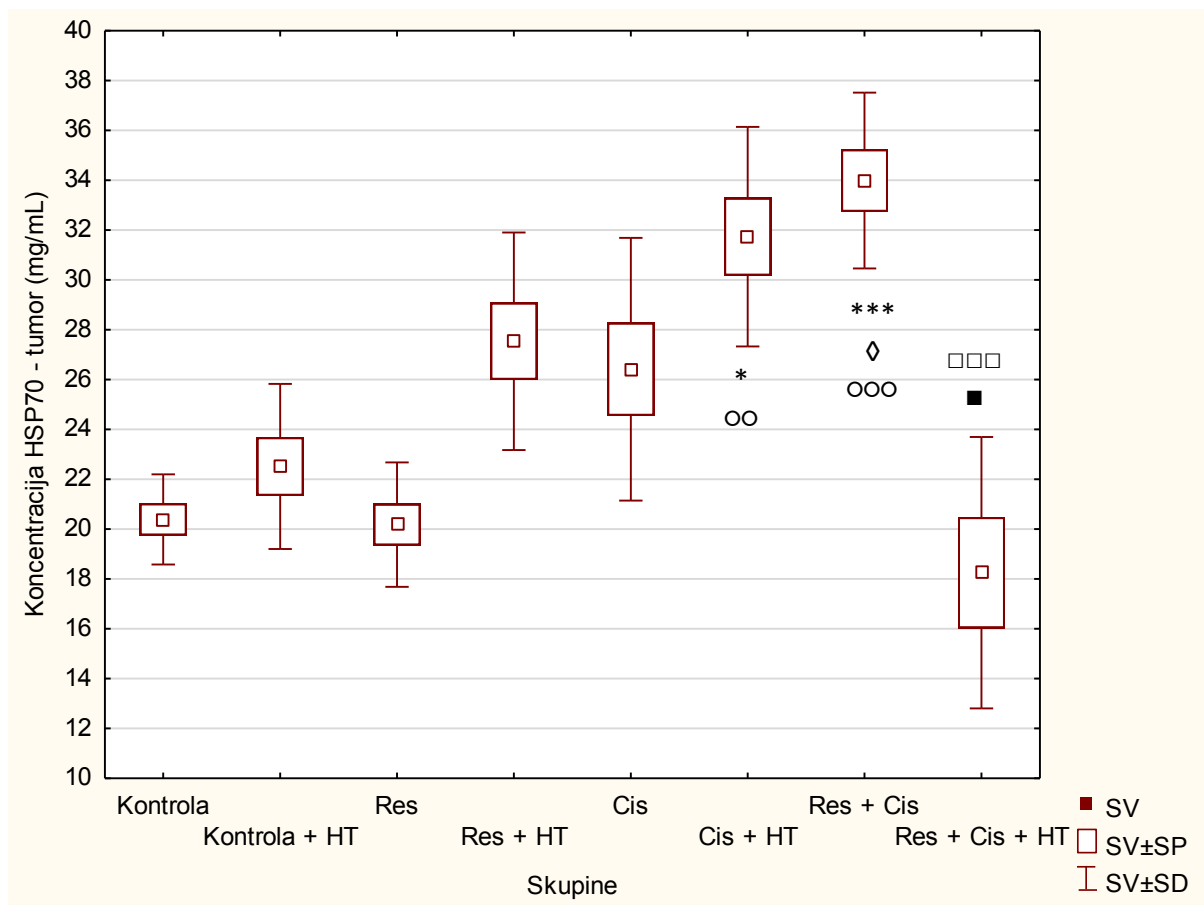
#### **4.1.5. Razina HSP70 i HSP90 u uzorcima tkiva tumora obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

Šaperoni se obično klasificiraju prema njihovoj molekularnoj težini. HSP70s i HSP90s šaperoni sudjeluju u *de novo* smatanju, stabiliziranju nepravilno smotanih proteina, odmatanju proteina za prijenos kroz membranu ili razaranje i pomaganje u pravilnom smatanju te sastavljanju makromolekula u veće komplekse čime sudjeluju u održavanju stanične proteostaze. Dakle, HSP90 sudjeluje u posttranslacijskom savijanju i stabilizaciji više od 200 proteina uključenih u regulaciju staničnih signala koji potiču rast tumorskih stanica i kemorezistenciju (Sreedhar i sur., 2004.) , dok HSP70 štiti stanice raka od apoptoze. Osim toga, dokazana je dvostruka uloga HSP-a u protutumorskoj imunosti (Zhang i sur., 2020.).

Zanimljivo je da su razine HSP70 (Slika 30) bile više u odnosu na kontrolnu skupinu, osim za skupine Res i Res + Cis + HT. Koncentracije HSP70 su povećane kako slijedi: 66,69% (Res + Cis); 55,64% (Cis + HT); 35,06% (Res + HT); 29,55% (Cis); i 10,42% (kontrola + HT).

Obrada s Res + Cis pokazala je najveću vrijednost HSP70 u usporedbi s kontrolom ( $p \leq 0,001$ ), kontrolom + HT ( $p \leq 0,05$ ) i Res ( $p \leq 0,001$ ). Druga najveća vrijednost primijećena je u skupini obrađenoj s Cis + HT; statistički značajna razlika postoji u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ ) i u odnosu na Res ( $p \leq 0,01$ ). Prema dobivenim podacima, skupina obrađena s Res + Cis + HT imala je tek nešto nižu razinu HSP70 u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom kontrola + HT, što ukazuje na veću osjetljivost tumorskih stanica budući da inhibicija HSP70 može pojačati kemoterapijom-inducirani učinak ubijanja stanica tumora. Ova je skupina pokazala značajno smanjenje koncentracije HSP70 u usporedbi s Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ) i Res ( $p \leq 0,001$ ).

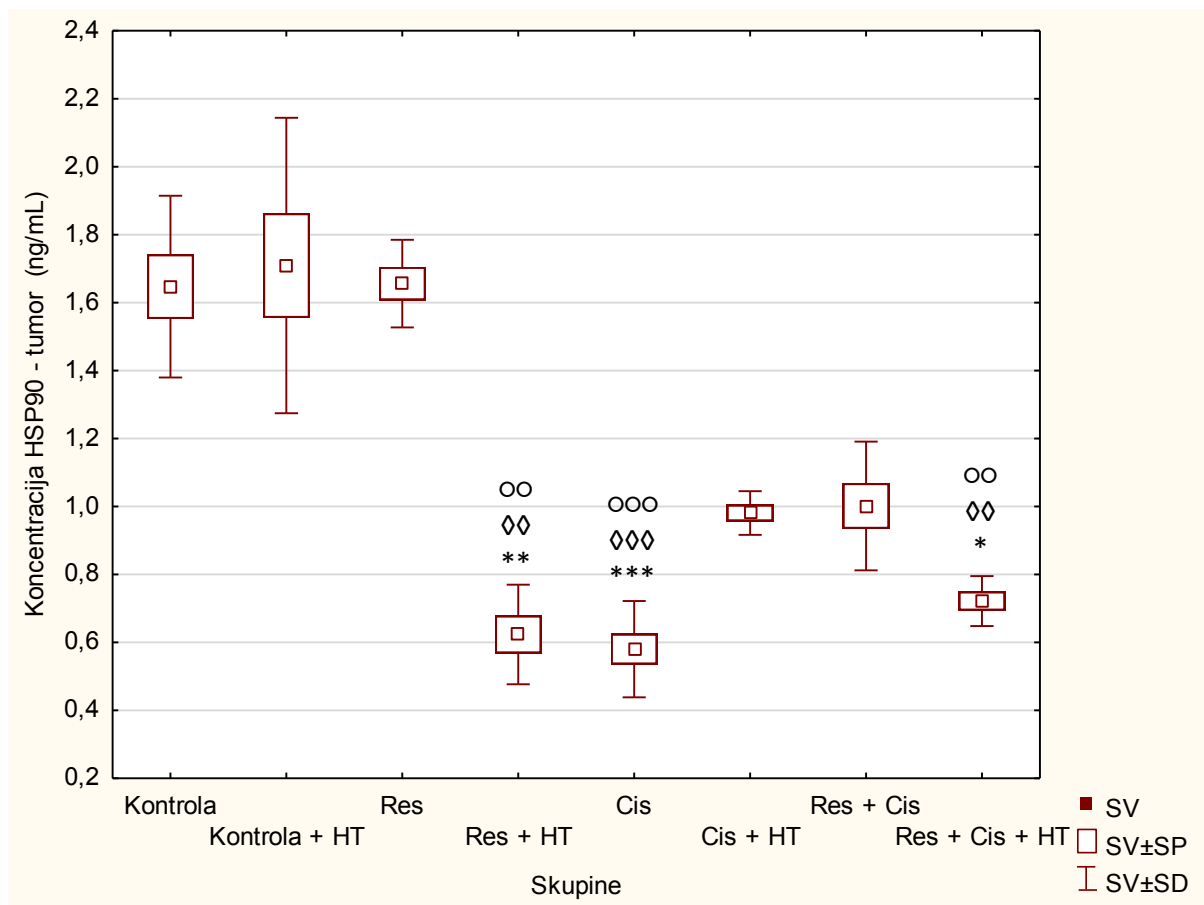
Koncentracije HSP90 (Slika 31) smanjene su u svim skupinama u usporedbi s kontrolom, osim u skupini obrađenoj resveratrolom; % inhibicije od najviše vrijednosti do najniže je bio: 70,24% (Cis); 68,04% (Res + HT); 62,99% (Res + Cis + HT); 49,70% (Cis + HT); 48,64% (Res + Cis); 23,80% (kontrola + HT), i 0,22% (Res). Tako je najniža vrijednost HSP90 primijećena u Cis skupini u usporedbi s kontrolom, kontrolom + HT i Res ( $p \leq 0,001$ ), a slijede vrijednosti dobivene u skupinama Res + HT i Res + Cis + HT; statistički različite u odnosu na kontrolnu skupinu, kontrola + HT i Res ( $p \leq 0,01$ ).



**Slika 30.** Koncentracija HSP70 u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 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 kontrolu ( $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $p \leq 0,05$ );  $\circ$  Statistički značajno u odnosu na Res ( $^{\circ}p \leq 0,01$ ,  $^{\circ\circ}p \leq 0,001$ );  $\square$  Statistički značajno u odnosu na Res + Cis ( $^{\square\square}p \leq 0,001$ );  $\blacksquare$  Statistički značajno u odnosu na Cis + HT ( $^{\blacksquare}p \leq 0,05$ ).

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



**Slika 31.** Koncentracija HSP90 u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obradenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 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 kontrolu ( \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ); ° Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (°°  $p \leq 0,01$ , °°°  $p \leq 0,001$ ); ° Statistički značajno u odnosu na Res (°°  $p \leq 0,01$ , °°°  $p \leq 0,001$ ).

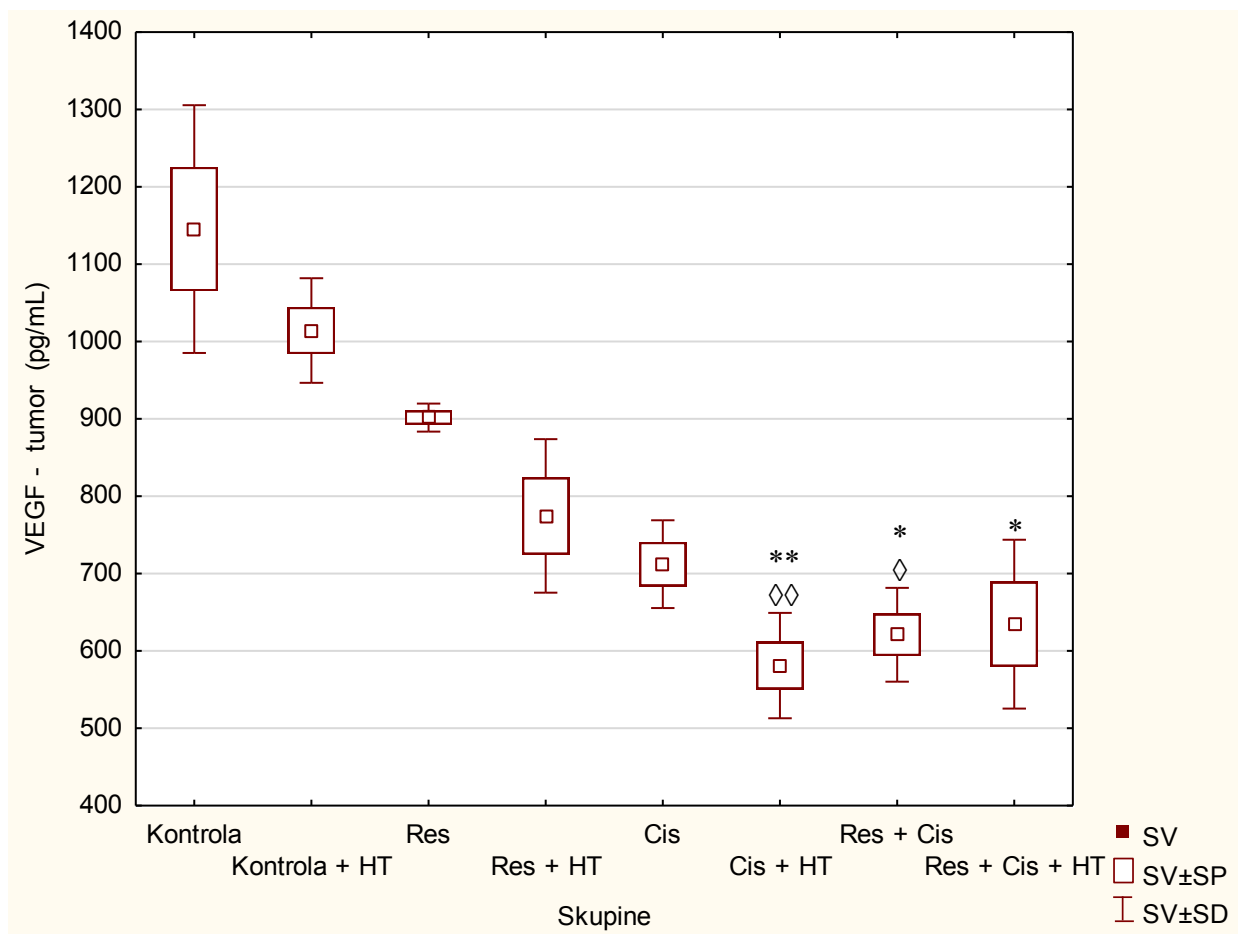
Kratice: Res - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija.



#### **4.1.6. Razina VEGF u uzorcima seruma i tumora miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

Hipertermija uzrokuje brojne promjene staničnih membrana, citoskeleta, jezgre, DNA, RNA, proteina i staničnih organela, ali također oštećuje mikrovaskulaturu i potiskuje angiogenezu zloćudnih tumora. Angiogeneza je bitna za razvoj tumora i metastaze, a angiogenetski čimbenici koji potječu iz tumora kao što je VEGF igraju važnu ulogu u stvaranju novih žila i napredovanju tumora *in vitro* i *in vivo*. Na Slici 32 vidljivo je da je koncentracija VEGF u tumoru smanjena u svim skupinama u usporedbi s kontrolom. Najmanji pad koncentracije VEGF iznosio je 11,5% (kontrola + HT), a najveći 49,3% (Cis + HT). Kao što je i očekivano, kombinacija cisplatine s hipertermijom imala je izraženiji inhibitorni učinak na koncentraciju VEGF u usporedbi s cisplatinom u fiziološkim uvjetima (49,3% prema 37,82%). Značajno smanjenje koncentracije VEGF-a u tumoru u usporedbi s kontrolom ili kontrolom + HT dokazano je za skupine Cis + HT ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ), Res + Cis ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) i Res + Cis + HT ( $p < 0,05$ ).

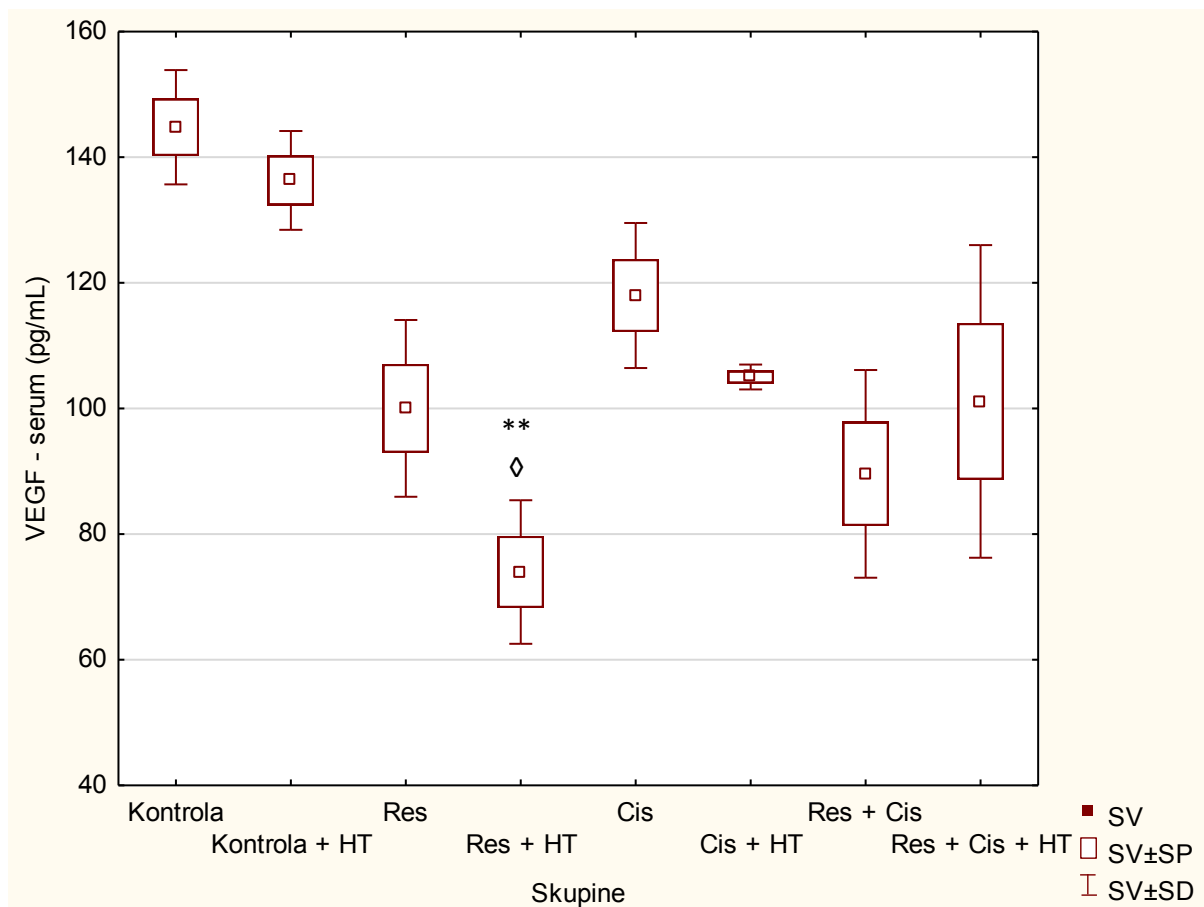
Razina VEGF čimbenika u serumu (Slika 33) je također bila smanjena u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu ali bez statističke značajnosti, osim u skupini obrađenoj s Res + HT gdje postoji značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu sa i/ili bez HT.



**Slika 32.** Koncentracija VEGF-a u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (sc) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injecirana intraperitonealno (ip) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 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 kontrolu (\* $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond p \leq 0,05$ ,  $\diamond\diamond p \leq 0,01$ ).

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



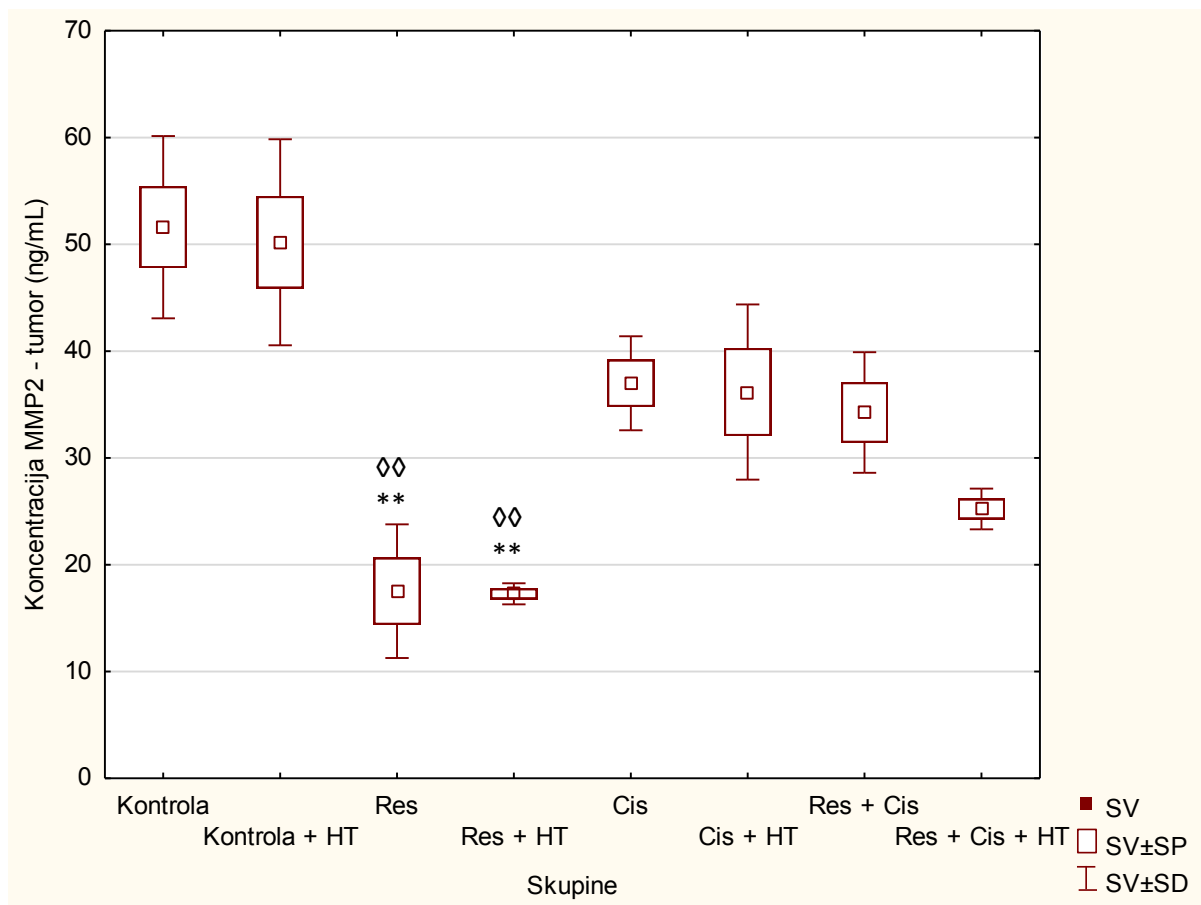
**Slika 33.** Koncentracija VEGF-a u serumu miševa nositelja solidnog EAT obradenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obradeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injecirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 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 kontrolu ( $**p \leq 0,01$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond p \leq 0,05$ ).

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

#### **4.1.7. Razina MMP-2 i MMP-9 u uzorcima tkiva tumora obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

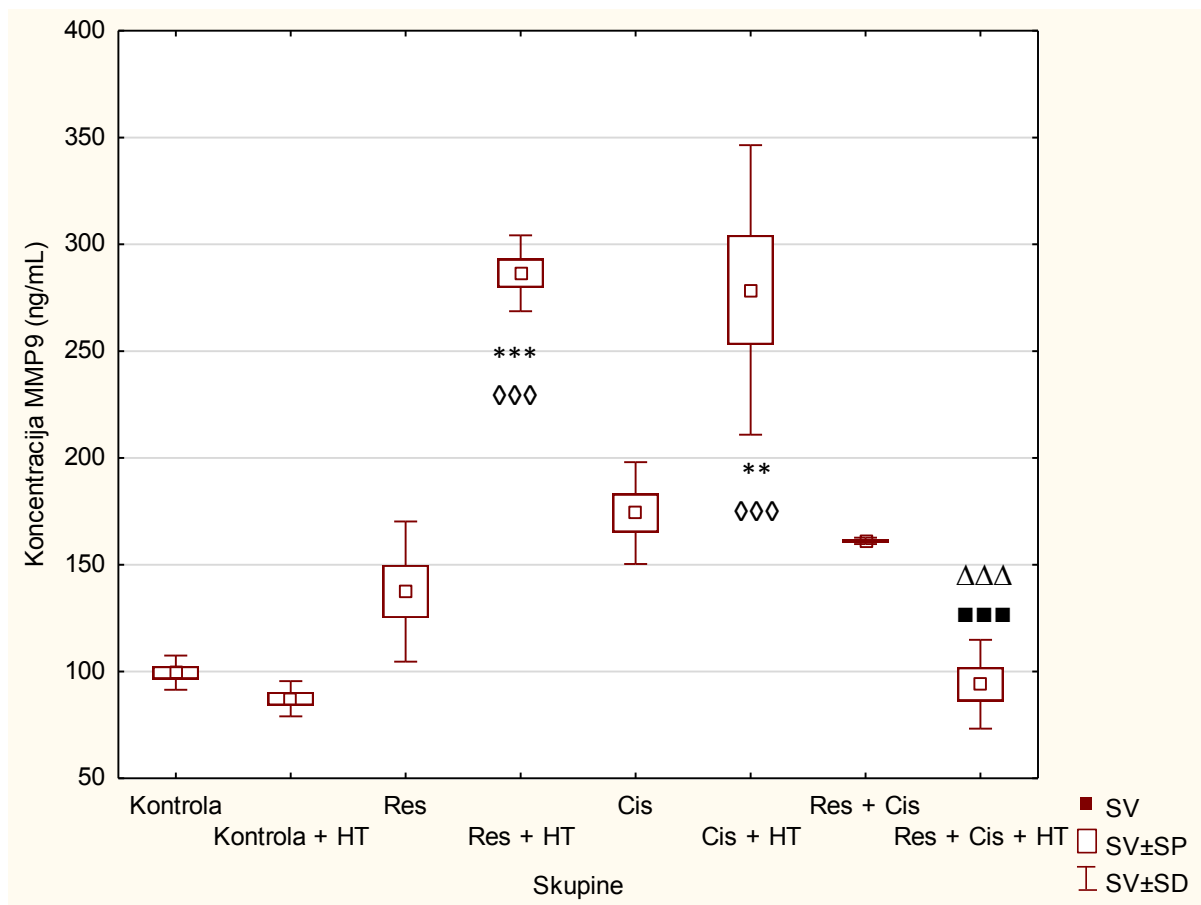
VEGF je ključni čimbenik u neovaskularizaciji tumora. On povećava proliferaciju i migraciju endotelnih stanica, rast tumora *in vivo* i remodelira perivaskularni matriks povećanjem razina proteinaza, uključujući razinu matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 (Byrne i sur., 2005.; Carmeliet, 2005.). Koncentracija MMP-2 (Slika 34) smanjena je u svim skupinama osim u kontroli + HT. Zanimljivo je da je najveći učinak primijećen za Res sa i/ili bez HT u usporedbi s kontrolom ( $p < 0,01$  u obje skupine). Za razliku od MMP-2, koncentracija MMP-9 (Slika 35) bila je povećana u gotovo svim skupinama u usporedbi s kontrolom sa i/ili bez HT, posebno u Res + HT ( $p < 0,001$  ili  $p < 0,001$ ) i Cis + HT skupinama ( $p < 0,001$  ili  $p < 0,01$ ). Koncentracija MMP-9 u skupini obrađenoj s Res + Cis + HT bila je značajno niža u usporedbi sa skupinama Res + HT i Cis + HT ( $p < 0,001$  i  $p < 0,001$ ).



**Slika 34.** Koncentracija MMP-2 u tkivu tumoru miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 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 kontrolu ( $**p \leq 0,01$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond\diamond p \leq 0,01$ ).

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



**Slika 35.** Koncentracija MMP-9 u miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatinu injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV  $\pm$  SD (SP). \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $** p \leq 0,01$ ,  $*** p \leq 0,001$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond\diamond\diamond p \leq 0,001$ );  $\triangle$  Statistički značajno u odnosu na Res + HT ( $\triangle\triangle\triangle p \leq 0,001$ );  $\blacksquare$  Statistički značajno u odnosu na Cis + HT ( $\blacksquare\blacksquare\blacksquare p \leq 0,001$ ).

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

#### ***4.1.8. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na gustoću mikrožilja (MVD) miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Progresija tumora i bijeg tumorskih stanica (metastaze) zahtijevaju dinamičku interakciju između stanica raka i njihovog mikrokruženja. Indukcija tumorske angiogeneze kritičan je korak u ranom razvoju solidnih tumora. Formiranje novih krvnih žila zahtijeva angiogeni čimbenik VEGF i njegovo proteolitičko otpuštanje iz tumorskog matriksa putem MMP-a, pretežno MMP-9 koji se isporučuje u mikrokruženje tumora leukocitima koji infiltriraju tumor. S obzirom na smanjenu razinu VEGF-a i rast tumora, istražili smo je li broj krvnih žila također smanjen unutar solidnog oblika EAT-a obrađenog resveratrolom i cisplatinom sa i/ili bez hipertermije. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da je došlo do značajne inhibicije neovaskularizacije kod miševa obrađenih s Res ( $p < 0,05$ ), Cis ( $p < 0,01$ ), Cis + HT ( $p < 0,05$ ) i Res + Cis + HT ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s tumorima kontrolnih životinja koji su pokazali opsežnu neovaskulaturu (Tablica 9). Brojanjem mikrometastaza u plućima nismo uočili nikakve razlike u broju metastaza u plućima niti u jednoj obrađenoj skupini; zapaženo je par pojedinačnih malih metastaza na rubu pluća (podaci nisu prikazani).

**Tablica 9.** Brojanje gustoće mikrožilja (MVD) u miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih resveratrolom, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Pokusna skupina <sup>a</sup>	Broj krvnih žila (SV ± SP)	Raspon	
		Minimum	Maksimum
Kontrola	11,14 ± 0,90	6	21
Kontrola + HT	9,36 ± 0,74	4	18
Res	7,21 ± 0,71 *	3	14
Res + HT	7,76 ± 0,77	3	15
Cis	6,82 ± 0,49 **	2	13
Cis + HT	6,89 ± 0,51 *	2	10
Res + Cis	8,21 ± 0,78	2	14
Res + Cis + HT	6,78 ± 0,57 *	2	11

<sup>a</sup>Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi (N=10 po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± SP.

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

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



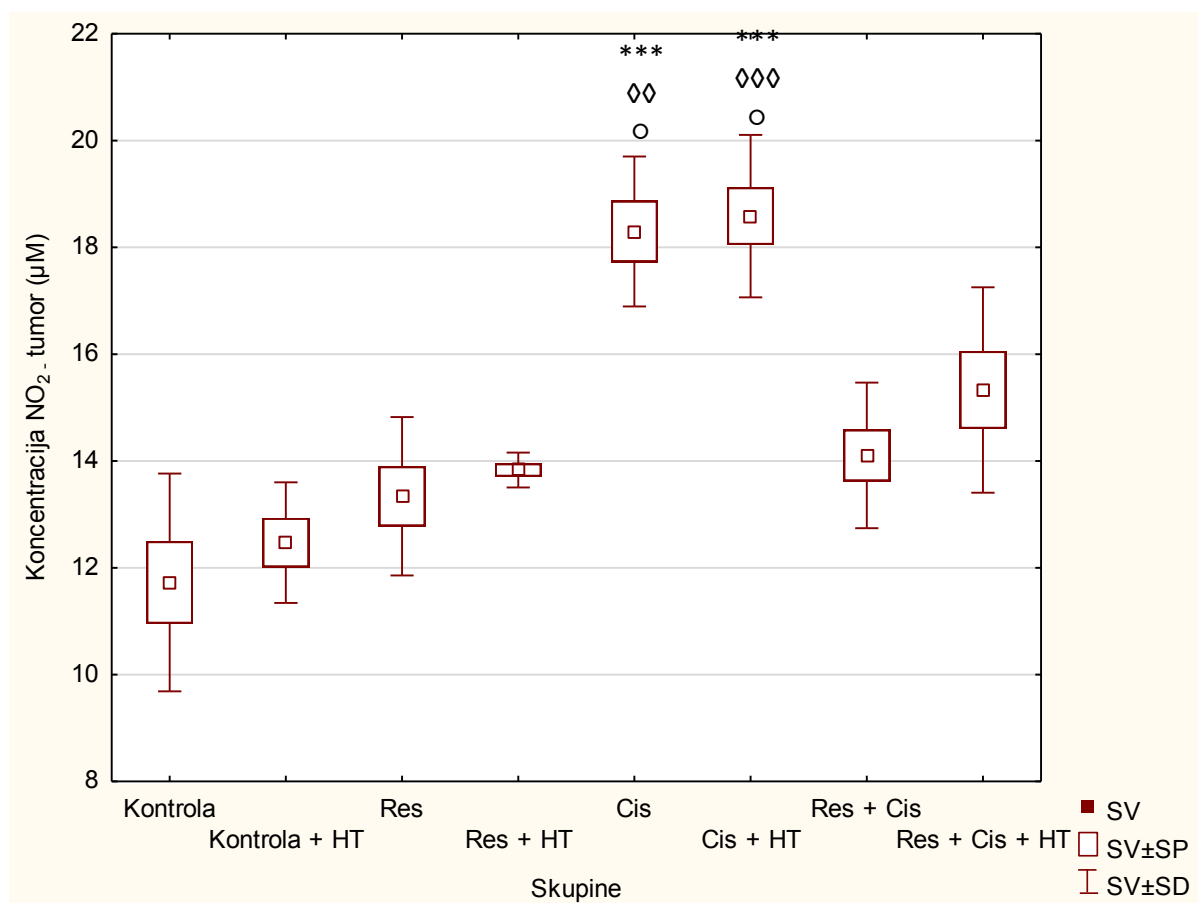
## **4. 2. UČINAK RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE NA IMUNOMODULACIJU I POLARIZACIJU MAKROFAGA U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-a**

### ***4.2.1. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatinе i hipertermije na tumorocidnu aktivnost makrofaga u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Progresija tumora regulirana je parakrinim interakcijama između tumorskih i stromalnih stanica. Dušikov oksid (NO) ima važnu ulogu u regulaciji interakcija između tumora i njegovog mikrookruženja, čime utječe na progresiju tumora (Decker i sur., 2008.). Tumorsko mikrookruženje uključuje različite vrste stanica kao što su fibroblasti, periciti, imunološke stanice i tumorski povezani makrofagi (TAM). Prema brojnim istraživanjima, NO može imati dvostruku ulogu. Može i pospješiti i potisnuti rast tumora. Istraživanje smo usmjerili na tumorocidni učinak makrofaga, odnosno indukciju M1 makrofaga analizom razine NO i arginaze. Visoke razine NO povezane su s inhibicijom rasta tumora, dok su razine arginaze potencijalni dijagnostički biomarker za progresiju raka.

Za skupine (Cis, Cis + HT, Res + Cis, Res + Cis + HT) razina NO (Slika 36) bila je povećana, posebno u Cis i Cis + HT skupini u usporedbi s kontrolnom ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ), kontrola + HT ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ) i Res ( $p < 0,05$ ).

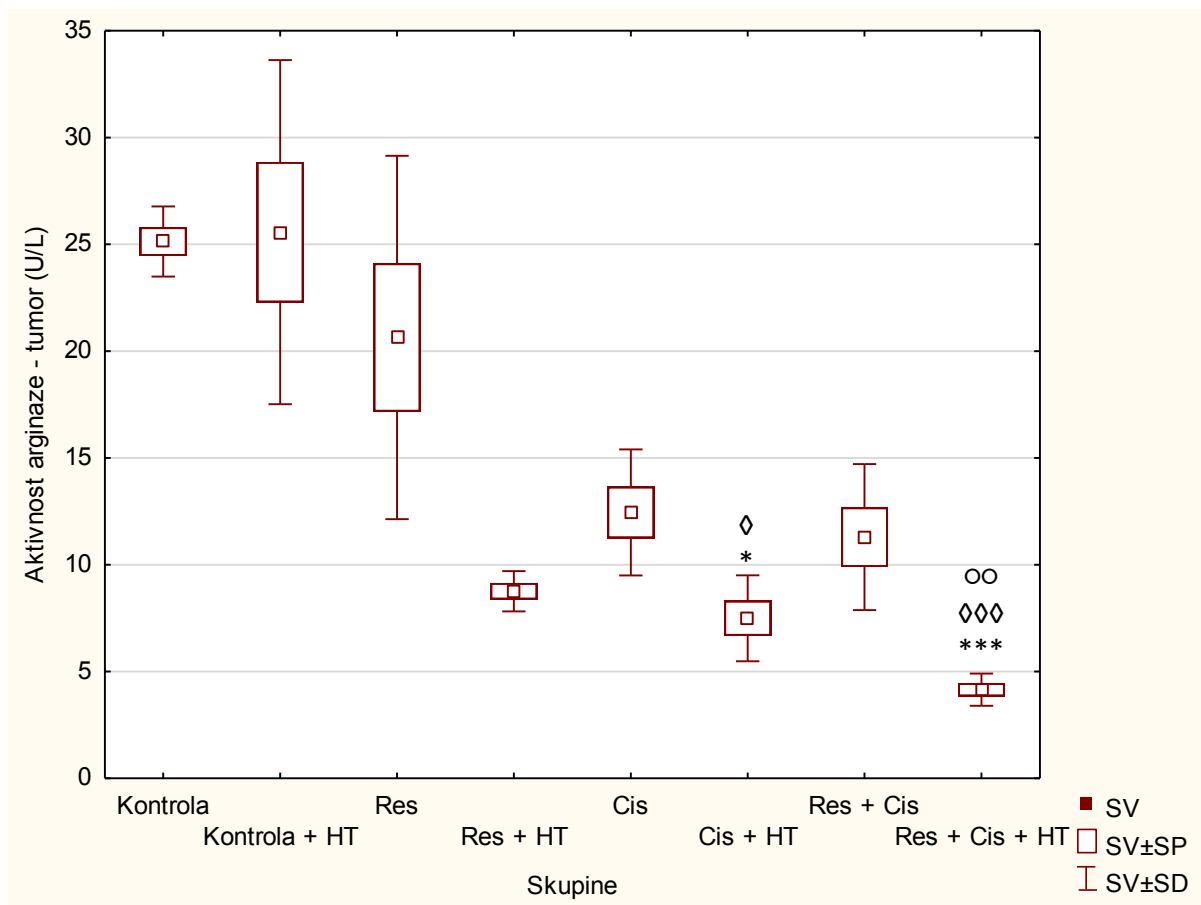
Aktivnost Arg (Slika 37) u tumorskom tkivu bila je niska u svim skupinama obrađenim Cis-om (Cis, Cis + HT, Res + Cis, Res + Cis + HT), dok je dobivena statistička značajnost u usporedbi s kontrolom sa i/ili bez HT u skupinama Cis + HT ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) i Res + Cis + HT ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ).



**Slika 36.** Koncentracija NO<sub>2</sub> u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SD (SP). \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\*\* $p \leq 0,001$ ); <sup>◊</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (<sup>◊◊</sup> $p \leq 0,01$ , <sup>◊◊◊</sup> $p \leq 0,001$ ); ◊ Statistički značajno u odnosu na Res (<sup>◊</sup> $p \leq 0,05$ )

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



**Slika 37.** Aktivnost arginaze u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

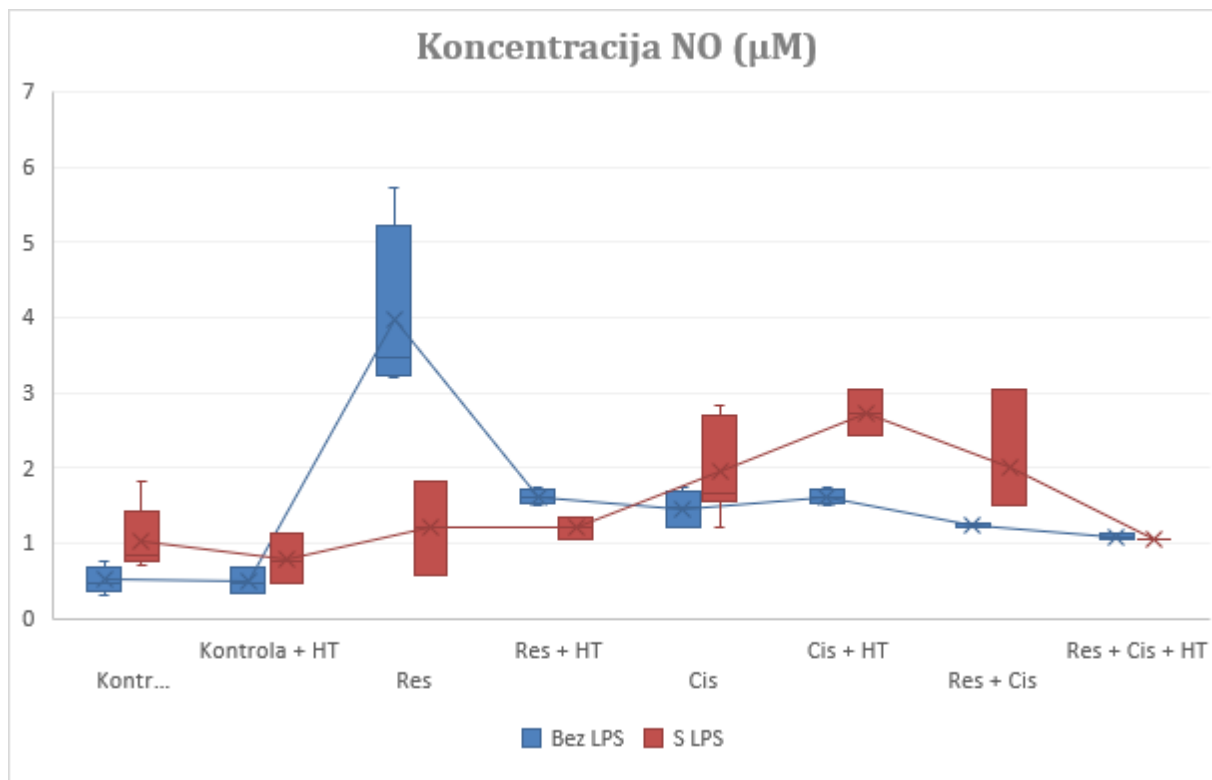
Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV  $\pm$  SD (SP). \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ ,  $*** p \leq 0,001$ );  $^{\diamond}$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $^{\diamond} p \leq 0,05$ ,  $^{\diamond\diamond\diamond} p \leq 0,001$ ),  $^{\circ}$  Statistički značajno u odnosu na Res ( $^{\circ} p \leq 0,01$ )

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

#### ***4.2.2. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na tumoricidnu aktivnost makrofaga slezene miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Analizom funkcionalne aktivnosti makrofaga slezene, nakon 24 h inkubacije makrofaga sa i/ili bez stimulacije s LPS vidljivo je da u nadtalogu makrofaga slezene resveratrol ima stimulatorni učinak na aktivnost makrofaga i potiče razinu NO bez stimulacije s LPS-om dok u upalnim uvjetima (stimulacija s LPS) ima protuupalni učinak. Nasuprot tome Cis, Cis + HT, Cis + Res potiče stvaranje NO u upalnim uvjetima (Slika 38).

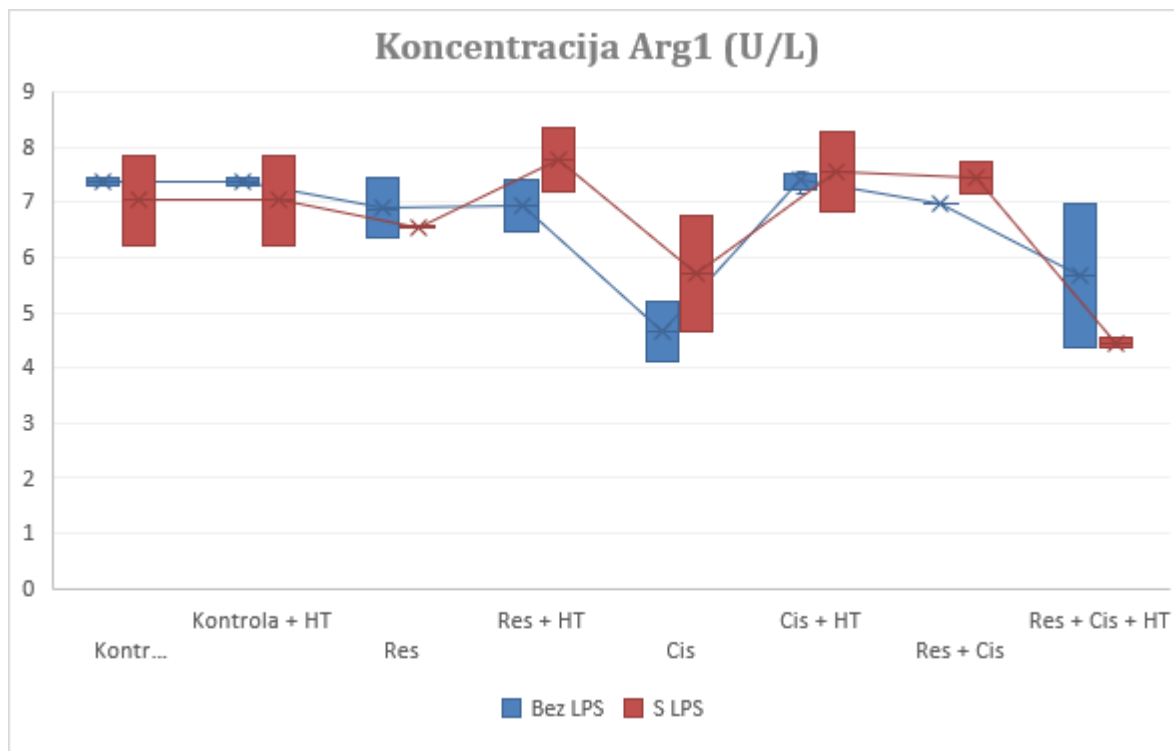
Resveratrol nema značajan učinak na aktivnost Arg1 sa i/ili bez LPS, dok Cis smanjuje aktivnost arginaze. U hipertermijskim uvjetima Cis sam ili u kombinaciji s resveratrolom (Cis + Res) vraća vrijednosti na normalnu razinu (Slika 39).



**Slika 38.** Koncentracija NO<sub>2</sub> u nadtalogu makrofaga slezene miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SD (SP).

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



**Slika 39.** Koncentracija Arg1 u nadtalogu makrofaga slezene miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV  $\pm$  SD (SP).

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

### **4.3. ANTIOKSIDATIVNE/PROOKSIDATIVNE ZNAČAJKE KOMBINACIJE RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-a**

#### ***4.3.1. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva tumora, bubrega i jetre miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima***

##### **4.3.1.1. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva tumora miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva tumora (Tablica 10) pokazuju statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u skupini miševa obrađenoj cisplatinom u odnosu na skupinu miševa obrađenu resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu skupinu miševa s hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ) i skupinu miševa obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom i cisplatinom pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije MDA u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,05$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije GSH u uzorcima tkiva tumora (Tablica 10) pokazuju statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u skupini miševa obrađenoj cisplatinom u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom ( $p \leq 0,001$ ) i resveratrolom s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). Skupina miševa obrađena cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije GSH u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ) i skupinu miševa obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom i cisplatinom pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije GSH u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,01$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije CAT u uzorcima tkiva tumora (Tablica 10) pokazuju statistički značajno povećanje koncentracije CAT u skupini miševa obrađenoj resveratrolom i hipertermijom i skupini obrađenoj cisplatinom i hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p$

$\leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom i cisplatinom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom ( $p \leq 0,05$ ), resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ) i cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ) i cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ).

**Tablica 10.** Koncentracija MDA i GSH te CAT aktivnosti u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Skupine <sup>a</sup>	TUMOR (SV±SP)		
	MDA (nmol/mg proteina)	GSH (mU/mg proteina)	CAT (U/mg proteina)
Kontrola	2,15±0,34	210,73±3,02	2,67± 0,27
Kontrola + HT	1,59±0,57	207,10±5,81	2,66±0,33
Res	2,31±0,12	246,31±9,65	5,49±0,36
Res + HT	3,14±0,12	236,43±5,55	6,06±0,33 <sup>*∞</sup>
Cis	0,92±0,07 <sup>□</sup>	176,21 ±9,38 <sup>∞∞∞□</sup>	4,80±0,48
Cis + HT	3,68±0,14 <sup>∞□□□</sup>	255,73±8,56 <sup>∞□□□</sup>	6,42±0,22 <sup>**∞∞</sup>
Res + Cis	3,04±0,27 <sup>□</sup>	240,04±11,39 <sup>□□</sup>	2,32±0,30 <sup>∞□□■■■</sup>
Res + Cis + HT	2,73±0,42	202,14±10,98	2,71±0,15 <sup>□■■</sup>

<sup>a</sup>Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ); <sup>∞</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (<sup>∞</sup> $p \leq 0,05$ , <sup>∞∞</sup> $p \leq 0,01$ ); <sup>∞∞∞</sup> Statistički značajno u odnosu na Res (<sup>∞</sup> $p \leq 0,05$ , <sup>∞∞∞</sup> $p \leq 0,001$ ); Statistički značajno u odnosu na Cis (<sup>∞∞∞</sup> $p \leq 0,01$ , <sup>∞∞∞∞</sup> $p \leq 0,001$ ); <sup>∆</sup> Statistički značajno u odnosu na Res + HT (<sup>∞∞∞</sup> $p \leq 0,01$ , (<sup>∞∞∞∞</sup> $p \leq 0,011$ ); <sup>■</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis + HT (<sup>■■</sup> $p \leq 0,01$ , <sup>■■■</sup> $p \leq 0,001$ )

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



#### **4.3.1.2. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva jetre miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva jetre (Tablica 11) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u skupini miševa obrađenoj cisplatinom u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom i cisplatinom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu skupinu i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). Skupina obrađena resveratrolom, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu skupinu i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije GSH u uzorcima tkiva jetre (Tablica 11) pokazuju statistički značajno povećanje koncentracije GSH u skupini miševa obrađenoj resveratrolom i hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu i hipertermiju ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena cisplatinom pokazuje povećanje koncentracije GSH u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u odnosu na skupinu miševa obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,01$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom i cisplatinom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ) i skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ) i skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ).

Rezultati mjerenja CAT u uzorcima tkiva jetre (Tablica 11) pokazuju statistički značajno povećanje koncentracije CAT u skupini miševa obrađenoj cisplatinom u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ) i skupinu obrađenoj resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ) i skupinu obrađenu resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena

resveratrolom i cisplatinom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom ( $p \leq 0,05$ ), cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ) i cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije CAT u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom i cisplatinom ( $p \leq 0,01$ ).

**Tablica 11.** Koncentracija MDA i GSH te CAT aktivnosti u tkivu jetre miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Skupine <sup>a</sup>	JETRA (SV±SP)		
	MDA (nmol/mg proteina)	GSH (μU/mg proteina)	CAT (U/mg proteina)
Kontrola	8,60±0,32	274,40±19,01	48,60±2,06
Kontrola + HT	8,49±0,46	237,31±10,60	35,08±1,73
Res	5,75±0,26	317,04±4,40	55,20±3,32
Res + HT	6,54±0,56	371,41±15,60 <sup>◇◇</sup>	29,27±1,45
Cis	4,96±0,17 <sup>◇</sup>	406,89±9,45 <sup>**◇◇</sup>	149,44±3,84 <sup>◇◇□□□</sup>
Cis + HT	6,82±0,58	277,42±8,93 <sup>□□</sup>	129,30±10,79 <sup>◇◇□□□</sup>
Res + Cis	4,49±0,31 <sup>**◇◇</sup>	259,64±11,70 <sup>□□□□□□</sup>	24,49±0,90 <sup>□□□□■</sup>
Res + Cis + HT	4,40±0,17 <sup>***◇◇◇</sup>	258,62±10,42 <sup>□□□□□</sup>	66,04±5,82 <sup>□□</sup>

<sup>a</sup>Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ ) <sup>◇</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $^{\diamond}p \leq 0,05$ ,  $^{\diamond\diamond}p \leq 0,01$ ,  $^{\diamond\diamond\diamond}p \leq 0,001$ ); <sup>△</sup> Statistički značajno u odnosu na Res + HT ( $^{\Delta}p \leq 0,05$ ,  $^{\Delta\Delta}p \leq 0,01$ ,  $^{\Delta\Delta\Delta}p \leq 0,001$ ); <sup>▽</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis ( $^{\nabla\nabla}p \leq 0,01$ ,  $^{\nabla\nabla\nabla}p \leq 0,001$ ); <sup>◊</sup> Statistički značajno u odnosu na Res ( $^{\circ}p \leq 0,05$ ); <sup>■</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis + HT ( $^{\blacksquare}p \leq 0,001$ ); <sup>□</sup> Statistički značajno u odnosu na Res + Cis ( $^{\square}p \leq 0,01$ ).

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

#### **4.3.1.3. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva bubrega miševa obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva bubrega (Tablica 12) pokazuju statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u skupini miševa obrađenih cisplatinom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ), skupinu obrađenu resveratrolom ( $p \leq 0,05$ ) i skupinu obrađenu resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije CAT u uzorcima tkiva bubrega (Tablica 12) pokazuju statistički značajno povećanje koncentracije CAT u skupini miševa obrađenoj resveratrolom u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom i hipertermijom pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom i cisplatinom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom ( $p \leq 0,01$ ) i resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). Skupina miševa obrađena resveratrolom, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ), skupinu obrađenu resveratrolom ( $p \leq 0,001$ ), skupinu obrađenu resveratrolom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ) i skupinu obrađenu cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ).

U odnosu na kontrolne skupine razina GSH bila je statistički značajno najmanja u skupini Res + Cis + HT ( $p \leq 0,001$ ,  $p \leq 0,001$ ), Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,01$ ) i Res + Cis ( $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,05$ ).

**Tablica 12.** Koncentracija MDA i GSH te CAT aktivnosti u tkivu bubrega miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Skupine <sup>a</sup>	BUBREG (SV±SP)		
	MDA (nmol/mg proteina)	GSH (μU/mg proteina)	CAT (U/mg proteina)
Kontrola	6,38±0,21	195,82±3,52	62,46±1,20
Kontrola + HT	4,50±0,30	168,30±3,43	36,67±2,08
Res	6,45±0,30	148,79±11,68	62,13±3,13 <sup>○○○</sup>
Res + HT	7,68±0,74	136,72±6,32	69,15±2,59 <sup>○○</sup>
Cis	3,42±0,27 <sup>□□○**</sup>	158,69±7,67	48,32±1,75
Cis + HT	4,21±0,79	108,14±9,33 <sup>**○○</sup>	81,08±2,81
Res + Cis	5,01±0,44	123,48±7,87 <sup>*○</sup>	49,20±1,80 <sup>○○□□</sup>
Res + Cis + HT	4,02±0,01	93,84±1,37 <sup>***○○○</sup>	47,80±0,57 <sup>**○○○□□□■</sup>

<sup>a</sup>Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa resveratrolom u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SD (SP). Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( \*\* $p \leq 0,01$ ); <sup>○</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (<sup>○○</sup> $p \leq 0,01$ , <sup>○○○</sup> $p \leq 0,001$ ); <sup>°</sup> Statistički značajno u odnosu na Res (<sup>°</sup> $p \leq 0,05$ , <sup>○○</sup> $p \leq 0,01$ , <sup>○○○</sup> $p \leq 0,001$ ); <sup>△</sup> Statistički značajno u odnosu na Res + HT (<sup>△△</sup> $p \leq 0,01$ , <sup>△△△</sup> $p \leq 0,001$ ); <sup>■</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis + HT (<sup>■</sup> $p \leq 0,05$ ).

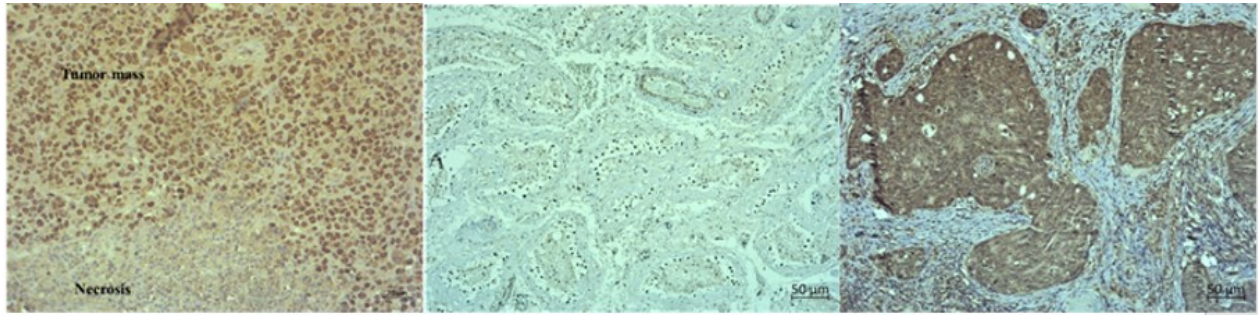
Kratice: Res - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### **4.4. PROCJENA RAZINE OŠTEĆENJA KOMBINACIJE RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIFE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-a**

##### ***4.4.1. Učinak resveratrola, cisplatina i hipertermije na histološke i imunohistokemijske promjene u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Patološki pregled uzoraka solidnog oblika EAT-a u parafinu pokazao je vidljivu središnju nekrozu u svim uzorcima čiji se stupanj ne može procijeniti (Slika 40, prvi redovi na Slikama 41 i 42). U svim uzorcima tumorske stanice bile su smještene na periferiji tumorske mase i pokazale su vrlo visok stupanj proliferacije (više od 90%). Stoga smo na Slici 40 pokazali jedan reprezentativan primjer nuklearne pozitivnosti za nuklearni antigen proliferirajućih stanica (PCNA). Međutim, jasno je vidljivo da obrađeni uzorci pokazuju različite obrasce nekroze (Slike 41 i 42). Najopsežniju nekrozu uočili smo nakon obrade s Cis, a zatim Res.

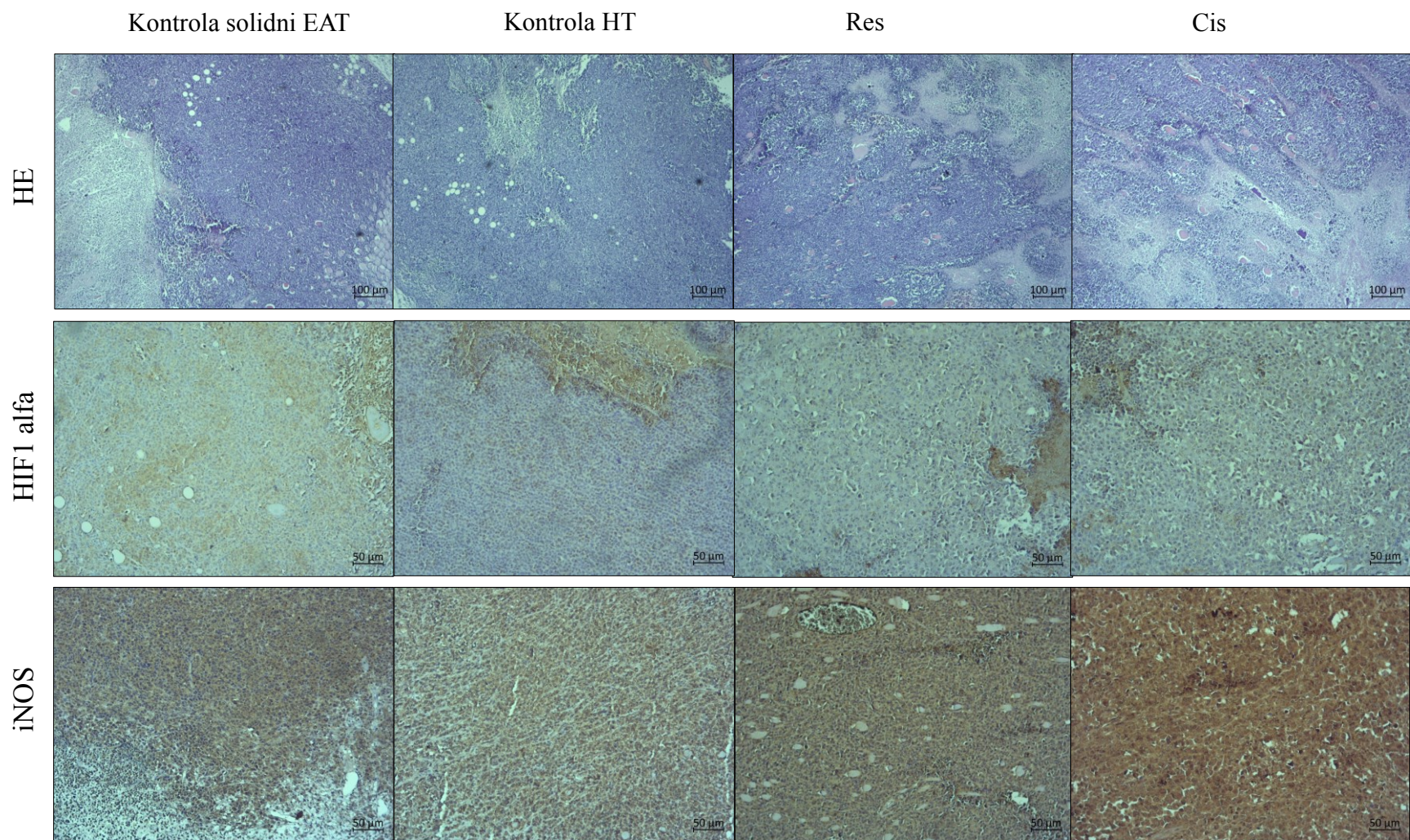
Čimbenici inducirani hipoksijom 1 i 2 (HIF) važni su transkripcijski regulatori angiogeneze i energetskog metabolizma u tumorima te važna meta za terapiju raka (Weidemann i Johnson, 2008.). Brojni podaci ukazuju da inhibitori histon deacetilaze potiskuju funkciju HIF-a u tumorskim stanicama ali još uvijek nejasnim putovima. Na temelju navedenog istražili smo aktivnost HIF-a, kao i ključne čimbenike angiogeneze (VEGF, MMP-2 i MMP-9) te broj krvnih žila. Nakon imunohistokemijskog bojenja, primijetili smo slabo citoplazmatsko bojenje za HIF-1 $\alpha$  u kontrolnim uzorcima i uzorcima obrađenim pojedinačnim test komponentama (Slika 41). Iako je solidni tumor EAT (kontrola) pokazao žarišno citoplazmatsko bojenje, nismo primijetili nikakvo nuklearno bojenje koje bi ukazivalo na transkripcijsku aktivaciju signalnih putova aktiviranih hipoksijom. U pokusu kao pozitivnu kontrolu za čimbenik 1 $\alpha$  induciran hipoksijom (HIF-1 $\alpha$ ) koristili smo rak testisa s jasnom nuklearnom pozitivnošću (Slika 40). Imunohistokemijsko bojenje za inducibilnu sintazu dušikovog oksida (iNOS) pokazalo je slabo do umjereno citoplazmatsko bojenje za iNOS u kontrolnim uzorcima i uzorcima obrađenim s pojedinačnim test komponentama. Najjača ekspresija uočena je u uzorcima obrađenim Cis-om. Kao pozitivna kontrola za iNOS korišten je rak dojke s jakim citoplazmatskim bojanjem (Slika 40).



**Slika 40.** Imunohistokemijsko bojenje solidnog oblika EAT-a.

Uzorci tumorskog tkiva uklopljeni u parafinske blokove izrezani su na debljinu od 2-3  $\mu\text{m}$ . Rezovi su obojeni hematoksilin-eozinom za patohistološku analizu. Za proces imunohistokemijskog bojanja rezova ugrađenih u parafin korištena su protutijela miša na nuklearni antigen proliferirajućih stanica (PCNA) (Dako, M0879) u razrjeđenju 1:100 (povećanje 200x). U jezgrama tumorskih stanica vidljivo je smeđe bojenje. Jako proliferirajuće tumorske stanice smještene su periferno u tumorskoj masi, dok je središte tumora nekrotično. S obzirom da su svi uzorci pokazali isti profil vrlo visoke proliferacije (preko 90%), prikazali smo samo jednu reprezentativnu fotomikrografiju. Imunohistokemija parafinski ugrađenog tkiva testisa obojenog pomoću HIF-1 $\alpha$ , Rabbit pAb (ABclonal, A16873) u razrjeđenju 1:100 (povećanje 100x) prikazana je u sredini, a imunohistokemija parafinski ugrađenog raka dojke obojenog pomoću iNOS, pAb kunića u razrjeđenju 1:120 (Abcam, ab3523) prikazan je desno (povećanje 100x). Napravljene su reprezentativne fotomikrografije imunohistokemijskih slajdova.

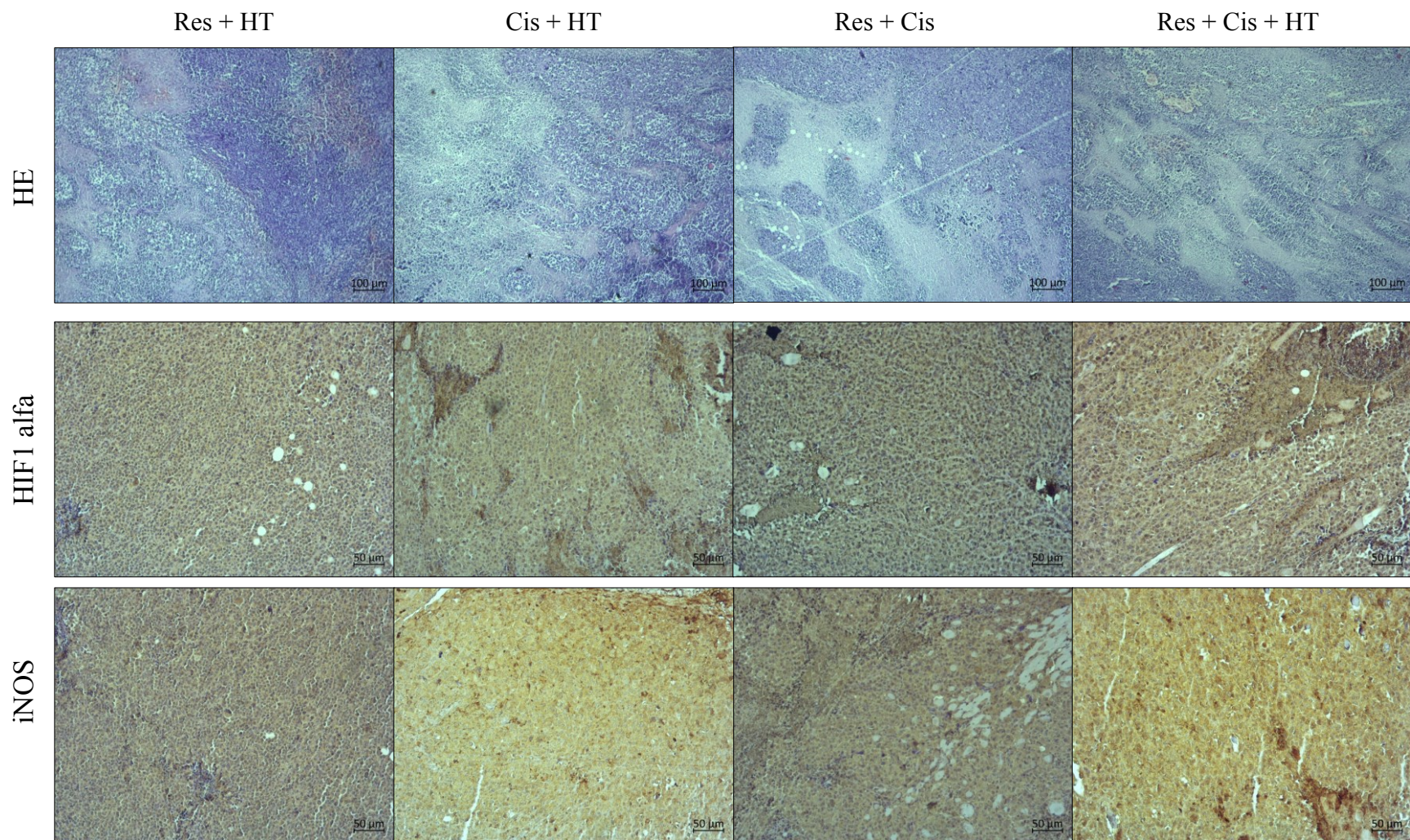
Nakon imunohistokemijskog bojenja, primijetili smo umjereno citoplazmatsko bojenje za HIF-1 $\alpha$  u svim uzorcima obrađenim kombinacijom test komponenti (Slika 42). Bojanje je bilo intenzivnije od kontrolnih uzoraka ili uzoraka obrađenih pojedinačnim obradama. Međutim, umjereno citoplazmatsko bojenje sa sporadičnim obojenim jezgrama primijećeno je u skupinama Res + Cis + HT i Cis + HT, dok su neke sporadične obojene jezgre primijećene samo u Res + Cis + HT, u usporedbi s bojanjem u svim drugim skupinama liječenja. Imunohistokemijsko bojenje za iNOS također je pokazalo umjereno citoplazmatsko bojenje u svim uzorcima obrađenim kombiniranim sredstvima. Najjača ekspresija iNOS-a uočena je u uzorcima obrađenim s Cis + HT i Res + Cis + HT.



**Slika 41.** Mikrografske fotografije histološke analize kontrolnih uzoraka tkiva tumora solidnog oblika EAT i uzoraka obrađenih resveratrolom i cisplatinom kao i imunohistokemijske reakcije za hipoksijom inducirani čimbenik transkripcije – 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) i inducibilnu dušikov oksid sintazu (iNOS) u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT.

Ekspresija HIF-1 $\alpha$  pokazala je slabiju citoplazmatsku ekspresiju bez vidljivog bojenja jezgre. Imunohistokemijska reakcija iNOS-a pokazala je umjerenu citoplazmatsku reakciju. Napravljene su reprezentativne fotomikrografije imunohistokemijskih stakalca (N=5).

Kratice: Res - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozama od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; HE - hematoksin i eozin



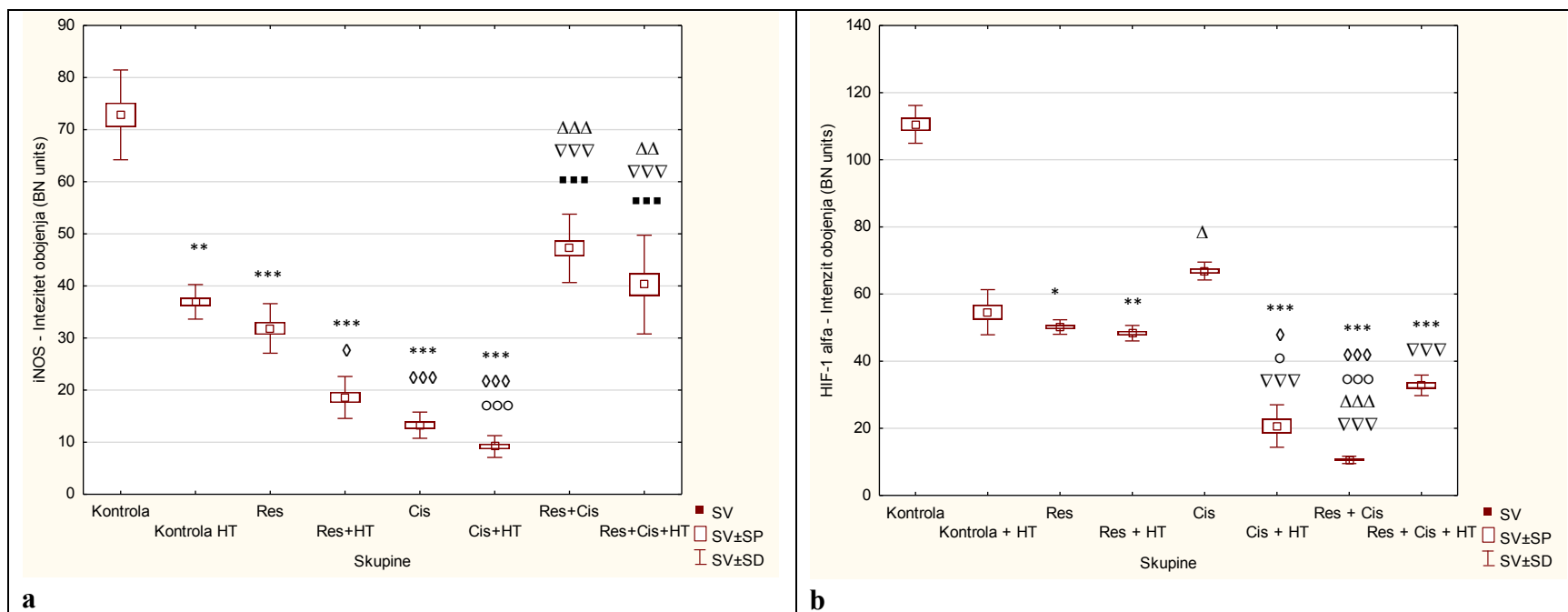
**Slika 42.** Fotomikrografije histoloških uzoraka tkiva tumora solidnog oblika EAT i uzoraka obrađenih resveratrolom, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima kao i imunohistokemijske reakcije za hipoksijom inducirani čimbenik transkripcije – 1alfa (HIF-1 $\alpha$ ) i inducibilnu dušikov oksid sintazu (iNOS) u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT.

Ekspresija HIF-1 $\alpha$  pokazala je umjerenu citoplazmatsku ekspresiju u skupinama Res + Cis i Cis + HT sa sporadičnim bojenjem jezgre u skupini obrađenoj Res + Cis + HT. Imunohistokemijska reakcija iNOS-a pokazala je umjerenu citoplazmatsku reakciju izraženiju u skupinama tretiranim Cis+HT i Res + HT. Napravljene su reprezentativne fotomikrografije imunohistokemijskih stakalca (N=5). Kratice: Res - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatinu u dozama od 2,5 i 5 mg/kg; Res + Cis - otopina resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatinu u dozama od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; HE - hematoksilin i eozin.



Za kvantitativnu analizu intenziteta imunohistokemijskog bojenja slika prikazanih na Slikama 41 i 42 upotrijebili smo računalno potpomognutu metodu koju su opisali Fu i sur. (2015.). Dobiveni podaci prikazani kao jedinice (BN vrijednost) pokazali su da je najjači intenzitet bojenja iNOS bio vidljiv u tumorskom tkivu životinja obrađenih Cis + HT ( $9,17 \pm 2,1$ ), Cis ( $13,3 \pm 2,5$ ) i Res + HT ( $18,6 \pm 4,0$ ). (Slika 43a). Obrada životinja s Cis i Cis + HT pokazalo je najveće promjene razine iNOS-a. Najveća statistička razlika dobivena u usporedbi s kontrolnim skupinama (Kontrola i Kontrla + HT) vidljiva je u sljedećim skupinama: Cis + HT ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$ ), Cis ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$ ), Res + HT ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,05$ ) i Res ( $p \leq 0,001$ ). Također treba istaknuti da postoji statistička razlika između Res + Cis sa i/ili bez hipertermije u odnosu na skupine Cis sa i/ili bez hipertermije ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$ ). Obrada miševa s Res + Cis sa i/ili bez hipertermije u odnosu na obradu životinja s Res + HT je bila statistički različita ( $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$ ).

Kvantitativna analiza HIF-1 $\alpha$  pokazala je statistički značajne promjene u skupini liječenoj s Cis + HT, Res + Cis i Res + Cis+ HT u usporedbi s kontrolom (u svim skupinama  $p \leq 0,001$ ) ali i s drugim pokusnim skupinama (vidi Sliku 43b) dok je u obradi miševa s Res i Res + HT statistička značajnost bila ( $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ). Intenzitet imunohistokemijskog bojenja prikazan kao BN vrijednost HIF-1 u tumorskom tkivu ovih skupina bio je sljedeći:  $10,6 \pm 1,0$  (Res + Cis),  $20,7 \pm 6,3$  (Cis + HT) i  $32,8 \pm 3,0$  (Res + Cis + HT), dok je intenzitet bojenja u kontrolnom tkivu tumora bio  $110,5 \pm 5,6$  jedinica (Slika 43b).



**Slika 43.** iNOS (a) i HIF -1 alfa (b) intenzitet obojenja (BN units) u miševa nositelja solidnog EAT obrađenih resveratroлом, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa resveratroлом u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SD (SP)\* Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond p \leq 0,05$ ;  $\diamond\diamond p \leq 0,01$ ,  $\diamond\diamond\diamond p \leq 0,001$ );  $\circ$  Statistički značajno u odnosu na Res ( $\circ p \leq 0,01$ ,  $\circ\circ p \leq 0,001$ );  $\nabla$  Statistički značajno u odnosu na Cis ( $\nabla p \leq 0,05$ ,  $\nabla\nabla\nabla p \leq 0,001$ );  $\Delta$  Statistički značajno u odnosu na Res + HT ( $\Delta p \leq 0,05$ ;  $\Delta\Delta p \leq 0,01$ ;  $\Delta\Delta\Delta p \leq 0,001$ );  $\blacksquare$  Statistički značajno u odnosu na Cis + HT ( $\blacksquare p \leq 0,001$ )

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

#### **4.5. PROTUTUMORSKE I ANTIANGIOGENE ZNAČAJKE KOMBINACIJE NANOKRISTALA RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-a**

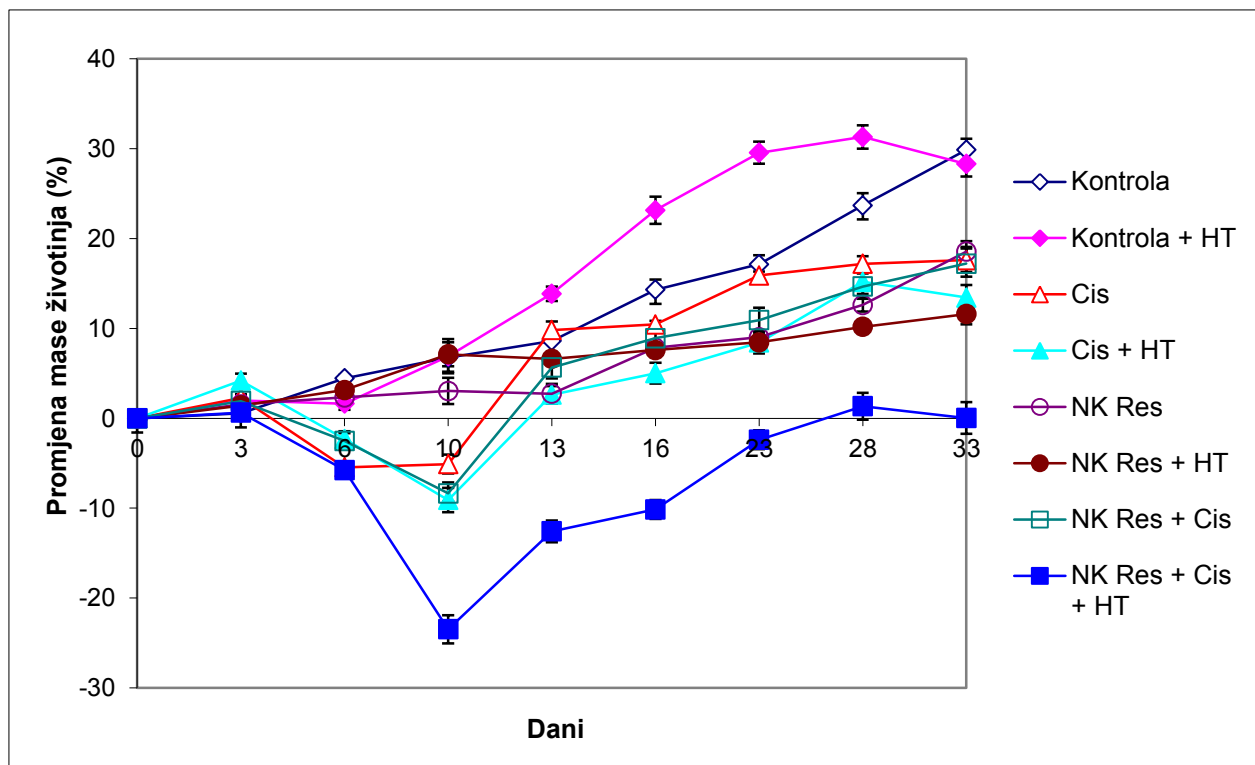
Obzirom da je terapijska primjena resveratrola ograničena njegovim fizičko-kemijskim (slaba topljivost, nestabilnost) i farmakokinetičkim značajkama (brzi metabolizam, kratko vrijeme polueliminacije, niska bioraspoloživost, brza eliminacija) (Cottart i sur., 2010.; Chimento i sur., 2019.), jedan od mogućih načina za iskorištavanje protutumorskih svojstava resveratrola je povećanje količine slobodnog trans-resveratrola na ciljanom mjestu djelovanja, zaobilazeći mogućnost brzog metaboliziranja u crijevima i jetri (Singh i sur., 2015.). Osnovni pristup povećanja bioraspoloživosti slabo topljivih tvari je smanjenje veličine čestica do nanometarskih dimenzija, odnosno izrada nanokristala slabo topljive tvari. Smanjenje veličine čestica slabo topljive tvari do nanometarskih dimenzija vodi povećanju površine čestica u odnosu na volumen, povećava topljivost i brzinu otapanja te poboljšava biofarmaceutske značajke slabo topljive tvari (Sun i Yeo, 2012.).

Temeljem navedenog pripremljeni su nanokristali resveratrola modificiranom metodom prema Romero i sur., (2016.), otopljeni u vodi, primjenjeni *po* u dozi od 50 mg/kg pomoću intragastrične kanile a kao prikladan stabilizator za *po* primjenu nanosuspenzije resveratrola veličine čestica 200 nm izabran je biokompatibilni polimer Pluronic F-127 (DeSmet i sur., 2012.).

##### ***4.5.1. Učinak kombinacije nanokristala resveratrola, cisplatin i hipertermije na tjelesnu masu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Najveći postotak promjene mase životinja zapažen je 10. dana u skupini obrađenoj s NK Res + Cis + HT gdje je pad težine životinja iznosio - 23,47% (Slika 44). Nakon ovog pada dolazi do laganog oporavka težine životinja sve do 28 dana kada je težina životinja bila pozitivna (1,34%). Desetog dana je zapažen pad težine u svim skupinama obrađenim s Cis i njenim kombinacijama. Međutim taj pad je bio znatno manji, primjerice Cis (oko -5%), Cis + HT (oko -9%), NK Res + Cis (oko -8,34%).

Ostale skupne pokazale su konstantni porast težine. Najmanji porast težine 33 dana je bio u skupini NK Res + Cis + HT (0,02%) a najveći u skupini NK Res (18,55%) (Slika 44).



**Slika 44.** Promjene mase miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi ( $N=10$  po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg nanokristala resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SP. Statistička razlika između skupina po danu: 6. Kontrola vs. NK Res + HT ( $p \leq 0,05$ ); Kontrola vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ); Cis vs. NK Res ( $p \leq 0,05$ ); Cis vs. NK Res + HT ( $p \leq 0,01$ ); Cis vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,001$ ); Cis + HT vs. NK Res + HT ( $p \leq 0,05$ ); Cis + HT vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ); 10. Kontrola vs. NK Res + HT ( $p \leq 0,05$ ); Kontrola vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ); Cis vs. NK Res + HT ( $p \leq 0,05$ ); Cis vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ); Cis + HT vs. NK Res + HT ( $p \leq 0,05$ ); Cis + HT vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); 13. Cis vs. NK Res ( $p \leq 0,01$ ); Cis vs. NK Res + HT ( $p \leq 0,001$ ); Cis vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ); Cis + HT vs. NK Res + HT ( $p \leq 0,05$ ); Cis + HT vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,001$ ); Cis + HT vs. NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### ***4.5.2. Učinak kombinacije nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije na stopu preživljavanja i volumen tumora miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Praćenjem srednje vrijednosti preživljavanja životinja (Tablica 13) nakon obrade s test komponentama, najbolje učinci u stopi preživljenja bili su u skupini: NK Res + Cis ( $55,30 \pm 7,23$ ; %ILS - 81,66%); Cis + HT ( $51,11 \pm 6,28$ ; %ILS - 67,90%) i NK Res + Cis + HT ( $41,66 \pm 1,27$ ; %ILS - 36,85%).

Slijed inhibicije volumena tumora neposredno nakon obrade (16 dana) u odnosu na kontrolnu skupinu pri fiziološkim uvjetima bio je: Cis + HT (64,02%); NK Res + Cis + HT (57,71%); NK Res + Cis (54,99%); Cis (52,77%); NK Res i NK Res + HT (35,13%) te Kontrola + HT (21,78%).

Obrada s NK Res + Cis pokazuje najbolji učinak u inhibiciji rasta tumora; 33 dana inhibicija volumena tumora u odnosu na kontrolu pri fiziološkim uvjetima bila je 61,21% a u odnosu na skupinu Kontrola + HT inhibicija je bila 52,63% dok je obrada miševa s NK Res + Cis + HT pokazala neznatno manji postotak inhibicije volumena tumora (~ 5%) u odnosu na NK Res + Cis. U isto vrijeme obrada s Cis + HT inhibirala je volumen tumora za 51,59 % i/ili 40,89 % u odnosu na kontrolne skupine (Kontrolu i Kontrola + HT) (Tablica 13).

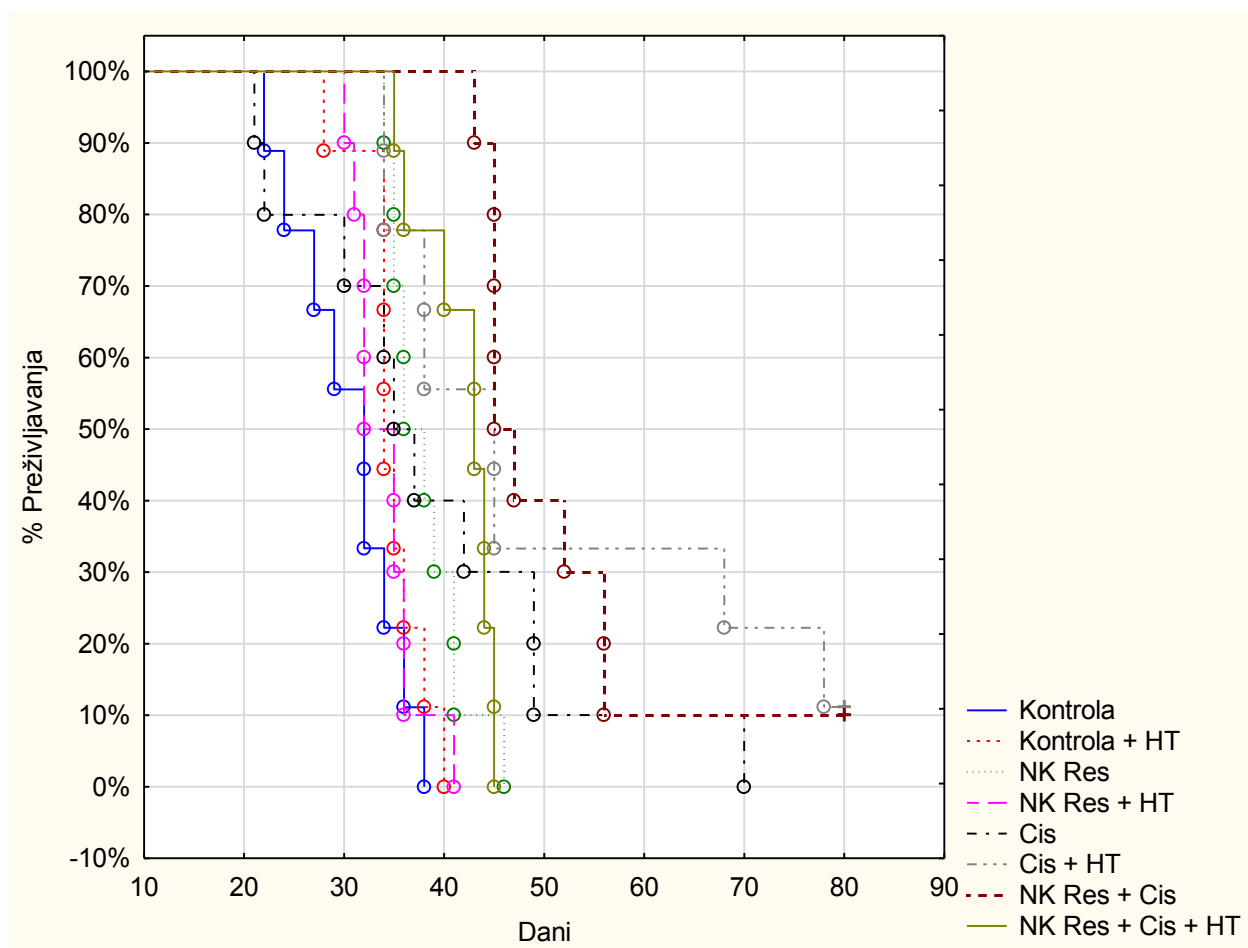
Analiza Kaplan-Meierove krivulje preživljavanja prikazana je na Slici 45 a statistička analiza (log-rank test) vidljiva je u Tablici 14. gdje je iz rezultata analize razvidno da obrada miševa s NK Res + Cis pokazuje najbolji učinak u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,00117$ ), a potom slijede NK Res + Cis + HT ( $p=0,00288$ ), Cis + HT ( $p=0,003099$ ) te Cis ( $p=0,00933$ ). Ovaj slijed s neznatno višim  $p$  vrijednostima je vidljiv i u odnosu na skupinu Kontrola + HT. Također, treba istaći da statistička značajnost (log-rank test) postoji dodatno između skupina Cis Res vs. NK + Cis ( $p=0,04319$ ), Cis + HT vs. NK Res ( $p=0,05323$ ), Cis + HT vs. NK Res + HT ( $p=0,00402$ ), NK res vs. NK Res + HT ( $p=0,05043$ ), NK Res vs. NK Res + Cis ( $p=0,00210$ ); NK Res + HT vs. NK Res + Cis ( $p=0,00077$ ), NK Res + HT vs. NK Res + Cis + HT ( $p=0,00344$ ) te NK Res + Cis vs. NK Res + Cis+HT ( $p=0,005269$ ).

**Tablica 13.** Raspon preživljenja, srednje vrijeme preživljavanja i produljeni životni vijek (%) u miševa nositelja solidnog EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Pokusna skupina <sup>a</sup>	Raspon preživljavanja (dani)	Srednja vrijednost preživljavanja (SV±SP dani)	Median preživljavanja (dani)	Broj preživjelih životinja		Inhibicija rasta tumora (%TVI) vs. fiziološka kontrola		Inhibicija rasta tumora (%TVI) vs. hipertermalna kontrola		
				%T/C <sup>b</sup>	%ILS <sup>c</sup>	16 dan	33 dan	16 dan	33 dan	
Kontrola	22 - 38	30,44 ± 1,79	32,00	/	/	0	/	/	/	/
Kontrola + HT	28 - 40	34,77 ± 1,10	34,00	114,22	14,22	0	21,78	18,10	/	/
Cis	21 - 70	38,90 ± 4,60	36,00	127,79	27,79	0	52,77	41,95	39,62	29,12
Cis + HT	34 - 80	51,11 ± 6,28	45,00	167,90	67,90	1	64,02	51,59	54,01	40,89
NK Res	34 - 46	38,10 ± 1,17	37,00	125,16	25,16	0	35,13	18,78	17,07	0,83
NK Res + HT	30 - 41	34,00 ± 1,032	33,50	111,69	11,69	0	35,13	5,80	17,07	-15,02
NK Res + Cis	43 - 119	55,30 ± 7,23	46,00	181,66	81,66	1	54,99	61,21	42,46	52,63
NK Res + Cis + HT	35 - 45	41,66 ± 1,27	43,00	136,85	36,85	0	57,71	56,07	45,93	46,36

<sup>a</sup>Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=10) su obrađeni dozom od 50 mg/kg nanokristalima resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± SP.  $bT/C\% = T/C \times 100$ ; T – prosječni dani preživljenja liječene skupine; C – prosječni dani preživljenja kontrolne skupine.  $c\%ILS$  (produženi životni vijek %) =  $(T-C)/C \times 100$ .

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.



**Slika 45.** Kaplan-Meierov krivulja preživljavanja miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=10$ ) su obrađeni dozom od 50 mg/kg nanokristala resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injiciran intraperitonealno (*ip*) nadozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SP.

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija.

**Tablica 14.** Usporedba preživljenja miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

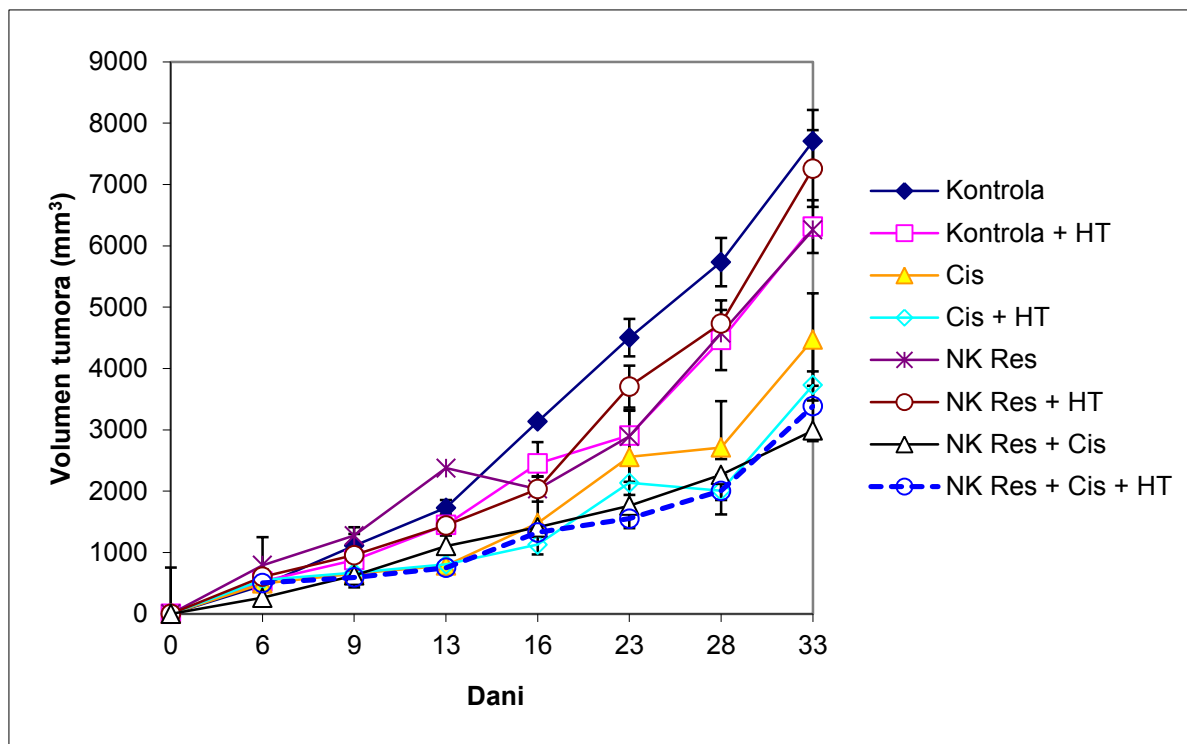
Pokusne skupine <sup>a</sup>	%ILS Fiziološki uvjeti	%ILS Hipertermijski uvjeti	Kaplan-Meier analiza (log-rank test)	
			* <i>p</i>	<sup>◇</sup> <i>p</i>
Kontrola	/		-	0.1093
Kontrola + HT	14,22	-	0,1093	-
Cis	27,79	11,88	0,00933	0,03685
Cis + HT	67,90	46,99	0,00309	0,00659
NK Res	25,16	09,58	0,01107	0,05756
NK Res + HT	11,69	-2,21	0,26586	0,84810
NK Res + Cis	81,66	59,05	0,00117	0,00128
NK Res + Cis + HT	36,85	19,82	0,00288	0,00526

<sup>a</sup>Nakon subkutane (sc) injekcije  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=10 po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg nanokristala resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatina injiciran intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Stope preživljenja izračunate su Kaplan-Meier metodom, a usporedba između krivulja preživljenja napravljena je log-rank testom ( $\alpha = 5\%$ ). \* Značajno različito u odnosu na kontrolu (log-rank test). <sup>◇</sup> Značajno različito u odnosu na kontrolu + HT (log-rank test).

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

Slika 46 i Tablica 15 pokazuju praćenje učinka nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije te njihovih kombinacija na rast volumena tumora tijekom 33 dana. Statistički značajna razlika u volumenu tumora u odnosu na kontrolne skupine vidljiva je jedino 28. dana u obradi miševa s Cis + HT i NK Res + Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,05$ ).





**Slika 46.** Promjena volumena tumora miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutane (sc) injekcije  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=10) su obrađeni dozom od 50 mg/kg nanokristala resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injiciran intraperitonealno (ip) nadozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SP.

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

**Tablica 15.** Promjena volumena tumora miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima

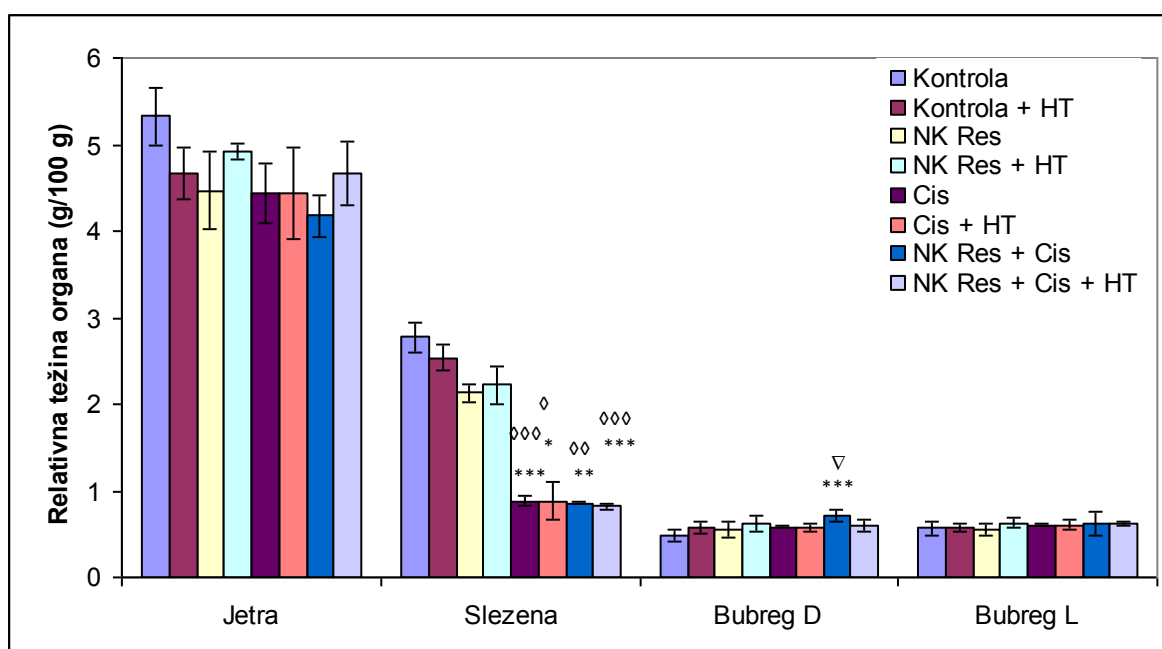
Skupine <sup>a</sup>	Volumen tumora (mm <sup>3</sup> )						
	Dani mjerenja (SV± SP)						
	6 dan	10 dan	13 dan	16 dan	23 dan	28 dan	33 dan
Kontrola	461,84±84,94	1110,15±193,85	1728,64±126,43	3134,77±40,39	4501,44±305,83	5734,00±395,37	7705,72±507,3
Kontrola + HT	527,84±171,95	874,86±185,00	1449,03±171,14	2452,07±348,58	2906,80±419,93	4464,13±490,11	6310,85±430,27
Cis	494,36±62,15	657,35±144,95	787,59±113,26	1480,64±138,00	2557,37±405,68	2712,37±190,77	4473±753,09
Cis + HT	550,53±173,97	670,01±160,00	805,00±158,83	1127,75±197,03	2135,7±388,16	2008,4±251,21* <sup>0</sup>	3730,1±626,46
NK Res	791,30±39,72	1273,50±87,23	1582,02±146,56	2790,25±23,87	2891,05±193,85	4574,11±196,16	6258,76±241,75
NK Res + HT	603,37±65,39	956,85±93,17	1440,05±88,92	2033,58±205,19	3705,40±342,80	4734,50±375,23	7258,76±627,13
NK Res + Cis	539,23±39,72	625,50±190,48	1104,06±171,35	1410,93±108,85	1761,90±291,73	2265,30±662,73	2989,40±316,74
NK Res + Cis + HT	500,94±76,13	592,69±162,81	750,00±112,48	1325,83±69,11	1551,38±157,56	2005,50±152,74* <sup>0</sup>	3385,17±568,95

<sup>a</sup>Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi (N=10 po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg nanokristala resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± SP. \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ ); <sup>0</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $p \leq 0,05$ )

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

### 4.5.3. Učinak kombinacije nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije na promjenu relativne mase jetre, slezene i bubrega miševa nositelja solidnog oblika EAT-a

Rezultati promjene mase organa prikazani su kao relativna masa (g/100 g) vidljivi su na Slici 47. Rezultati pokazuju da nije došlo do značajnih promjena u masi jetre dok su najveće promjene zapažene u slezeni nakon obrade s Cis, Cis + HT, NK Res + Cis, i NK Res + Cis + HT u odnosu na kontrolne skupine ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,01$ ; i  $p \leq 0,001$ ). Neznatne promjene su vidljive u desnom bubregu u skupini obrađenoj s NK Res + Cis u odnosu na kontrolu i Cis ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,05$ ).



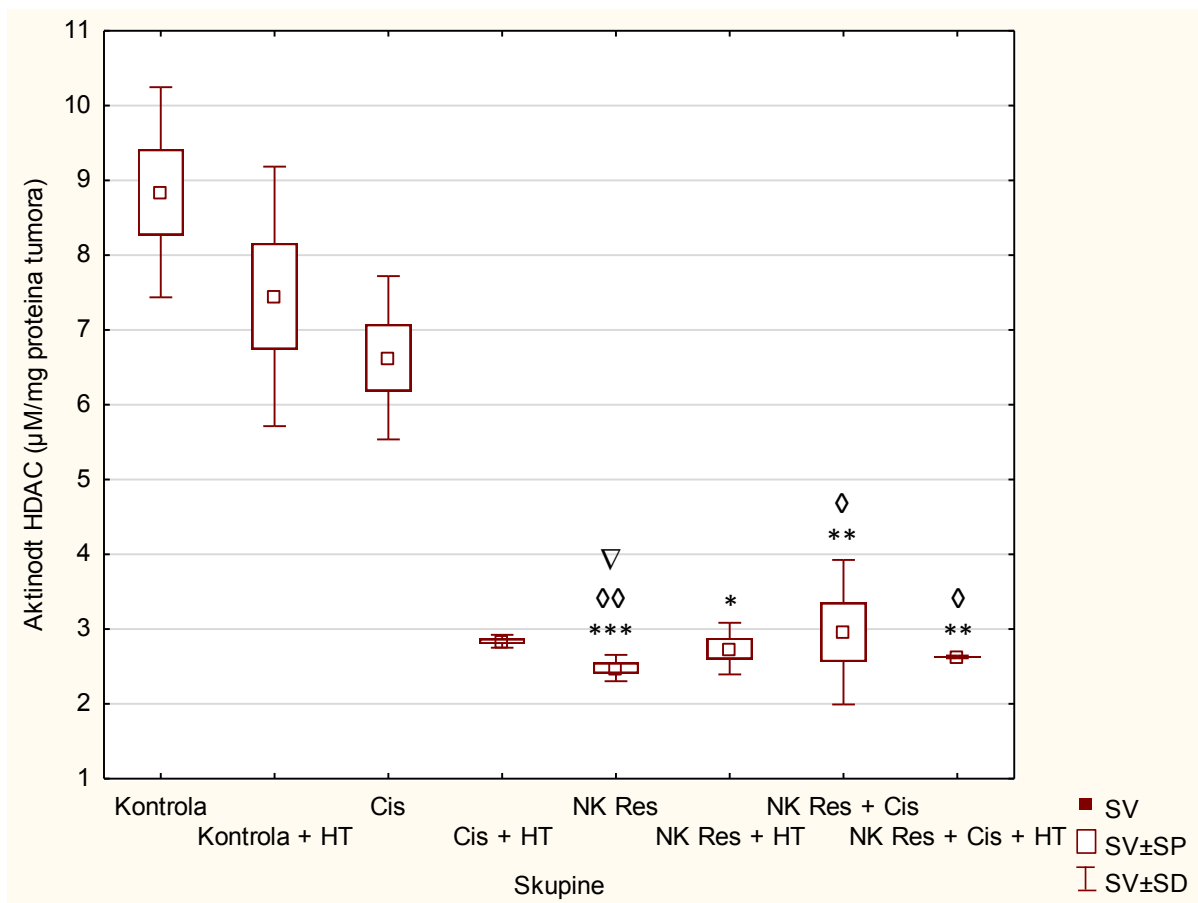
**Slika 47.** Promjena relativne mase jetre, slezene i bubrega u miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i njihovom kombinacijom fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi (N=10 po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg nanokristala resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ );  $\nabla$  Statistički značajno u odnosu na Cis ( $p \leq 0,05$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### ***4.5.4. Razina HDAC u uzorcima tkiva tumora obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima***

Rezultati mjerenja koncentracije HDAC u uzorcima tkiva tumora (Slika 48) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije HDAC u skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,001$ ), kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ) i skupinu miševa obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena nanokristalima resveratrola i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije HDAC u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena nanokristalima resveratrola i cisplatinom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije HDAC u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije HDAC u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ).



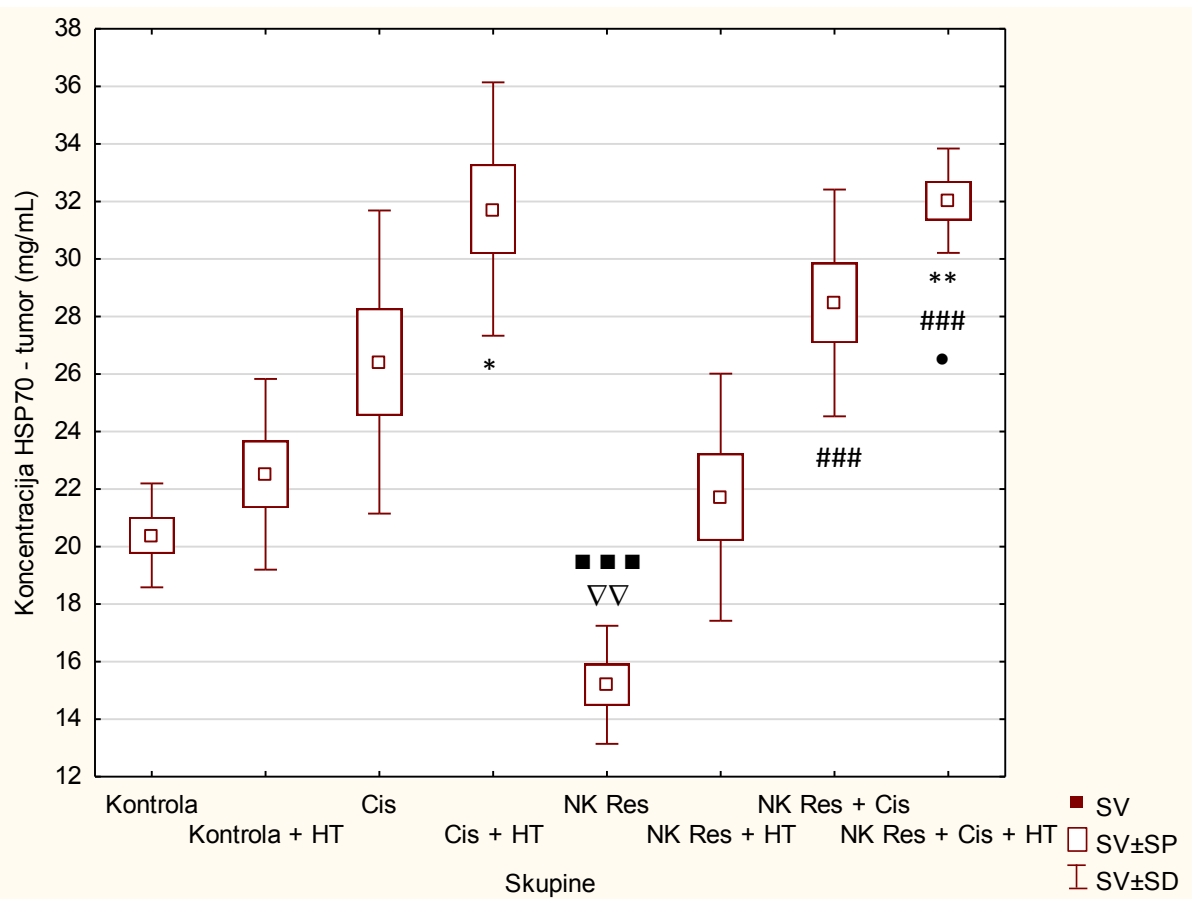
**Slika 48.** Aktivnost HDAC u tkivu tumora u miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N = 5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatinu injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ ),<sup>◊</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (<sup>◊</sup>  $p \leq 0,05$ , <sup>◊◊</sup>  $p \leq 0,01$ ); <sup>∇</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis (<sup>∇</sup>  $p \leq 0,05$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatinu u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatinu u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### ***4.5.5. Razina HSP70 i HSP90 u uzorcima tkiva tumora obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima***

Rezultati mjerenja koncentracije HSP70 u uzorcima tkiva tumora (Slika 49) pokazuju da postoji statistički značajno povećanje koncentracije HSP70 u skupini miševa obrađenoj cisplatinom i hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ ). U skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola postoji statistički značajno smanjenje koncentracije HSP70 u odnosu na skupinu miševa obrađenu cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ) i skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,01$ ). U skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola i cisplatinom postoji statistički značajno povećanje koncentracije HSP70 u odnosu na skupinu miševa obrađenu nanokristalima resveratrola ( $p \leq 0,001$ ). U skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom postoji statistički značajno povećanje koncentracije HSP70 u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ), skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola ( $p \leq 0,001$ ) i skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ).



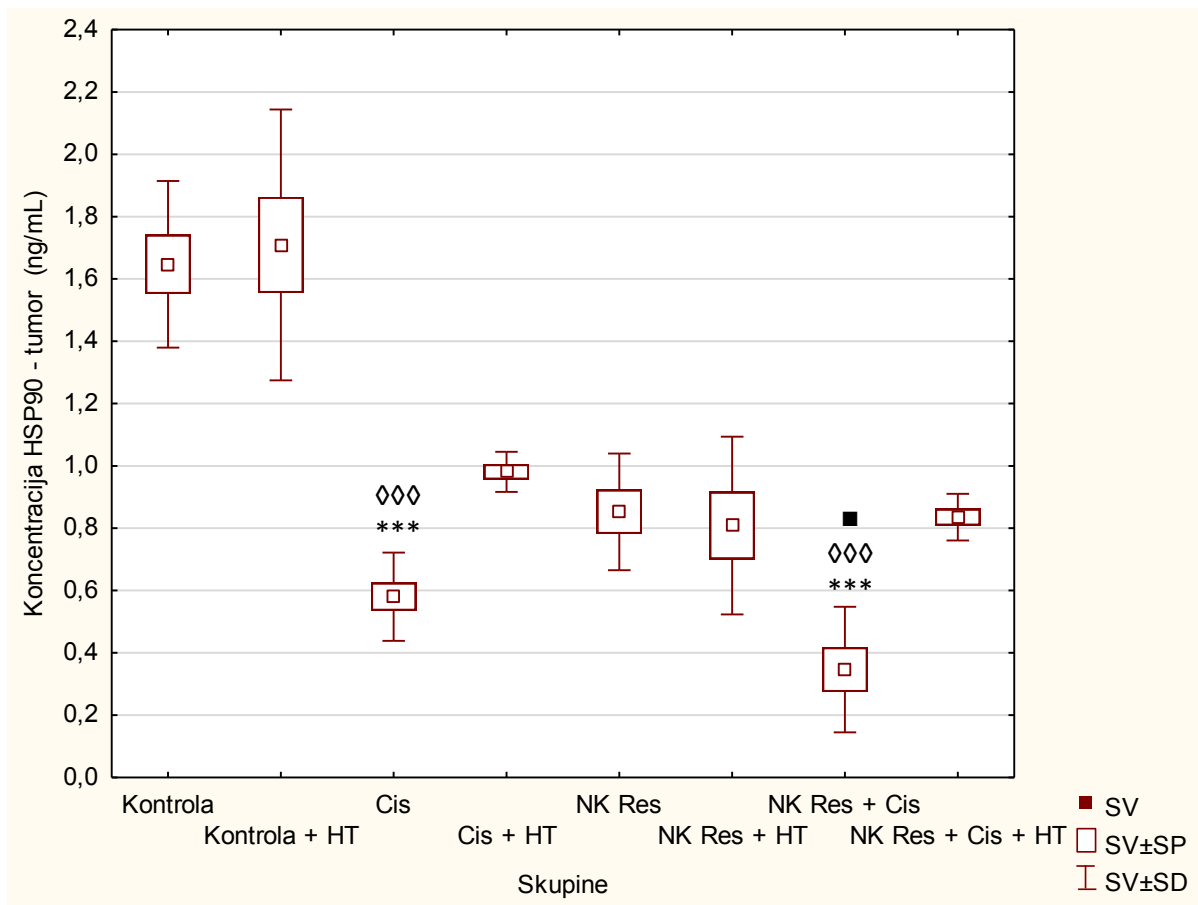
**Slika 49.** Koncentracija HSP70 u tumoru u miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na Cis + HT (###  $p \leq 0,001$ ); ∇∇ Statistički značajno u odnosu na Cis (∇∇  $p \leq 0,01$ ); # Statistički značajno u odnosu na NK Res (####  $p \leq 0,001$ ); • Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (\*  $p \leq 0,05$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

Rezultati mjerenja koncentracije HSP90 u uzorcima tkiva tumora (Slika 50) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije HSP90 u skupini miševa obrađenoj cisplatinom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,001$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena nanokristalima resveratrola i cisplatinom pokazuje

statistički značajno smanjenje koncentracije HSP90 u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,001$ ), kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ) i skupinu miševa obrađenu cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ).



**Slika 50.** Koncentracija HSP90 u tumoru u miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SD (SP). \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $***p \leq 0,001$ ); ◇ Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $◇◇◇p \leq 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na Cis + HT ( $■p \leq 0,05$ )

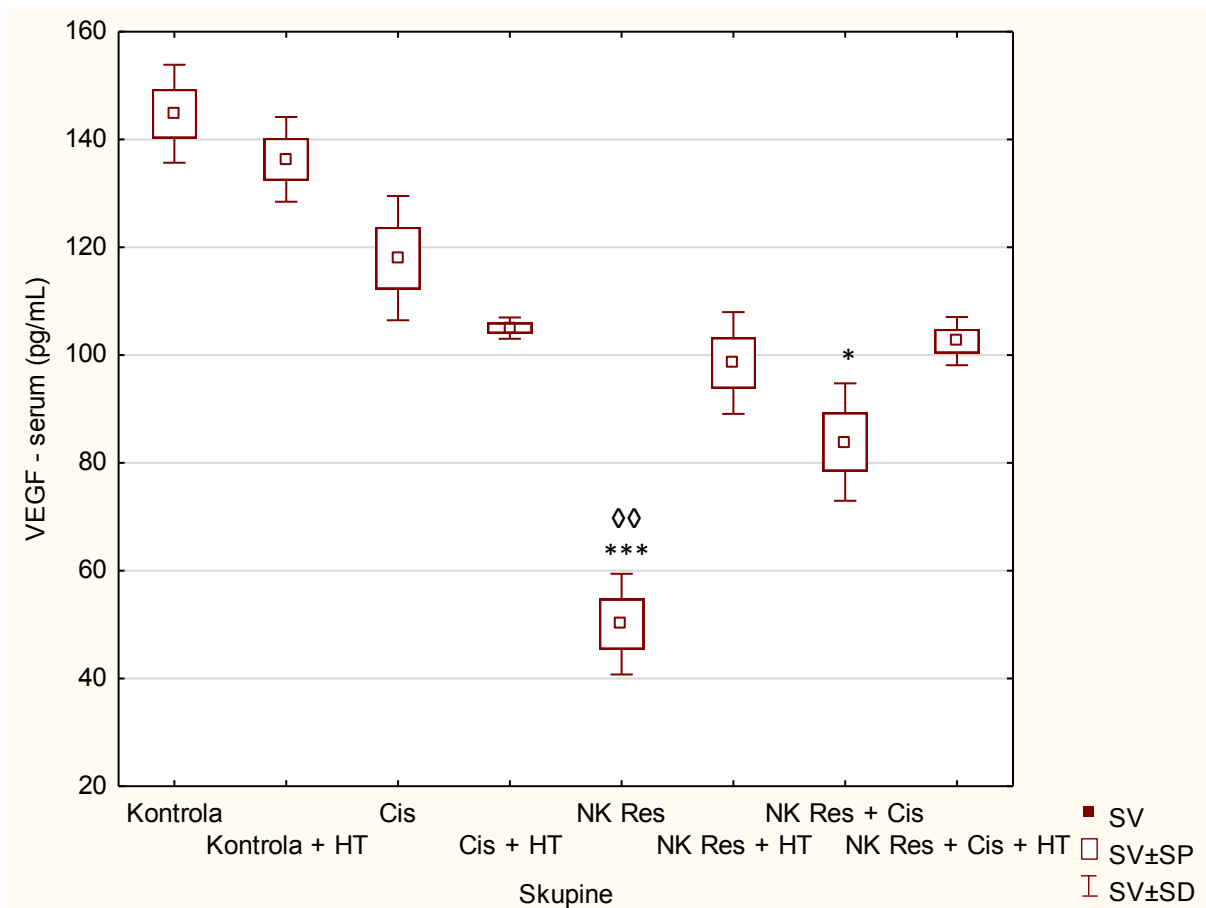
Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.



#### ***4.5.6. Razina VEGF u uzorcima seruma i tumora miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima***

Rezultati mjerenja koncentracije VEGF-a u uzorcima seruma miševa (Slika 51) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije VEGF-a u skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,001$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). Skupina miševa obrađena nanokristalima resveratrola i cisplatinom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije VEGF u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ ).

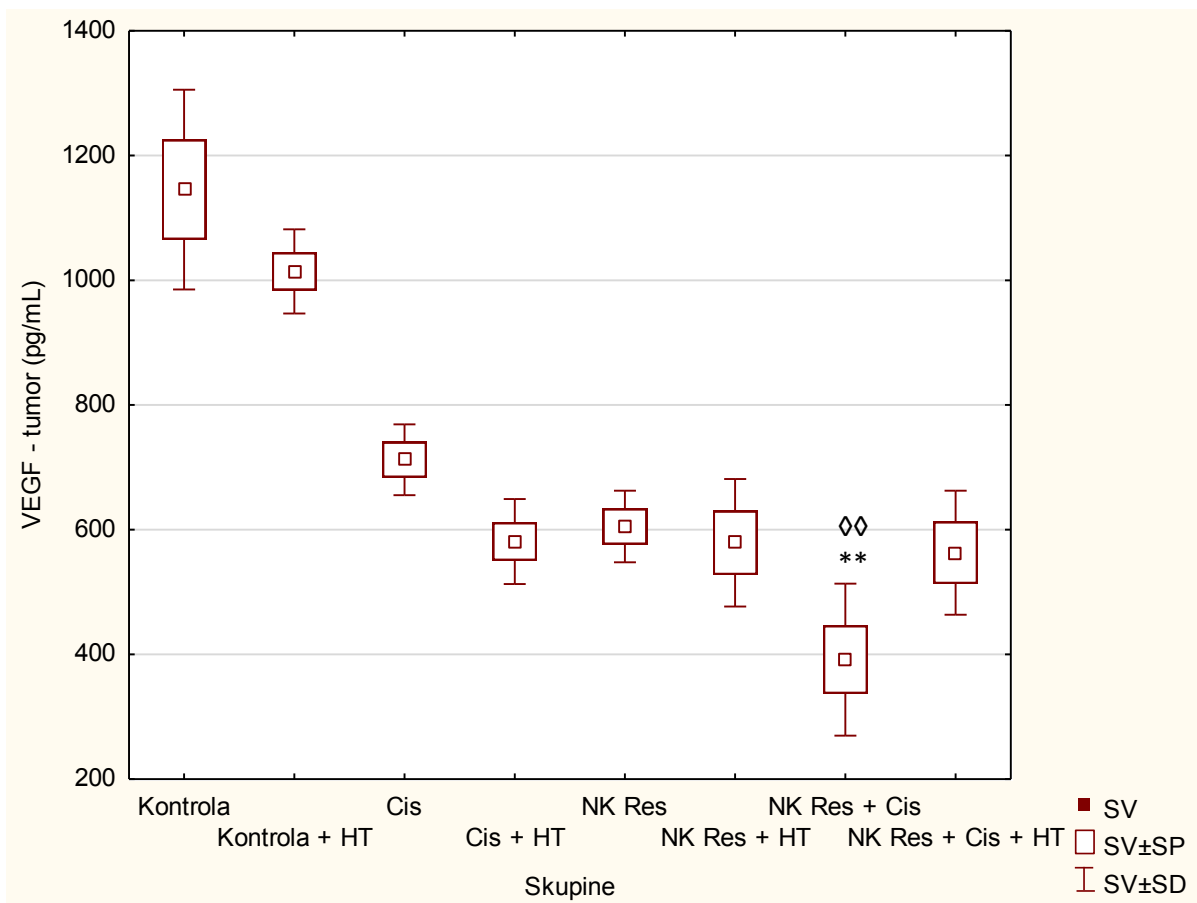
Rezultati mjerenja koncentracije VEGF u uzorcima tumora miševa (Slika 52) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije VEGF-a u skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola i cisplatinom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ).



**Slika 51.** Koncentracija VEGF-a u serumu miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N = 5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatinu injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ); ◇ Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (◇◇  $p \leq 0,01$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatinu u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatinu u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.



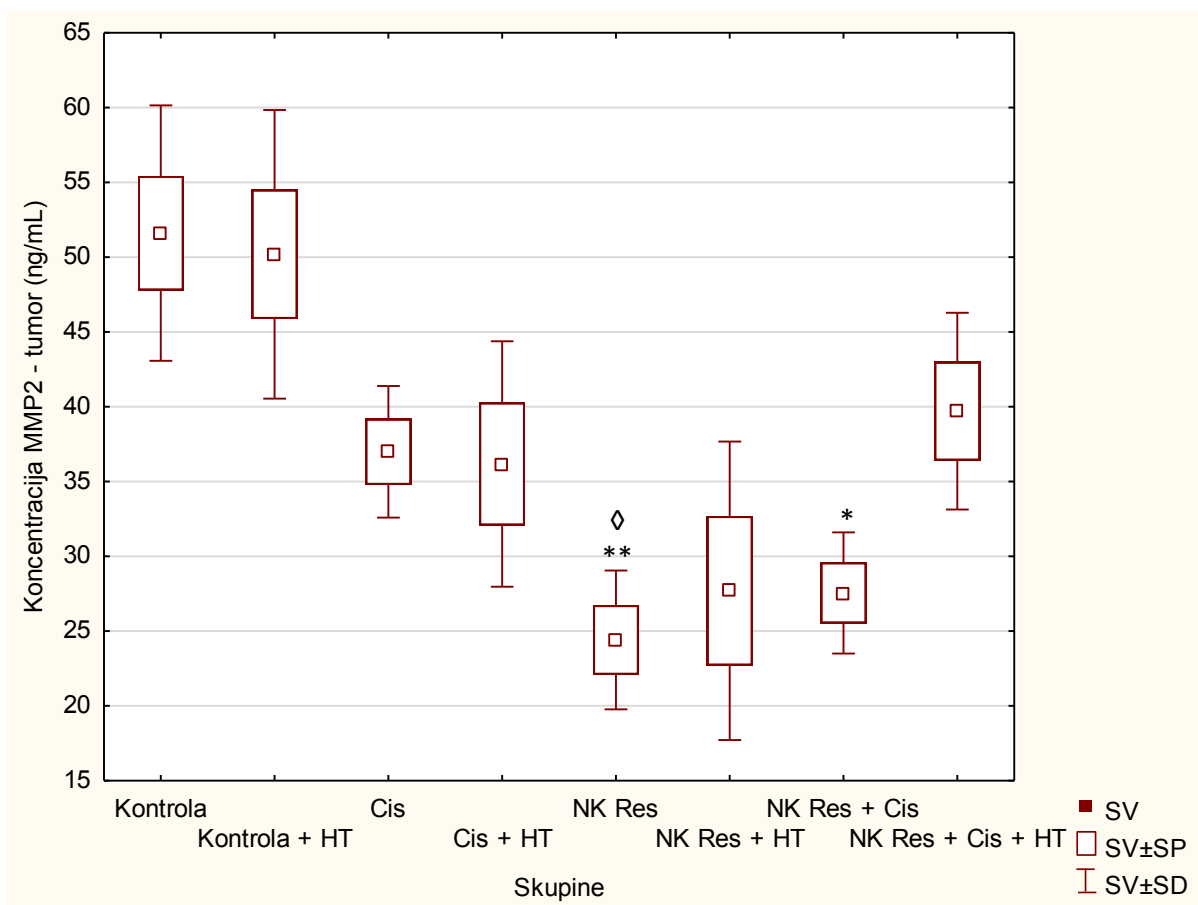
**Slika 52.** Koncentracija VEGF-a u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injecirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $**p \leq 0,01$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond p \leq 0,01$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### ***4.5.7. Razina MMP-2 i MMP-9 u uzorcima tkiva tumora obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima***

Rezultati mjerenja koncentracije MMP-2 u uzorcima tkiva tumora (Slika 53) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije MMP-2 u skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola u odnosu na kontrolnu skupinu miševa ( $p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu obrađenu hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije MMP-2 u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ ).



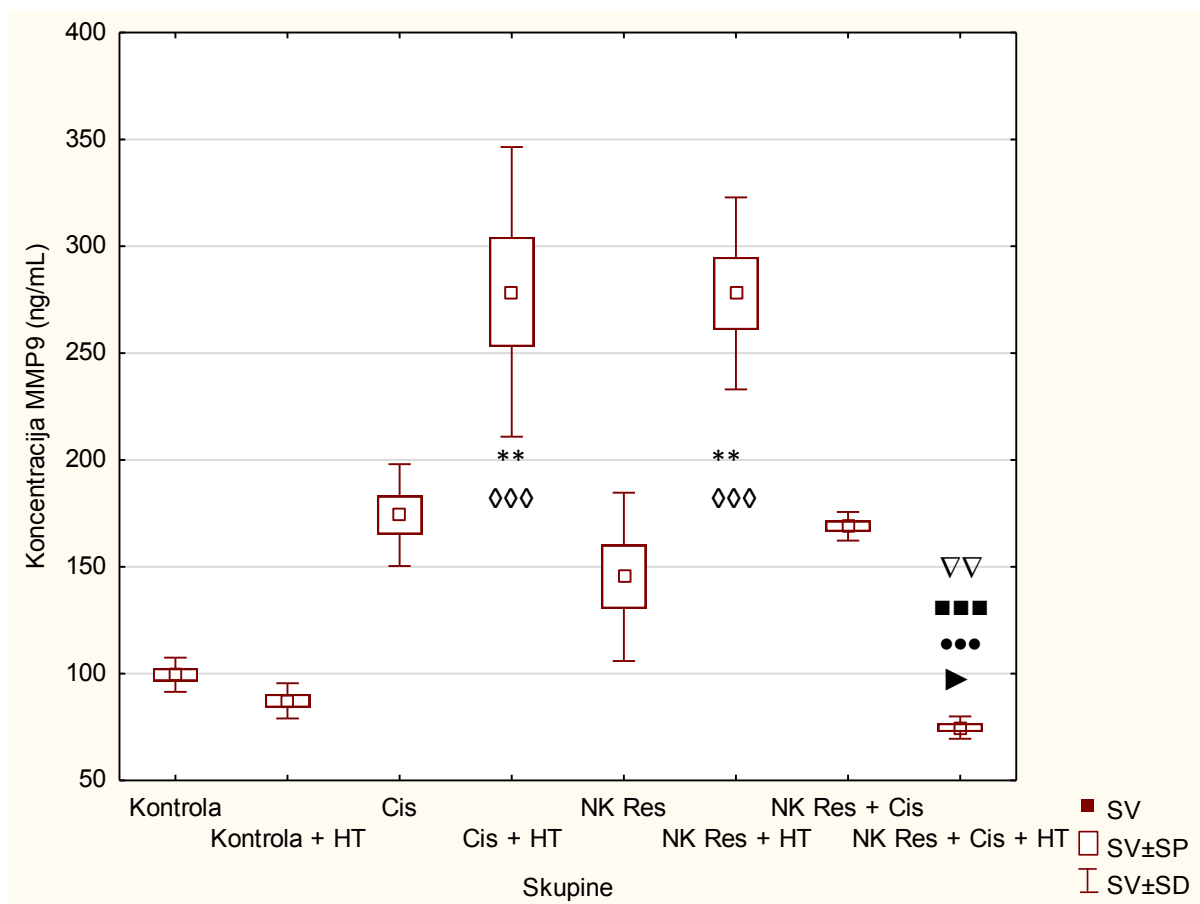
**Slika 53.** Koncentracija MMP-2 u tumoru miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N = 5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatinu injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $**p \leq 0,01$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $^{\diamond}p \leq 0,05$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatinu u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatinu u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

Rezultati mjerenja koncentracije MMP-9 u uzorcima tkiva tumora (Slika 54) pokazuju da postoji statistički značajno povećanje koncentracije MMP-9 u skupini miševa obrađenoj cisplatinom i hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). U skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola i hipertermijom postoji statistički značajno povećanje koncentracije MMP-9 u odnosu na

kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). U skupini miševa obrađenoj nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom postoji statistički značajno smanjenje koncentracije MMP-9 u odnosu na skupinu miševa obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,01$ ), cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ), nanokristalima resveratrola i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ) i nanokristalima resveratrola i cisplatinom ( $p \leq 0,05$ ).



**Slika 54.** Koncentracija MMP9 u miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N = 5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP). \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $** p \leq 0,01$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond\diamond\diamond p \leq 0,001$ );  $\nabla$  Statistički značajno u odnosu na Cis ( $\nabla\nabla p \leq 0,01$ );  $\blacksquare$  Statistički značajno u odnosu na Cis + HT ( $\blacksquare\blacksquare\blacksquare p \leq 0,001$ );  $\bullet$  Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT ( $\bullet\bullet\bullet p \leq 0,001$ );  $\blacktriangleright$  Statistički značajno u odnosu na NK Res + Cis ( $\blacktriangleright p \leq 0,05$ )

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### ***4.5.8. Učinak kombinacije nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije na gustoću mikrožilja (MVD) miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Zanimljivo je da NK Res sa i/ili bez hipertermije (Tablica 16) ima snažan antiangiogeni potencijal koji se podudara s razinom angiogenog čimbenik VEGF-a i njegovog proteolitičkog otpuštanje MMP-2. Predobrada s NK Res sa i/ili bez hipertermije statistički značajno smanjuje gustoću krvožilja u solidnom EAT tumoru u odnosu na kontrolnu skupinu (obje,  $p < 0,001$ ) i kontrola + HT (obje,  $p < 0,05$ ). Kombinacija NK Res + Cis sa i/ili bez hipertermije pokazuje slabiji učinak u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). Obrada s Cis pri fiziološkim ili hipertermijskim uvjetima je također bila značajna u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ).

Spontane mikrometastaze nisu zapažene u plućima u pokusnim skupinama, osim nekoliko pojedinačnih malih metastaza na rubu pluća (podaci nisu prikazani).

**Tablica 16.** Brojanje gustoće mikrožilja (MVD) u miševa nositelja solidnog oblika EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i njihovom kombinacijom u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Pokusna skupina <sup>a</sup>	Broj krvnih žila	Raspon	
	(SV ± SP)	Minimum	Maksimum
Kontrola	11,14 ± 0,90	6	21
Kontrola + HT	9,36 ± 0,74	4	18
Cis	6,82 ± 0,49 <sup>**</sup>	2	13
Cis + HT	6,89 ± 0,51 <sup>*</sup>	2	10
NK Res	5,86 ± 0,55 <sup>***</sup>	3	11
NK Res + HT	5,90 ± 0,61 <sup>***</sup>	3	13
NK Res + Cis	6,55 ± 0,73 <sup>**</sup>	3	16
NK Res + Cis + HT	7,10 ± 0,69 <sup>*</sup>	3	16

<sup>a</sup>Nakon subkutane (*sc*) injekcije  $1 \times 10^6$  stanica EAT, miševi (N=10 po skupini) su obrađeni dozom od 50 mg/kg nanokristala resveratrola tijekom 5 uzastopnih dana počevši od drugog dana nakon injekcije, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg 10. i 12. dan, te u dozi od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± SP. \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$ ).

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

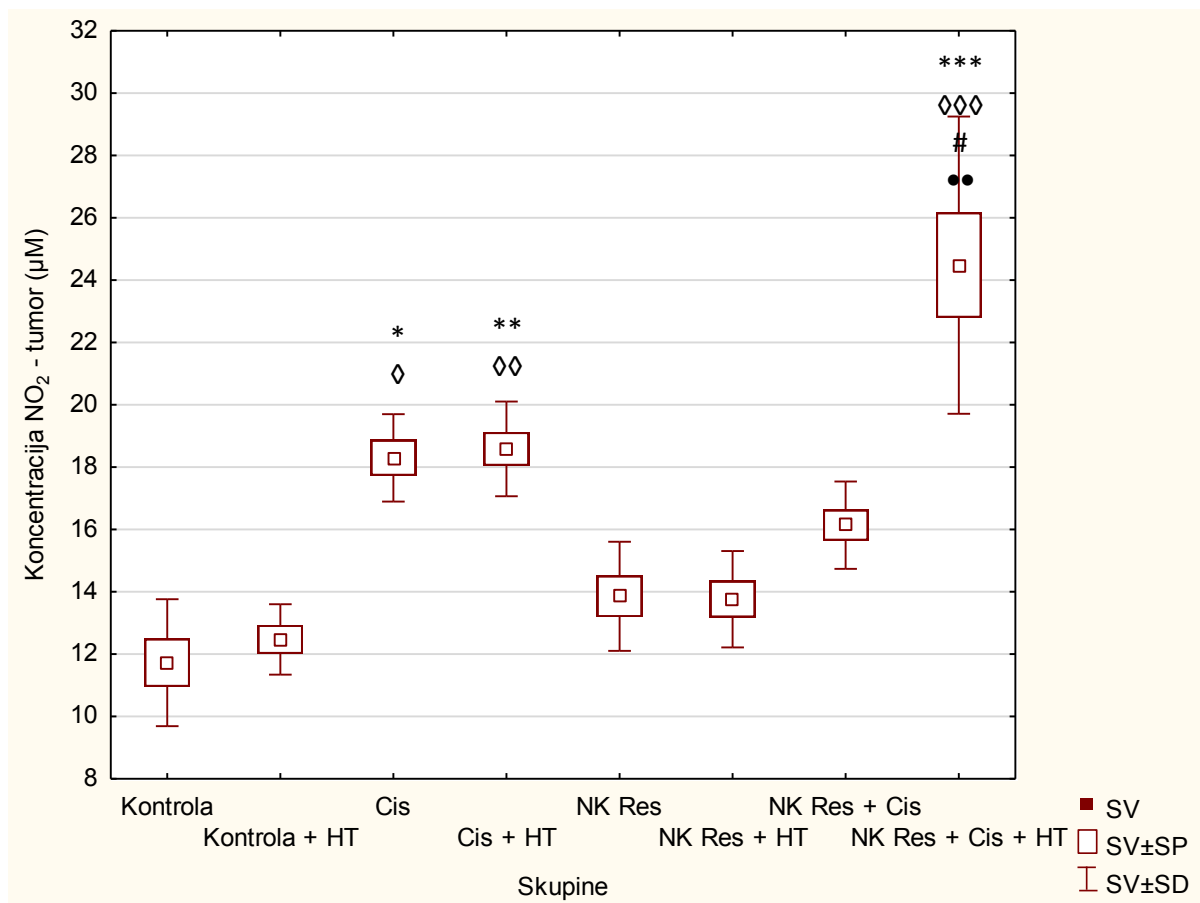


## **4.6. UČINAK KOMBINACIJE NANOKRISTALA RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE NA POLARIZACIJU MAKROFAGA U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-a**

### **4.6.1. Učinak kombinacije resveratrola, cisplatine i hipertermije na tumoricidnu aktivnost makrofaga u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a**

Tumorcidna aktivnost makrofaga u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a prikazana je na Slici 55 gdje je vidljivo da skupina obrađena nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom pokazuje najveću aktivnost razine NO u odnosu na druge skupine a potom slijedi cisplatin i cisplatin u kombinaciji s hipertermijom. Statistička značajnost postoji između skupine NK Res + Cis + HT i kontrolnih skupina (Kontrola i Kontrola + HT, obje  $p \leq 0,001$ ) te NK Res i NK Res + HT ( $p \leq 0,05$  i  $p \leq 0,01$ ). Obrada miševa s cisplatinom sa i/ili bez hipertermije je statistički značajna u odnosu na kontrolne skupine (Cis + HT vs. Kontrola,  $p \leq 0,01$ ; Cis + HT vs. Kontrola + HT,  $p \leq 0,01$ ) dok je obrada s Cis bez hipertermije u odnosu na obje kontrolne skupine bila ( $p \leq 0,05$ ).

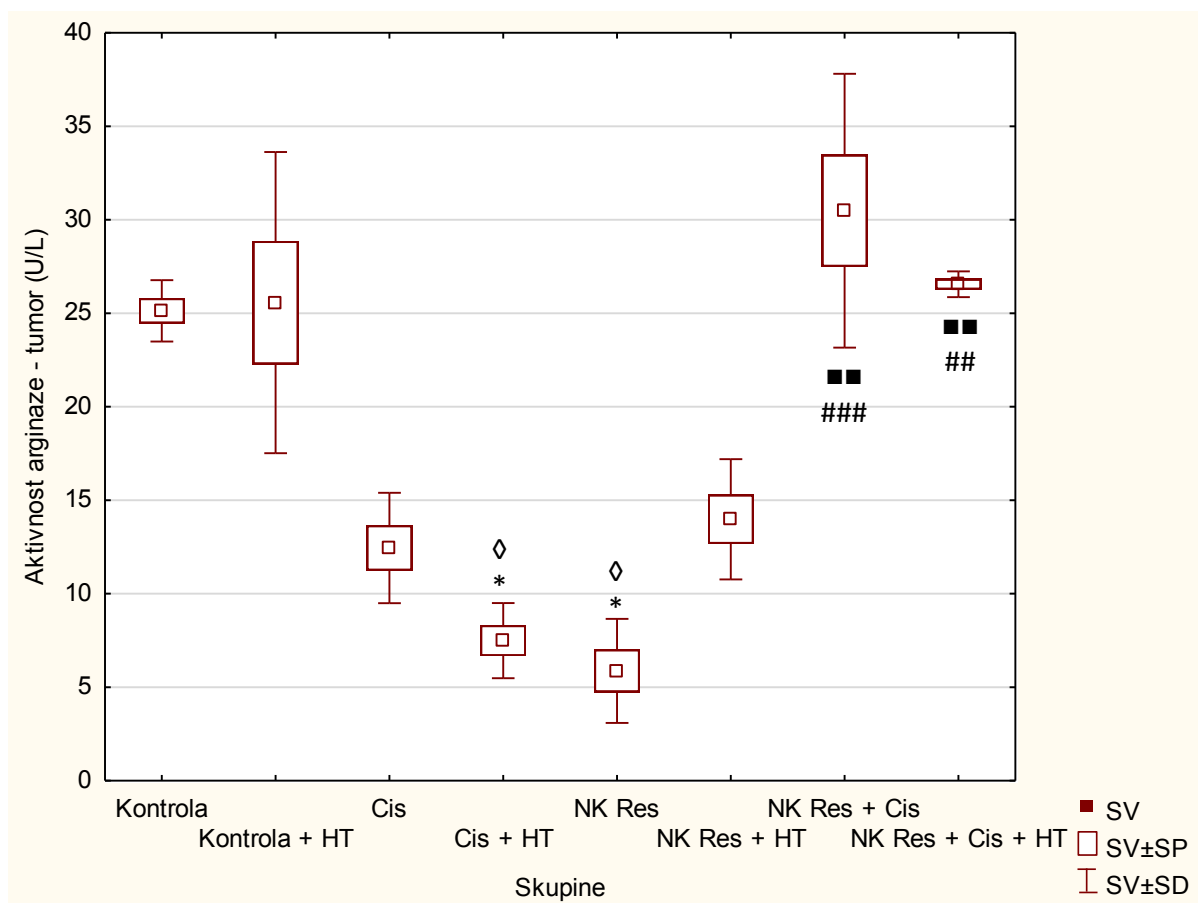
Nasuprot tome, zanimljivo je da aktivnost arginaze (Slika 56) nije promjenjena u odnosu na kontrolu kod NK Res + Cis + HT i NK Res + Cis ali je statistički značajno viša u odnosu na Cis + HT i NK Res ( $p \leq 0,01$ ) dok ove dvije skupine pokazuju značajnu inhibiciju aktivnosti arginaze u odnosu na kontrolne skupine ( $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,05$ ).



**Slika 55.** Koncentracija  $\text{NO}_2$  u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N = 5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatinu injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP). \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ); ° Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (°  $p \leq 0,05$ ; °°  $p \leq 0,01$ ; °°°  $p \leq 0,001$ ); # Statistički značajno u odnosu na NK Res (#  $p \leq 0,05$ ); • Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (•  $p \leq 0,01$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatinu u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatinu u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.



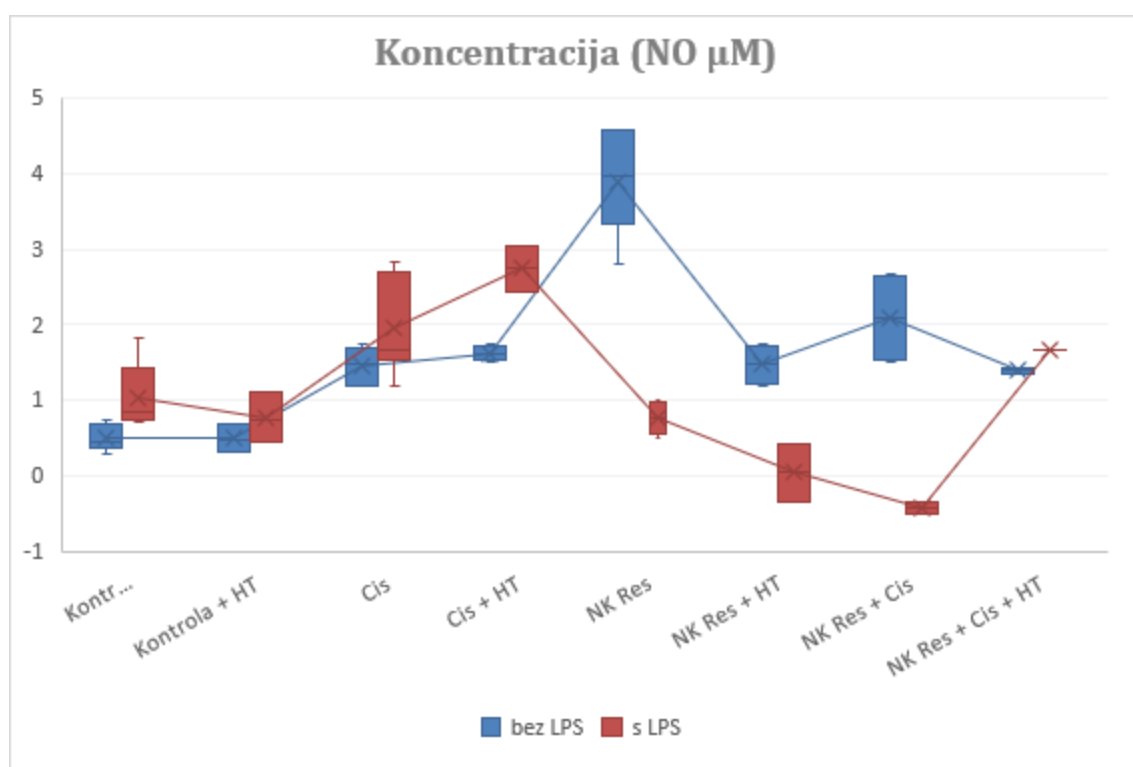
**Slika 56.** Aktivnost arginaze u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N = 5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). \*Statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $* p \leq 0,05$ );  $\diamond$  Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ( $\diamond p \leq 0,05$ );  $\blacksquare$  Statistički značajno u odnosu na Cis + HT ( $**p \leq 0,01$ ); # Statistički značajno u odnosu na NK Res ( $## p \leq 0,01$ ,  $### p \leq 0,001$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatin u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### 4.6.2. Učinak kombinacija resveratrola, cisplatina i hipertermije na tumor-icidnu aktivnost makrofaga slezene miševa nositelja solidnog oblika EAT-a

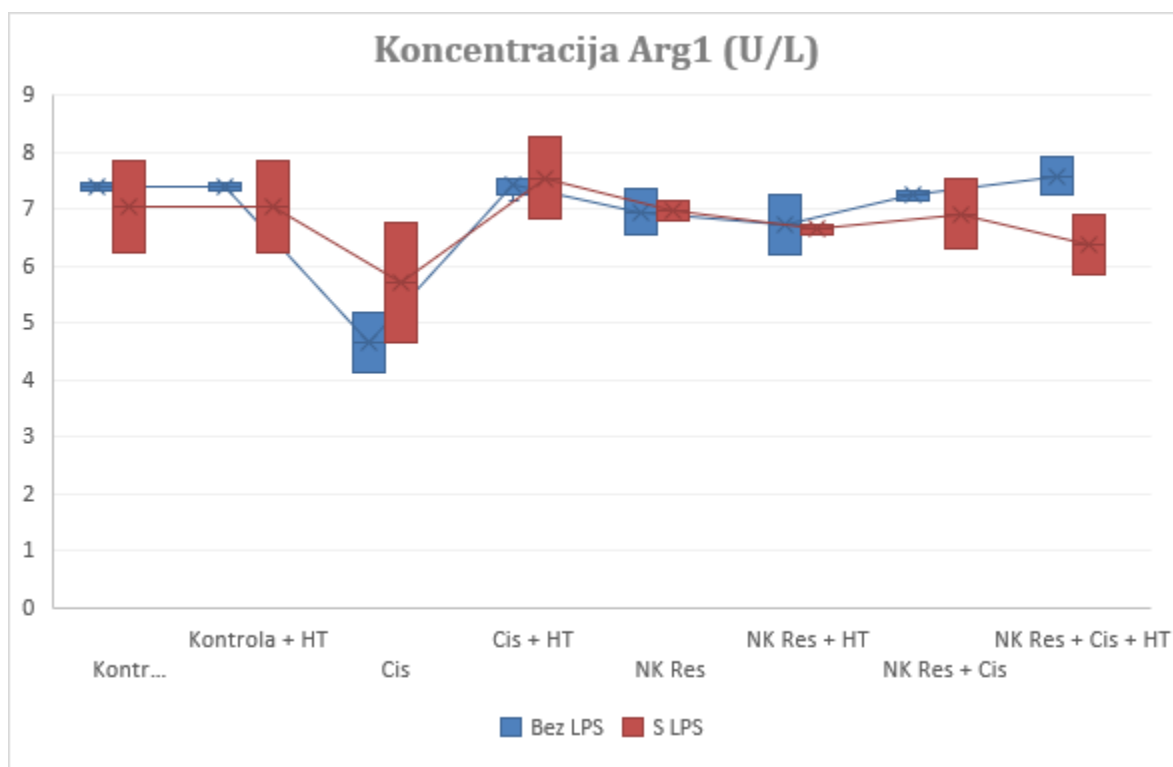
Na Slici 57 prikazani su rezultati mjerenja dušikova(II) oksida (NO) indirektnom Griessovom metodom u uzorcima nadtaloga sa i/ili bez LPS-om stimuliranih makrofaga slezene gdje je vidljiva značajna stimulatorna aktivnost NK Res i snažni protuupalni učinak. Cisplatina pokazuje aktivnost u stimulaciji makrofaga tijekom upale posebice u hipertermijskim uvjetima. Nasuprot tome nisu vidljiva značajna odstupanja u aktivnosti Arg1, osim blage inhibicije s Cis (Slika 58).



**Slika 57.** Koncentracija NO<sub>2</sub> u nadtalogu makrofaga slezene miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (sc) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (ip) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV  $\pm$  SD (SP).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.



**Slika 58.** Koncentracija Arg1 u nadtalogu makrofaga slezene miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi ( $N=5$ ) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg tijekom 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

## **4.7. ANTIOKSIDATIVNE/PROOKSIDATIVNE ZNAČAJKE KOMBINACIJA NANOKRISTALA RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-a**

### ***4.7.1. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva tumora, bubrega i jetre miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima***

#### **4.7.1.1. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva tumora miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva tumora (Tablica 17) pokazuju da postoji statistički značajno povećanje koncentracije MDA u skupini miševa obrađenoj NK Res u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ) i skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena NK Res i hipertermijom kao i skupina obrađena cisplatinom i hipertermijom pokazuju statistički značajno povećanje koncentracije MDA u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena NK Res, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u odnosu na skupinu obrađenu NK Res ( $p \leq 0,01$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije GSH u uzorcima tkiva tumora (Tablica 17) pokazuju da postoji statistički značajno povećanje koncentracije GSH u odnosu na skupinu miševa obrađenu cisplatinom u skupini miševa obrađenoj NK Res ( $p \leq 0,01$ ), cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ) i NK Res s cisplatinom ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena NK Res s hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ) i skupinu obrađenu NK Res ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena NK Res, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije CAT u uzorcima tkiva tumora (Tablica 17) pokazuju da postoji statistički značajno povećanje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu i kontrolnu skupinu s hipertermijom u skupini miševa obrađenoj cisplatinom i hipertermijom ( $p$

$\leq 0,001$ ) i skupini miševa obrađenoj NK Res, cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). U skupini miševa obrađenoj NK Res i hipertermijom postoji statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ).

**Tablica 17.** Koncentracija MDA i GSH te CAT aktivnosti u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Skupine <sup>a</sup>	TUMOR (SV±SP)		
	MDA (nmol/mg proteina)	GSH (mU/mg proteina)	CAT (U/mg proteina)
Kontrola	2,15±0,57	210,73±3,02	2,67± 0,27
Kontrola + HT	1,59±0,34	207,10±5,81	2,66±0,33
NK Res	4,57±0,27 <sup>◇◇◇□□□</sup>	233,09±8,92 <sup>□□</sup>	5,01±0,50
NK Res + HT	3,68±1,03 <sup>□</sup>	180,39±7,17 <sup>■●●#</sup>	3,35±0,13 <sup>■●</sup>
Cis	0,92±0,07	176,21 ±9,38	4,80±0,48
Cis + HT	3,68±0,14 <sup>□</sup>	255,73±8,56 <sup>□□□</sup>	6,42±0,22 <sup>*** ◇◇◇</sup>
NK Res + Cis	3,35±0,70	235,36±12,89 <sup>□</sup>	3,60±0,25
NK Res + Cis + HT	1,40±0,47 <sup>###</sup>	192,56±11,92 <sup>■</sup>	5,67±0,23 <sup>** ◇◇</sup>

<sup>a</sup>Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP). \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ); <sup>◇</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (<sup>◇◇</sup>  $p \leq 0,01$ , <sup>◇◇◇</sup>  $p \leq 0,001$ ); <sup>▽</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis (<sup>▽</sup>  $p \leq 0,05$ , <sup>▽▽</sup>  $p \leq 0,01$ , <sup>▽▽▽</sup>  $p \leq 0,001$ ); <sup>■</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis + HT (<sup>■</sup>  $p \leq 0,05$ , <sup>■●</sup>  $p \leq 0,01$ , <sup>■●●</sup>  $p \leq 0,001$ ); # Statistički značajno u odnosu na NK Res (<sup>#</sup>  $p \leq 0,05$ , <sup>##</sup>  $p \leq 0,01$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### **4.7.1.2. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva jetre miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva jetre (Tablica 18) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u skupini miševa obrađenoj NK Res u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,001$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena NK Res i hipertermijom pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije MDA u odnosu na skupinu obrađenu NK Res ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena cisplatinom i skupina miševa obrađena NK Res s cisplatinom pokazuju statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ ) i kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije GSH u uzorcima tkiva jetre (Tablica 18) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u skupini miševa obrađenoj NK Res u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ). U skupini miševa obrađenoj cisplatinom postoji statistički značajno povećanje koncentracije GSH u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). U skupini miševa obrađenoj NK Res i cisplatinom postoji statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,01$ ). U skupini miševa obrađenoj NK Res s cisplatinom i hipertermijom postoji statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije CAT u uzorcima tkiva jetre (Tablica 18) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u skupini miševa obrađenih NK Res u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ) i cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). U skupini miševa obrađenoj NK Res s hipertermijom postoji statistički značajno povećanje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ) i skupinu obrađenu NK Res ( $p \leq 0,001$ ). U skupini miševa obrađenoj cisplatinom postoji statistički značajno povećanje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). U skupini miševa obrađenoj cisplatinom i hipertermijom postoji statistički značajno povećanje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). U skupini miševa obrađenoj NK Res s cisplatinom i hipertermijom postoji statistički značajno



smanjenje koncentracije CAT u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,01$ ), cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,05$ ) i skupinu obrađenu NK Res i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ).

**Tablica 18.** Koncentracija MDA i GSH te CAT aktivnost u tkivu jetre miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Skupine <sup>a</sup>	JETRA (SV±SP)		
	MDA (nmol/mg proteina)	GSH (mU/mg proteina)	CAT (U/mg proteina)
Kontrola	8,60±0,32	274,40±19,01	48,60±2,06
Kontrola + HT	8,49±0,46	237,31±10,60	35,08±1,73
NK Res	4,09±0,11 <sup>***</sup> ◇◇	239,38±21,70 <sup>□□□</sup>	34,98±3,14 <sup>□□□■</sup>
NK Res + HT	7,16±0,42 <sup>#</sup>	279,99±15,99	145,32±6,25 <sup>◇◇◇###</sup>
Cis	4,96±0,17 <sup>*◇</sup>	406,89±9,45 <sup>◇◇◇</sup>	149,44±3,84 <sup>◇◇◇</sup>
Cis + HT	6,82±0,58	277,42±8,93	129,30±10,79 <sup>◇◇</sup>
NK Res + Cis	4,86±0,29 <sup>*◇</sup>	262,74±11,59 <sup>□□</sup>	40,97±2,80
NK Res + Cis + HT	5,68±0,19	236,90±8,77 <sup>□□□</sup>	111,27±3,28 <sup>□□□■●</sup>

<sup>a</sup>Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatin injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP). \* Statistički značajno u odnosu na kontrolu (\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ); ◇ Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (◇ $p \leq 0,05$ , ◇◇ $p \leq 0,01$ , ◇◇◇ $p \leq 0,001$ ); ▽ Statistički značajno u odnosu na Cis (▽ $p \leq 0,01$ , ▽▽ $p \leq 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na Cis + HT (■ $p \leq 0,05$ , ■■ $p \leq 0,01$ ); # Statistički značajno u odnosu na NK Res (# $p \leq 0,05$ , ### $p \leq 0,001$ ); \* Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (\*\* $p \leq 0,01$ )

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatin u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

#### **4.7.1.3. Biljezi oksidacijskog stresa u uzorcima tkiva bubrega miševa obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima**

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva bubrega (Tablica 19) pokazuju da postoji statistički značajno povećanje koncentracije MDA u skupini miševa obrađenoj NK Res s hipertermijom u odnosu na skupinu miševa obrađenu cisplatinom ( $p \leq 0,001$ ) i skupinu obrađenu cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ). Skupina miševa obrađena NK Res, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u odnosu na skupinu obrađenu NK Res i hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ), skupinu obrađenu NK Res ( $p \leq 0,05$ ) i kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ ).

Rezultati mjerenja koncentracije CAT u uzorcima tkiva bubrega (Tablica 19) pokazuju da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u kontrolnoj skupini miševa s hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ ). Skupina miševa obrađena NK Res pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađena NK Res, cisplatinom i hipertermijom pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije CAT u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,001$ ), skupinu obrađenu cisplatinom i hipertermijom ( $p \leq 0,01$ ) i skupinu obrađenu NK Res ( $p \leq 0,001$ ).

Iz Tablica 19 vidljivo je da razina GSH u tkivu bubrega u odnosu na kontrolne skupine bila statistički najniža u skupini NK Res + Cis + HT i NK Res (obje  $p \leq 0,001$ ,  $p \leq 0,001$ ), potom u skupini NK Res + HT i Cis + HT (obje  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,01$ ) te u skupini NK Res + Cis samo u odnosu na fiziološku kontrolu ( $p \leq 0,05$ ).

**Tablica 19.** Koncentracija MDA i GSH te CAT aktivnosti u tkivu bubrega miševa nositelja solidnog EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima.

Skupine <sup>a</sup>	BUBREG (SV±SP)		
	MDA (nmol/mg proteina)	GSH (mU/mg proteina)	CAT (U/mg proteina)
Kontrola	6,38±0,21	195,82±3,52	62,46±1,20
Kontrola + HT	4,50±0,30 <sup>□□□■</sup>	168,30±3,43	36,67±2,08 <sup>*</sup>
NK Res	6,82±0,30	85,32±5,52 <sup>***◇◇◇</sup>	94,04±8,51 <sup>◇◇◇</sup>
NK Res + HT	8,45±0,21	105,51±8,72 <sup>**◇◇</sup>	93,08±5,57
Cis	3,42±0,27	158,69±7,67	48,32±1,75
Cis + HT	4,21±0,79	108,14±9,33 <sup>**◇◇</sup>	81,08±2,81
NK Res + Cis	4,70±0,17	139,14±9,80 <sup>*</sup>	84,25±2,68
NK Res + Cis + HT	2,99±0,28 <sup>***#*</sup>	70,95±6,38 <sup>***◇◇◇</sup>	61,39±2,65 <sup>***■###</sup>

<sup>a</sup>Nakon subkutanog (*sc*) injiciranja  $1 \times 10^6$  EAT stanica, miševi (N=5) su obrađeni sa nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg kroz 5 dana u nizu počevši od drugog dana od injiciranja, dok je cisplatina injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi 2,5 mg/kg na 10. i 12. dan i sa dozom od 5 mg/kg na 15. dan. Skupine obrađene hipertermijom bile su izložene sustavnoj hipertermiji u trajanju 15 minuta na temperaturi 41 °C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).<sup>\*</sup> Statistički značajno u odnosu na kontrolu (<sup>\*</sup>  $p \leq 0,05$ , <sup>\*\*\*</sup>  $p \leq 0,001$ ); <sup>▽</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis (<sup>▽▽▽</sup>  $p \leq 0,001$ ); <sup>■</sup> Statistički značajno u odnosu na Cis + HT (<sup>■</sup>  $p \leq 0,01$ ); <sup>#</sup> Statistički značajno u odnosu na NK Res (<sup>#</sup>  $p \leq 0,05$ , <sup>###</sup>  $p \leq 0,001$ ); <sup>\*</sup> Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (<sup>\*\*\*</sup>  $p \leq 0,001$ ).

Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatina u dozi od od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatine u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

## **4.8. PROCJENA RAZINE OŠTEĆENJA KOMBINACIJE NANOKRISTALA RESVERATROLA, CISPLATINE I HIPERTERMIIJE U BALB/C MIŠEVA NOSITELJA SOLIDNOG OBLIKA EAT-A**

### ***4.8.1. Učinak nanokristala resveratrola, cisplatina i hipertermije na histološke i imunohistokemijske promjene u tumorskom tkivu miševa nositelja solidnog oblika EAT-a***

Histološkim pregledom uočili smo centralnu nekrozu na svim uzorcima solidnog EAT tumora. Tumorska masa solidnog EAT u uzorku neobrađenih miševa (kontrola) pokazuje najniži postotak nekroze (oko 50% mase) u odnosu na uzorke u skupinama obrađenih miševa gdje nekroza obuhvaća čak do 90% dok su na periferiji tumorske mase nalaze stanice u proliferaciji. Stupanj proliferacije tumorskih stanica određen je imunohistokemijskom izraženošću biljega proliferacije (PCNA) i vrlo je visok u svim uzorcima (oko 90%).

Iako se uočavaju histološke razlike u izgledu tumorskih stanica te opsežnosti nekroze, nije moguće mjerljivo prikazati razlike među skupinama. Unutar tumorske mase rijetko uočavamo krvne žile koje su također više smještene po periferiji tumora, u zoni njegovog rasta. Unutar tumorske mase vidljive su opsežna krvarenja te velika područja nekroze i ostatnog staničnog detritusa. Tumorske stanice imaju izgled slabo diferenciranih epitelnih stanica s velikim vezikularnim jezgrama i izraženom nukleolima, brojnim mitozama te eozinofilnom citoplazmom.

Kvantitativna analiza intenziteta imunohistokemijskog bojenja prikazane na Slici 59 prema računalnoj metodi od Fu i sur. (2015.) prikazana je na Slici 60.

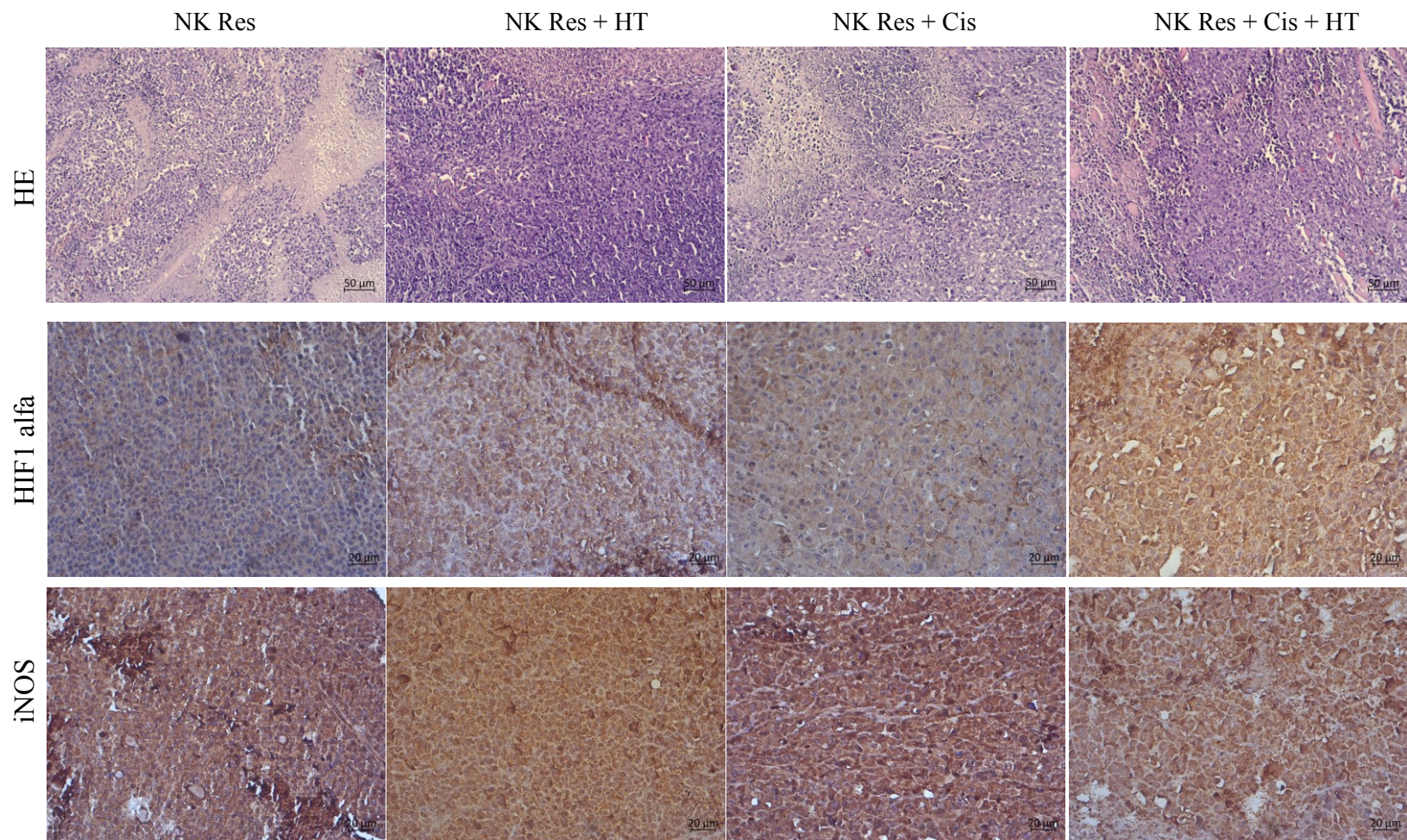
Slijed najvećeg intenziteta obojenja za iNOS (Slika 60a) praćenog kao BN jedinica te statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu je naveden kako slijedi: Cis + HT (8,66;  $p \leq 0,001$ ); Cis (13,47;  $p \leq 0,001$ ); NK Res + HT (17,30;  $p \leq 0,001$ ); NK Res + Cis (28,79;  $p \leq 0,001$ ); NK Res (37,91), NK Res + Cis + HT (35,34) dok je vrijednost Kontrole i Kontrole + HT bila (71,41; 36,94).

Statistička značajnost iNOS u odnosu na kontrolnu skupinu pri hipertermalnim uvjetima vidljiva je u obradi miševa s Cis i Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,001$ ). Također postoje statističke

razlike u skupni NK Res u odnosu na Cis i Cis + HT ( $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,001$ ) te NK Res + Cis + HT u odnosu na Cis i Cis + HT ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,001$ ).

BN vrijednosti inteziteta obojenja HIF čimbenika (Slika 60b) te značajnosti prema kontrolnoj skupini od najviše prema nižoj vrijednosti su: Cis + HT (20,67;  $p \leq 0,001$ ), NK Res + Cis + HT (24,54;  $p \leq 0,001$ ), NK Res + HT (46,10;  $p \leq 0,001$ ); NK Res + Cis (46,83;  $p \leq 0,001$ ) i NK Res (58,13) dok su vrijednosti kontrolnih skupina sa i/ili bez hipertermije bile (54,57; 110,55).

Cis + HT je statistički različita u odnosu na Kontrola + HT ( $p \leq 0,001$ ) te Cis ( $p \leq 0,001$ ). Skupina miševa obrađene s NK Res + HT, NK Res + Cis i NK Res + Cis + HT pokazuju statističku razliku u odnosu na Cis ( $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,001$ ).



**Slika 59.** Fotomikrografije histoloških uzoraka tkiva tumora solidnog oblika EAT obrađenih nanokristalima resveratrola, cisplatinom i kombinacijom istih u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima kao i imunohistokemijske reakcije za hipoksijom inducirani čimbenik transkripcije – 1alfa (HIF-1 $\alpha$ ) i inducibilnu dušikov oksid sintazu (iNOS) u tkivu tumora miševa nositelja solidnog EAT.

Ekspresija HIF-1 $\alpha$  pokazala je umjerenu citoplazmatsku ekspresiju u skupinama NK Res, NK Res + HT i NK Res+ Cis i Cis + HT sa sporadičnim bojenjem jezgre u skupini tobrađenoj Cis + HT i NK Res + Cis + HT. Imunohistokemijska reakcija iNOS-a pokazala je umjerenu citoplazmatsku reakciju izraženiju u skupinama tretiranim Cis + HT, Cis, i NK Res + HT. Napravljene su reprezentativne fotomikrografije imunohistokemijskih stakalca (N=5). Kratice: NK Res - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis - cisplatinu u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; NK Res + Cis - otopina nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg i cisplatinu u dozi od 2,5 i 5 mg/kg; HT - hipertermija; HE - hematoxilin i eozin.





## § 5. RASPRAVA

Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz već postojećih i smatra se ključnom za rast tumora i metastaziranje. Rastući tumor treba razgranatu mrežu kapilara kako bi si osigurao hranjive tvari i kisik. U tomu važnu ulogu imaju tumoru pridruženi makrofazi (TAM) koji obavljaju imunosupresivne uloge kroz: 1. osobađanje antiupalnih citokina; 2. moduliranja mikrookoliša tumora proizvodnjom čimbenika preživljavanja/rasta (primjerice, čimbenika rasta krvožilnog endotela, VEGF); 3. olakšavanja progresije tumora kroz otpuštanje proangiogenetskih čimbenika uključujući matriksne-metaloproteinaze -2 i -9, MMP-2 i MMP-9); 4. povećanje aktivnosti arginaze (Arg), a smanjenje aktivnosti inducibilne dušikov oksid sintaze (iNOS).

Glavne funkcije VEGF-a su promicanje preživljenja, induciranje proliferacije i povećanje migracije i invazije endotelnih stanica, što sveukupno doprinosi angiogenezi, a regulacija tih funkcija odvija se međureakcijom s receptorima tirozin kinaze i slanjem signala kroz različite nizvodne proteine. Transkripcija i ekspresija VEGF-A potaknuta je kao odgovor na hipoksiju, niski pH, aktiviranje onkogeni (npr. *RAS*, *SRC*, *EGFR*, *HER2*), alternativno cijepanje specifičnih tumor supresor gena (npr. *PTEN*, *P53*, *VHL*), različite upalne citokine i čimbenike rasta te hormone poput estrogena (Fontanella i sur., 2014; Shibuya, 2014). Transkripcijski čimbenici HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  stalno se proizvode, ali se HIF-1 $\alpha$  u uvjetima normoksije (aerobni uvjeti) razgrađuje proteosomima; pri visokoj koncentraciji kisika je labilan, dok je u uvjetima hipoksije stabiliziran (Hendrickson i O Poyton 2015.; Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.), a ovaj put ovisi o produktu gena Von Hippel-Lindau (Semenza 2013). HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  heterodimeriziraju s arilnim ugljikovodičnim nuklearnim translokatorom (HIF-1 $\beta$  ili 2 $\beta$ ) u jezgri pri čemu nastaje kompleks HIF-1  $\alpha/\beta$  koji se veže za regiju VEGF promotora/pojačivača čime se potiče oslobađanje VEGF-a i njegov izražaj u većini tipova stanica (Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). Indukcija hipoksije, posebno je karakteristična za VEGF-A u odnosu na ostale članove VEGF obitelji i druge angiogene čimbenike. Kao odgovor na hipoksiju, tumori luče angiogene čimbenike rasta kako bi stimulirali rast žila i opskrbu kisikom u čemu posreduje HIF-1 koji modulira ekspresiju brojnih hipoksijom

inducibilnih gena i angiogenih čimbenika kao što je VEGF. Transkripcija VEGF u uvjetima normoksije aktivirana je od strane mnogih onkogenih uključujući *H-RAS* i nekoliko transmembranskih tirozin kinaza kao što su receptor epidermalnog čimbenika rasta i ErbB2 (Semenza 2013.; Hendrickson i O Poyton 2015.; Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). Ovi putevi zajedno dovode do značajno pojačane regulacije VEGF-A u tumorima u odnosu na normalna tkiva i često su od prognostičke važnosti (Ramer i sur., 2018.). Prekomjerna ekspresija VEGF posredovana stabilizacijom HIF-1 $\alpha$  je otkrivena u mnogim tumorima i iz tog razloga krvožilje tumora jest važan cilj putem inhibicije VEGF bilo izravno ili neizravno te je atraktivna meta u razvoju novih lijekova protiv raka. Nadalje, povišena razina HIF-1 povezana je s povećanjem angiogeneze, agresivnim rastom tumora i lošom prognozom pacijenata što pobuđuje veliko zanimanje za HIF-1 kao obećavajući cilj u protutumorskoj terapiji. Točnije, HIF-1 čimbenik inducira transkripcijski čimbenik hipoksije, regulira ekspresiju brojnih gena uključenih u različite stanične signalne puteve, uključujući angiogenezu preko povećane ekspresije VEGF-a.

Nadalje, histon acetiltransferaze i deacetilaze (HDACs) igraju središnju ulogu u modifikaciji strukture kromatina i ekspresiji gena (Khan i sur., 2012.). Inaktivacija histon-acetiltransferaze povezana je s tumorigenezom (Bandolik i sur., 2019.). Predloženo je da je aberantna aktivnost HDAC ključni događaj u nastanku tumora, jer prekomjerna aktivnost HDAC-a neprimjereno potiskuje transkripciju tumor supresorskih gena (Zhang i sur., 2014.). Nadalje, hipoksični uvjeti reguliraju funkciju HDAC, izravno i neizravno, kroz posredovanje HDAC-a u kisikom regulirane ekspresije gena i hipoksijom-inducirane angiogeneze (Kim i sur., 2001.).

Kemikalije, visoka temperatura, slobodni radikali i mehanički stres mogu potaknuti reakciju proteina toplinskog šoka (HSP) čiju funkcionalnu aktivnost mogu regulirati HDAC inhibitori. Inhibitori HDAC proizvode izraženu inhibiciju ekspresije HIF-1 $\alpha$  i trenutno su u kliničkim ispitivanjima, djelomično zbog svojih snažnih antiangiogenih učinaka (Liang i sur., 2006.).

S ciljem poboljšanja mogućnosti liječenja raka, raste interes znanstvene zajednice za potencijalne terapijke koji potječu iz biogenih izvora s HDAC inhibitornim djelovanjem. Sukladno tome, pretpostavili smo da bi kombinacije prirodnih spojeva i kemoterapeutika mogle povećati osjetljivost stanica raka, prevladati otpornost, povećati citotoksičnost, poboljšati ishod liječenja i smanjiti nuspojave izazvane cisplatinom, kemoterapeutikom širokog spektra koji se koristi za liječenje brojnih neoplazmi. U ovom radu istražili smo resveratrol, prirodni spoj, za koji je potvrđeno da može inhibirati svih jedanaest ljudskih

HDAC-a klase I, II i IV na način ovisan o dozi te da inhibitori HDAC-a mogu imati više mehanizama indukcije zaustavljanja rasta stanica, angiogeneze i stanične smrti (Venturelli i sur., 2013.). Osim toga, resveratrol potiče acetilaciju p53 i tako povećava ekspresiju ciljanih gena p53 koji sudjeluju u staničnoj smrti i zaustavljanju rasta (Zhang i sur., 2005.; Venturelli i sur., 2013; Yang i sur. 2021; Chhabra i sur. 2021.). Prema Narita i sur. (2005.). Hipertermija i inhibitori HDAC mogu biti mogući modalitet za terapiju raka jer bi specifični inhibitori HDAC mogli pojačati antitumorske učinke hipertermije bez ozbiljnih nuspojava. Osim toga istražili smo i učinak nanokristala resveratrola na rast i angiogenezu Ehrlichovog solidnoga tumora u miša u s ciljem poboljšanja biofarmaceutskih značajki resveratrola (Davatgaran-Taghipour i sur., 2017.; Machado i sur. 2019.).

### ***5.1. Antiangiogeni potencijal sustavne hipertermije, cisplatine i resveratrola u inhibiciji rasta Ehrlichovog solidnog karcinoma u miša***

Hipertermija tumora snažan je terapijski pristup i kemoterapijski senzibilizator. Povećava citotoksičnost stanica raka i stimulira imunski odgovor kroz aktivaciju imunskih stanica. Hipertermija modulira lokalne proupalne odgovore, imunsku aktivaciju, staničnu smrt i promjene mikrookoliša na ciljanim mjestima, uglavnom specifičnim proteinima toplinskog šoka (HSP) (Sawaji i sur., 2002; Oršolić i Car., 2014.; Ramer i sur., 2018; Multhoff i sur., 2012.; Oršolić i sur., 2020). Osim toga, nekoliko je istraživanja pokazalo da hipertermija može biti korisna u prevladavanju otpornosti na kemoterapijske lijekove kao što je cisplatina povećanjem unosa lijeka i promjenom tumorske mikrocirkulacije, protoka krvi, propusnosti stanične membrane i staničnog metabolizma (Sawaji i sur., 2002.; Oršolić i Car., 2014; Ramer i sur., 2018.; Bandolik i sur., 2019.; Oršolić i sur., 2020; Chhabra i sur., 2021.; Yang i sur., 2021.). Gotovo sve metode liječenja tumora mogu izazvati neke nuspojave. Smatra se da primjena prirodnih antioksidansa, prisutnih u hrani i dodacima prehrani, s izraženim kemopreventivnim djelovanjem može smanjiti učinke toksičnosti na zdrave stanice i povećati antitumorsku učinkovitost kemoterapijskih lijekova poput cisplatine. Prethodna istraživanja su pokazala da resveratrol može povećati antitumorsku učinkovitost cisplatine i poništiti otpornost na više lijekova povećanjem kemosenzitivnosti stanica raka (Ramer i sur., 2018.; Chhabra i sur., 2021.; Yang i sur., 2021.). Osim toga, resveratrol kao inhibitor HDAC može potaknuti zaustavljanje ciklusa stanica raka, diferencijaciju i smrt, smanjiti angiogenezu i modulirati imunski odgovor, čime se otvaraju nove perspektive za njegovu kliničku upotrebu

kao kemopreventivnog lijeka ili terapeutika protiv raka (Chhabra i sur., 2021.; Yang i sur., 2021.).

U ovom radu istražili smo može li preventivna obrada prirodnim antioksidansom resveratrolom, u kombinaciji sa sustavnom hipertermijom i cisplatinom, pojačati učinak cisplatine na tumorske stanice putem modulacije aktivnosti HDAC i razine HSP70 i HSP90 te posljedično pridonijeti izravnoj toksičnosti na tumorske stanice, inhibiciji angiogeneze i rasta tumora, te u konačnici produžiti životni vijek miševa. Naše istraživanje jasno pokazuje da hipertermija povećava toksičnost cisplatine, smanjuje tjelesnu težinu i poboljšava ishod liječenja inhibicijom angiogeneze i rasta tumora, što dovodi do produljenja životnog vijeka miševa (Slika 25, 26 i 27, Tablica 6). Međutim, gubitak tumorske mase nije bio isključivo povezan s toksičnošću cisplatine, već i s inhibicijom rasta tumora i angiogeneze. Rezultati su pokazali smanjenu koncentraciju VEGF-a u tumorskim stanicama u svim obrađenim skupinama, posebno u skupini liječenoj Cis + HT gdje je vrijednost bila statistički značajna ( $p < 0,01$ ) u usporedbi s kontrolom (Slika 32). Ova skupina (Cis + HT) imala je najmanji volumen tumora u usporedbi s drugim skupinama (Slika 27) i najveći postotak inhibicije rasta tumora (Tablica 8), zajedno sa značajno potisnutom aktivnošću HDAC ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolu (Slika 29). Slični rezultati prikazani su za skupinu liječenu s Res + Cis + HT u pogledu inhibicije rasta tumora, %ILS, razine VEGF i aktivnosti HDAC (Tablica 6, Slika 25, 26, 27, 29 i 32). Čini se da multimodalni pristup kombinacije resveratrola i cisplatine s hipertermijom povećava protutumorsku učinkovitost, što je u suglasju s našim dosadašnjim podacima i drugim literaturnim podacima (Sawaji i sur., 2002.; Oršolić i Car., 2014.; Oršolić i sur., 2020.). Formiranje i održavanje strukture krvnih žila ključno je za fiziološku funkciju tkiva i važno za napredovanje bolesti kao što je rak. Bez odgovarajuće krvožilne opskrbe, solidni tumori mogu narasti samo do kritične veličine od 1-2 mm, prvenstveno zbog nedostatka kisika i hranjivih tvari. Rast solidnih tumora ovisi o stvaranju novih krvnih žila (angiogeneza), što utječe na veličinu tumora i proces metastaziranja, koji su usko povezani s razinama VEGF, MMP-2 i MMP-9 (Sawaji i sur., 2002.; Ramer i sur., 2018.). Hipertermija s Cis-om može inhibirati proizvodnju VEGF-a *in vivo* i pokazuje antiangiogeni učinak, što je potvrđeno smanjenim brojem krvnih žila (MVD) (Tablica 9). Stoga, izlaganje malignih stanica kemoterapijskim lijekovima i hipertermiji može biti terapijski pristup za prevenciju progresije tumora i inhibiciju angiogeneze ometanjem stanične replikacije i/ili inhibicijom migracije krvožilnih endotelnih stanica. Vjerojatno je da oštećenje mikrožilja može igrati važnu ulogu u tumoricidnom učinku hipertermije i Cis jer je većina tumorskih stanica

podlegla staničnoj smrti nakon oštećenja mikrožilja *in vivo*. Potvrđeno je da je u početnoj fazi hipertermije stanična smrt uglavnom izazvana apoptozom, dok se kasnije stopa nekroze povećava (Sawaji i sur., 2002.), što pokazuju i naši histološki preparati (Slike 40, 41 i 42). Dilatacija, kongestija i ruptura mikrožilja tumora nakon hipertermije mogu smanjiti protok krvi u tumoru i uzrokovati neadekvatnu opskrbu hranjivim tvarima i kisikom te nakupljanje kiseline, dok nizak pH dovodi do kontrole rasta tumora, što se očituje u značajno produljenom preživljavanju i inhibicijirasta tumora. Vežanjem na VEGF receptor na endotelnim stanicama, VEGF stimulira izlučivanje MMP-a i izaziva poremećaj izvanstaničnog matriksa (Sawaji i sur., 2002.). Supstrati za MMP mogu biti različiti prekursori i receptori čimbenika rasta, adhezijski receptori te citokini i njihovi receptori (Pittayapruek i sur., 2016.). Povećane razine MMP-2 i MMP-9 povezane su s invazivnim i metastatskim potencijalom malignih tumora jajnika (John i Tuszynski, 2001.; Sawaji i sur., 2002.; Deryugina i Quigley, 2015.; Pittayapruek i sur., 2016.; Zuazo-Gaztelu i Casanovas, 2018.; Wang i Khalil, 2018.; Ramer i sur., 2018.; Teleanu i sur., 2019.). Isto tako, pokazalo se da resveratrol može smanjiti razinu ekspresije proteina MMP-2 i MMP-9 u stanicama MDA-MB-231 (Sun i sur., 2019.). Snižene razine MMP-2 i MMP-9 rezultiraju smanjenom invazivnošću i metastazama, a posljedično i boljom prognozom (John i Tuszynski, 2001.; Deryugina i Quigley, 2015.; Zuazo-Gaztelu i Casanovas, 2018.; Wang i Khalil, 2018.; Teleanu i sur., 2019.). Naši rezultati pokazali su značajno smanjenje koncentracije MMP-2 u skupini liječenoj s Res i Res + HT u usporedbi s kontrolom ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ). U ostalim obrađenim skupinama koncentracija MMP-2 također je bila niža u usporedbi s kontrolom, ali bez značajnosti (Slika 34). Smanjenje koncentracije MMP-2 u tumorskim stanicama nakon primjene resveratrola u suglasju je s rezultatima istraživanja Gagliano i sur. (2005.) koji je pokazao sposobnost resveratrola da smanji ekspresiju MMP-2 u primarnoj kulturi stanica glioblastoma. Također, Xiong i sur. (2016.) pokazali su da resveratrol može inhibirati pokretljivost i invazivnost stanica glioblastoma smanjenjem ekspresije MMP-2.

Nadalje, resveratrol je inhibirao migraciju i invaziju stanica raka prostate promicanjem demetilacije i povećanjem ekspresije tkivnih inhibitora metaloproteinaza, TIMP2 i TIMP3, te supresijom ekspresije MMP-2 i MMP-9 (Wang i sur., 2020.; Ren i sur., 2021.). Suprotno ovim nalazima, naši rezultati pokazuju značajno veću koncentraciju MMP-9 u skupini liječenoj s Res + HT i Cis + HT u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ) (Slika 35). Također, skupina Res + HT ima povećanu koncentraciju u usporedbi s grupom Res + Cis + HT ( $p < 0,001$ ) (Slika 35). Dobiveni rezultati mogu se objasniti dvostrukom ulogom

MMP-a. Konkretno, MMP su uključeni u brojne procese, uključujući rast, preživljavanje, angiogenezu, invaziju i imunitet, ali također i u kontroli stanične smrti, upale, infekcije i antiangiogeneze. Iako su niže razine MMP-9 povezane s boljom prognozom liječenja tumora, više razine ne znače nužno suprotan učinak, s obzirom na ulogu MMP-9 u kontroli angiogeneze i njegovu sposobnost da cijepa antiangiogene prekursore i aktivira angiostatin i druge antiangiogene čimbenike kao što su endostatin i tumstatin koji posljedično smanjuju rast tumora i gustoću krvnih žila (Folgueras i sur., 2004.). Angiostatin, kao antiangiogeni čimbenik, smanjuje proliferaciju i migraciju endotelnih stanica. Oslobađa se iz plazminogena djelovanjem plazmina, plazmin reduktaze i nekoliko MMP (MMP-12, MMP-9, MMP-7 i MMP-3) (John i Tuszynski, 2001.; Deryugina i Quigley, 2015.; Zuazo-Gaztelu i Casanovas, 2018.; Wang i Khalil, 2018.; Teleanu i sur., 2019.). Dok se čini da razine VEGF-a unutar tumorskog okruženja izravno koreliraju s ukupnom gustoćom mikrožilja, specifična inhibicija ili vezanje VEGF-a koji proizvode stanice raka rezultira značajnim smanjenjem tumorske angiogeneze, popratno sa smanjenim rastom tumora i, posljedično, inhibicijom metastaza. Naši rezultati pokazuju da resveratrol i cisplatin imaju antiangiogenetski učinak (Tablica 9), koji je djelomično povezan s inhibicijom aktivnosti VEGF i/ili MMP-2 i vjerovatno kroz proizvodnju angiostatina putem aktivnosti MMP-9. Aktivacija VEGF-a kao proangiogenog čimbenika je posredovana pomoću HIF-1 $\alpha$  da inducira angiogenezu. Hipoksična stanja također reguliraju aktivnost HDAC izravno ili neizravno kroz uključenost HDAC u ekspresiju gena reguliranu kisikom i angiogenezu izazvanu hipoksijom (Decker i sur., 2008.; Bandolik i sur., 2019.). Važan nalaz našeg istraživanja je da kombinacija Cis, HT i resveratrola značajno potiskuje aktivnost HDAC, blokira vezanje HIF-1 $\alpha$  na DNA i modulira razine HSP70 i HSP90 (Slika 30 i 31). Naši podaci pokazuju da je supresija aktivnosti HIF-1 $\alpha$  i oštećenje angiogeneze izazvane u tumorskim stanicama posredovano inhibicijom translokacije HIF-1 $\alpha$  u jezgru. Ovi su podaci u skladu s nalazima Lianga i sur. (2006.) koji su sugerirali da HDCI imaju anti-HIF aktivnost kroz destabilizaciju HIF-1 $\alpha$  i potiskivanje transaktivacijskog potencijala C-terminalne aktivacijske domene HIF- $\alpha$  (HIF- $\alpha$ CAD). Drugi poznati mehanizmi aktivnosti anti-HIF su represija sposobnosti vezanja DNA i inhibicija nuklearne translokacije HIF-1 $\alpha$ . Kvantitativna analiza HIF-1 $\alpha$  pokazala je više razine u skupinama Res + Cis, Cis + HT i Res + Cis + HT, što ukazuje na povećanu smrt stanica apoptozom ili nekrozom, što je sukladno sa smanjenim volumenom tumora i povećanim preživljavanjem životinja (Slika 42). Stanice reagiraju na stresne uvjete aktiviranjem proteina odgovora na stres koji mogu biti važni u održavanju fine ravnoteže između stanične smrti i preživljavanja. Proteini stresa

izazvani nakon kemoterapije, zračenja ili hipertermije mogu imati dvostruku ulogu. Stoga, HSP mogu pokazivati citoprotektivne funkcije zahvaljujući sposobnosti zaštite stanica od štetnog stresa, djelujući kao regulatori preživljavanja kroz svoja antiapoptotička svojstva (Liang i sur., 2006.). S druge strane, HSP mogu biti uključeni u procesiranje i predočavanje antigena i mogu djelovati kao "signali opasnosti" za adaptivni i urođeni imunostni sustav. Točnije, u imunosupresivnim stanjima, HSP-ovi povećavaju preživljavanje i proliferaciju stanica raka aktivirajući njihov mehanizam za zaštitu stanica, dok u optimalnim uvjetima HSP-ovi mogu stimulirati imunostni odgovor protiv raka (Liang i sur., 2006.; Oršolić i Car, 2014.; Oršolić i sur., 2020.).

Snižena razina HSP90 u svim skupinama, osim u kontrolnim skupinama u fiziološkim i hipertermijskim uvjetima te resveratrolu, potvrđuje osjetljivost tumorskih stanica na inhibiciju HSP90 (Slika 31), čija je ekspresija općenito povećana u tumorima u odnosu na normalne stanice. Poznato je da je jedna od nuspojava inhibicije HSP90 kompenzacijska indukcija HSP70, na što upućuju i naši rezultati (Slika 30). Indukcija zaštitne protutumorske imunosti i njezine pojavnosti na lokalnim i distalnim mjestima rezultat su složene međuigre između različitih tipova stanica i topivih medijatora kao što su citokini i proteini stresa. Sve veći broj istraživanja pokazuje da je hipertermija, kao adjuvantni pristup imunoterapiji raka, u korelaciji s povećanom prisutnošću infiltrirajućih monocita i makrofaga u tumorima, te da je to povezano s povećanom aktivnošću makrofaga (Oršolić i sur., 2013.; Oršolić i Car, 2014.; Hato i sur., 2014.; deBiasi i sur., 2014.; Lee i sur., 2018.; Opzoomer i sur., 2019.) i regresije tumora (Oršolić i sur., 2013.; Hato i sur., 2014.; deBiasi i sur., 2014.; Teleanu i sur., 2019.; Lee i sur., 2018.; Opzoomer i sur., 2019.). Povećanje imunomodulatorne aktivnosti makrofaga nakon hipertermije i resveratrola također je vidljivo u našem istraživanju (Slike 38 i 39), što ukazuje na važnost imunostnog sustava u odbacivanju tumora. Mogući molekularni mehanizmi na kojima se temelji poboljšana imunostna reaktivnost u prisutnosti hipertermije uključuju stvaranje HSP-ova, aktivaciju stanica koje predočavaju antigen i promjene u prometu limfocita. Kao što je spomenuto, HSP su uključeni u procesiranje i predočavanje antigena i mogu djelovati kao "signali opasnosti". Imunogena priroda HSP70 oslanja se na njegovu sposobnost da veže tumorske peptidne antigene (Gagliano i sur., 2005.; Oršolić i sur., 2013.; Hato i sur., 2014.; deBiasi i sur., 2014.; Lee i sur., 2018.; Opzoomer i sur., 2019.). Kompleks HSP70-peptid rezultira odgovorom CD8<sup>+</sup> T-stanica specifičnim za antigen. Za prepoznavanje antigena tumorskih stanica, CD8<sup>+</sup> T-stanice zahtijevaju ekspresiju MHC antigena klase I, čija je ekspresija niska ili potpuno ukinuta u čak 40-90% primarnih tumora i

metastaza. Ovaj mehanizam pomaže tumorima da izbjegnu imunosnu reakciju na tumor. Nedostatak molekula MHC-klase I čini tumorske stanice "nevidljivima" za citotoksično djelovanje CD8<sup>+</sup> T-stanica. Naprotiv, nedostatak ekspresije MHC čini tumore osjetljivijima na podskupinu stanica prirodnih ubojica (NK). Aktivirane stanice NK, koje ekspimiraju HSP70 receptore kao što su C-tip lektinskih receptora CD94/NKG2C i NKG2D, vežu se na membranu HSP70 na tumorskim stanicama i luče granzim B, bilo sam ili u kombinaciji s perforinom, što dovodi do stanične smrti (Liang i sur., 2006.). Poznato je da kemoterapijski lijekovi poput cisplatine, doksorubicina, mitomicina C, 5-fluorouracila i kamptotecina, koji imaju izravne citotoksične učinke, također pokazuju neizravnu citotoksičnu aktivnost "pripremajući" tumorske stanice na eliminaciju imunosnim stanicama poput NK ili citotoksičnih limfocita T koji koriste Fas ili receptor za ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF (TRAIL) (Menard i sur., 2008.). Kemoterapija također može poboljšati imunosni odgovor protiv raka modificiranjem interakcije između tumorskih stanica i dendritičnih stanica (DC), koje igraju ključnu ulogu u predočavanju antigena T limfocitima. Osim toga, kemoterapija može pojačati endocitozu tumorskih stanica pomoću dendritičnih stanica. Konačno, tumorske stanice su uključene u proizvodnju "signala opasnosti" koji su potrebni za sazrijevanje dendritičnih stanica i predočavanje tumorskih antigena stanicama T (Oršolić i sur., 2013.; Oršolić i Car, 2014.; Hato i sur., 2014.; deBiasi i sur., 2014.; Lee i sur., 2018.). Zagrijavanjem tumora, apsorbirani ulomci nekrotičnih stanica raka daju antigenski stimulans potreban za jačanje imunosnog sustava domaćina koji zatim potiče uništavanje tumorskih stanica (Menard i sur., 2008.; Oršolić i sur., 2013.; Oršolić i Car, 2014.; Hato i sur., 2014.; deBiasi i sur., 2014.; Lee i sur., 2018.). Na taj način, hipertermija može imati ili izravan supresivni učinak na tumorske stanice inhibicijom proliferacije tumorskih stanica i induciranjem zaustavljanja stanica, apoptoze i oštećenja mikrožilja, ili može djelovati neizravno jačanjem imunosne funkcije domaćina (Sawaji i sur., 2002.; Menard i sur., 2008.; Oršolić i Car, 2014.; Oršolić i sur., 2020.). Imunoterapija raka ima golem potencijal, ali tek treba biti klinički dokazana u različitim tumorskim situacijama. Stoga su pristupi koji mogu potaknuti imunogenu staničnu smrt (npr. cisplatin, hipertermija) zajedno s reprogramiranjem imunosupresivnog tumorskog mikrookruženja (npr. repolarizacija makrofaga M2 prema M1 fenotipu tumoru pridruženih makrofaga (TAM) posebno privlačni za poboljšanje učinkovitosti imunoterapije (primjerice, inhibitori imunosnih kontrolnih točaka). TAM su važan dio solidnih tumora. U nekim tumorima, gotovo 40% nemalignih stanica su TAM (Pollard, 2004.). Naime, nekoliko mehanizama kemoterapije i hipertermije može biti



uključeno u antitumorski odgovor, od aktivacije imunskih stanica preko HSP-ova i „signala opasnosti“ do eliminacije imunosupresivnih stanica. Neki od najvažnijih mehanizama uključuju poremećaj imunosupresije posredovan Treg stanicama i mijeloidnim supresorskim stanicama, jačanje sazrijevanja dendritičnih stanica i njihovih funkcija kroz predočavanje tumorskih antigena, promicanje aktivnosti citotoksičnih stanica T, stanica NK i makrofaga, povećavajući prodor imunskih stanica u jezgru tumora, remodelirajući mikrookruženje tumora i poboljšavajući prikaz antigena na tumorskim stanicama što povećava njihovu osjetljivost na programirano imunsko djelovanje. Stoga kemoterapija na bazi platine, uključujući cisplatinu, ima imunogeni učinak kroz indukciju stanične smrti i otpuštanje molekularnih uzoraka povezanih sa smrću, koji aktiviraju proupalne signalne puteve. Zabilježeno je da aktivacija makrofaga izazvana cis-platinom stimulira sintezu i otpuštanje NO, čimbenika tumorske nekroze (TNF)- $\alpha$ , interleukina (IL)-1, interferona (IFN)- $\gamma$  i IL-12, što dovodi do M1 polarizacija (Menard i sur., 2008.; deBiasi i sur., 2014.; Opzooomer i sur., 2019.). Osim toga, sazrijevanje DC-a u prisutnosti lijekova platine smanjuje njihovu razinu PD-L1 i PD-L2 i povećava potencijal za aktivaciju T-stanica (Opzooomer i sur., 2019.). Isto tako, pokazalo se da resveratrol igra sličnu ulogu u indukciji imunogene stanične smrti putem ekspresije kalretikulina (CRT) i proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. *High Mobility Group Box 1*) na površini stanica raka jajnika i rezultira značajnom inhibicijom volumena tumorai supresije čimbenika rasta tumora (TGF)- $\beta$  uz istovremeno promicanje razine IL-12 i IFN- $\gamma$  (Multhoff i sur., 2012.; Ančić i sur., 2020.; Ren i sur., 2021.; Chhabra i sur., 2021.). Resveratrol pojačava antitumorski T-stanični imunitet promicanjem abnormalne glikozilacije i dimerizacije PD-L1, sprječavajući interakciju PD-1 s PD-L1 i, posljedično, povećavajući osjetljivost agresivnih stanica raka na staničnu smrt posredovanu T-stanicama. Očito je da je sinergizam u multimodalnoj terapiji ključan za indukciju imunogene stanične smrti aktivacijom makrofaga i drugih imunskih stanica (Slike 37 i 38). Aktivacija M1 makrofaga inducira proizvodnju NO. Povećana koncentracija NO ima citotoksični učinak na tumorske stanice i potiče apoptozu. M1 makrofagi povećavaju aktivnost enzima iNOS, koji katalizira pretvorbu L-arginina u NO i citrulin, dok M2 makrofagi povećavaju ekspresiju enzima Arg-1. Stoga se ova dva enzima natječu za L-arginin (Rath i sur., 2014.; Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). M1 makrofagi su proupalni. Oni inhibiraju proliferaciju tumorskih stanica i uništavaju oštećena tkiva lučenjem proupalnih citokina (IL-12 i IL-23), reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i NO, te imaju visoku sposobnost u predočavanju antigena (Rath i sur., 2014.; Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). Pokazalo se da je proizvodnja NO u

tumorskom mikrokruženju neophodna za antitumorsku aktivnost CD8<sup>+</sup> T-stanica (Salimian Rizi i sur., 2017.). NO pojačava receptore smrti i pojačava njihovu antitumorsku i citotoksičnu aktivnost (Navasardyan i Bonavida, 2021.). Učinci NO kod raka privukli su pažnju nakon opažanja da aktivirani makrofagi metaboliziraju arginin kako bi proizveli NO, efektorsku molekulu koja inducira citotoksičnost u tumorskim stanicama (Salimian Rizi i sur., 2017.; Oršolić i sur., 2020.; Navasardyan i Bonavida, 2021.; Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). NO koji proizvode mijeloidne stanice koje eksprimiraju NOS2 djeluje zajedno s CD8<sup>+</sup> T-stanicama kako bi eliminirao tumorske stanice. Stoga je prepoznavanje uloge NO u imunom odgovoru tumora ključno za razvoj učinkovitih imunoterapija koje ciljaju različite aspekte metabolizma NO. Uloga NO u tumorima ovisi o koncentraciji NO, trajanju izloženosti, osjetljivosti stanica, izvanstaničnim uvjetima i lokalizaciji iNOS-a u tkivima (Giatromanolaki i sur., 2020.; Khan i sur., 2020.; McGinity i sur., 2020.). Niske i srednje koncentracije NO potiču angiogenezu, metastaze i invazivnost te inhibiraju apoptotske procese. U višim koncentracijama NO postaje citotoksičan za tumorske stanice i potiče apoptozu (Fukumura i sur., 2006.). Naši podaci su u suglasju s prethodno navedenim rezultatima (Fukumura i sur., 2006.; Salimian Rizi i sur., 2017.; Oršolić i sur., 2020.; Giatromanolaki i sur., 2020.; Khan i sur., 2020.; Navasardyan i Bonavida, 2021.; McGinity i sur., 2021.; Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). Potvrdili smo reaktivaciju TAM makrofaga prema fenotipu M1 u svim skupinama obrađenim Cis-om (Cis, Cis + HT, Res + Cis, Res + Cis + HT), dok je aktivnost Arg smanjena (Slike 38 i 39). Povećana razina iNOS-a potvrđena je u svim obrađenim skupinama, posebice u skupinama Res, Cis + HT, Cis i Res + HT (Slika 43). Pretjerana ekspresija iNOS-a u TAM-ovima bila je povezana s povoljnom prognozom raka dojke i pluća, visokim stupnjem apoptoze i smanjenim izbijanjem bolesti nakon terapije (Fukumura i sur., 2006.; Salimian Rizi i sur., 2017.; Oršolić i sur., 2020.; Giatromanolaki i sur., 2020.; Khan i sur., 2020.; Navasardyan i Bonavida, 2021.; McGinity i sur., 2021.; Yang i sur., 2021.; Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). Podaci su u suglasju i s analizom NO u makrofagima slezene gdje je vidljivo da resveratrol ima imunomodulatornu aktivnost na makrofage potičući produkciju NO ali i protuupalni učinak u LPS-stimuliranim makrofagima. Nadalje, obrada s Cis, Cis + HT i Res + Cis pojačava produkciju NO u upalnim uvjetima potvrđujući polarizaciju prema M1 fenotipu makrofaga. S druge strane aktivnost arginaze je bez značajnih promjena u svim skupinama osim neznatnog pada tijekom obrade s Cis i Res + Cis + HT.

S druge strane, M2 makrofagi imaju protuupalni i imunosupresivni učinak, s niskom sposobnošću predočavanja antigena. Oni potiču rast tumora i angiogenezu (Zea i sur., 2005.). Sve veći broj istraživanja pokazuje da arginaze 1 i 2 igraju ključnu ulogu u regulaciji rasta tumora i metastaziranja kroz različite mehanizme, uključujući regulaciju metabolizma L-arginina, modulaciju signalnih putova i utjecaj na mikrookruženje tumora. Stoga se arginaza cijeni kao atraktivna meta terapije raka. Arginaza regulira imunosni bijeg stanica raka kroz nekoliko mehanizama: 1. visoka ekspresija Arg-1 i Arg-2 u stanicama raka izravno oštećuje funkciju T stanica iscrpljivanjem L-arginina u tumorskom mikrookruženju; 2. izlučeni Arg-1 ili izvanstanični mjehurići koji sadrže Arg-1 iz mijeloidnih supresorskih stanica (MDSC) i TAM smanjuju razinu L-arginina u tumorskom mikrookruženju i potiskuju aktivaciju i proliferaciju T-stanica; 3. konačno, visoka ekspresija Arg-2 u Treg stanicama pojačava supresivni kapacitet i akumulaciju Treg stanica putem inhibicije mTOR signalnog puta, što zauzvrat omogućuje imunosni bijeg stanica tumora (Rodríguez i Ochoa, 2008.; Delgoffe i sur., 2009.; Sahin i sur., 2014.; Wang i sur., 2014.; Nan i sur., 2018.; Lowe i sur., 2019.). Naši rezultati su pokazali značajno smanjenu aktivnost Arg-1 u skupinama liječenim s Cis + HT i Res + Cis + HT ( $p < 0,001$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 39). Smanjena aktivnost Arg-1 u tim skupinama ukazuje na polarizaciju M2 makrofaga prema M1 fenotipu, što rezultira boljim antitumorskim učinkom i produljenjem životnog vijeka (Slike 26 i 27, Tablice 6 i 7). Prema našim podacima, cisplatina, kao jedan od najvažnijih i najčešće korištenih kemoterapeutika, može povećati efektorsku aktivnost citotoksičnih stanica T i stanica NK inhibicijom Treg i MDSC stanica. Sinergizam između resveratrola, cisplatine i hipertermije potiče imunogenu smrt tumorskih stanica putem indukcije molekularnih uzoraka povezanih s oštećenjem (DAMP), kao što su CRT, HSP70 i HMGB1, te putem preoblikovanja tumorskog mikrookruženja putem povećanje sazrijevanja DC-a i makrofaga. Aktivirani DC i makrofagi, kao stanice koje predočavaju antigen, reaktiviraju efektorsku funkciju citotoksičnih stanica T na tumorske stanice, kao i aktivaciju stanica NK putem HSP70 (Liang i sur., 2006.; Menard i sur., 2008.; Oršolić i sur., 2013.; deBiasi i sur., 2014.; Hato i sur., 2014.; Lee i sur., 2018.; Opzoomer i sur., 2019.), što dovodi do inhibicije rasta tumora i produljenja životnog vijeka (Slika 26, 27, 45 i 46). Također treba napomenuti da je resveratrol jedan od najvažnijih sastojaka prehrane koji ima sposobnost kemoprevencije i zaštite krvožilnog sustava. Starenje uzrokuje brojne promjene kao što su genomska nestabilnost, epigenetske promjene, skraćivanje telomera, gubitak proteostaze (poremećaj "homeostaze" proteina ili proteostaze), deregulacija senzora hranjivih tvari, mitohondrijska

disfunkcija, stanično starenje i iscrpljenost matičnih stanica. Razne promjene izazvane čimbenicima mikrookoliša i promjene ovisne o starenju djelomično su povezane s krvnim žilama koje su važne za održavanje funkcije tkiva i prijenosa kisika, hrane i otpadnih tvari. Tijekom starenja smanjuje se gustoća krvnih žila i broj pericita (Singh i sur., 2019.; Chen i sur., 2021.), uz smanjenje proizvodnje NO što povećava apoptozu endotelnih stanica (Hoffmann i sur., 2001.). Nadalje, periciti su izvor fibroblasta u upalnim procesima, a diferencijacija pericita u fibroblaste raste sa starenjem i bolestima povezanim sa starenjem uključujući tumore. Fibroblasti povezani s rakom (CAF), zajedno s drugim stanicama povezanim s tumorom, podupiru rast tumora i metastaza potičući imunosupresiju. Osim toga, normalno ljudsko starenje karakterizira progresivno opadanje imunskog nadzora koje je popraćeno povećanjem PD-L1, što posljedično dovodi do inicijacije i progresije tumora. Resveratrol inhibira os ROS - NF- $\kappa$ B, potiskuje aktivaciju trombocita, povećava bioraspoloživost NO i/ili aktivira sirtuine, čime pomaže u očuvanju mladenačkog krvožilnog fenotipa i prevenciji staničnog starenja (Labinsky i sur., 2006.). Nadalje, resveratrol, kao prirodni inhibitor imunokontrolne točke PD-1/PD-L1, može izravno blokirati enzimsku aktivnost uključen u N-vezanu glikozilaciju nascentnog PD-L1 u endoplazmatskom retikulumu ili se izravno vezati na površine PD-L1 da inducira dimerizaciju PD-L1 i blokira vezanje na PD-1. Supresija PD-L1 signalizacije može biti imunometabolički mehanizam putem kojeg resveratrol može spriječiti imunsku disfunkciju i razvoj raka u kontekstu starenja (Verdura i sur., 2020.). Čini se da inhibicija HIF-a s resveratrolom u konačnici sprječava rezistenciju na antiangiogenu terapiju, blokira epitelno-mezenhimalnu tranziciju i diferencijaciju mijeloidnih supresivnih stanica u M2-proangiogene TAM, pridonosi ponovnoj aktivaciji aktivnosti stanica NK i T i sprječava genetsku nestabilnost u tumorskim endotelnim stanicama i selekciju invazivnih metastatskih klonova tumorskih stanica koje su otporne na antiangiogene spojeve (Ko i sur., 2017.; Singh i sur., 2019.; Chhabra i sur., 2021.; Ribatti i sur., 2021). Neizravni učinak resveratrola na angiogenezu temelji se na povećanju doza-ovisne aktivnosti p53 u kancerogenim i nekancerogenim staničnim linijama kroz pojačanu regulaciju antiangiogenih čimbenika, uključujući trombospondin-1 i smanjenje ekspresije VEGF-a u stanicama raka. Stoga bi multimodalni pristup i sposobnost ciljanja nekoliko mehanizama povezanih s rakom s više lijekova bio idealan pristup za kontrolu proliferacije/matičnosti tumorskih stanica, angiogeneze, kronične upale i imunске tolerancije.

Sažimajući dobivene podatke, resveratrol može pojačati protutumorski učinak cisplatine moduliranjem aktivnosti HDAC i razina HSP70 i HSP90, čime pridonosi izravnoj toksičnosti na tumorske stanice i rastu tumora, te posljedično produžuje život miševa. Nadalje, čini se da hipertermija može stvoriti povoljno tumorsko mikrookruženje za imunosnu lančanu reakciju koja poboljšava učinkovitost kombiniranog liječenja cisplatinom i resveratrolom. Hipertermija pojačava lokalni protok krvi u tumoru i povećava akumulaciju cisplatine unutar tumorskog tkiva i remodulira mikrookruženje tumora realizacijom signala opasnosti i antigena koji potječu iz tumorskih stanica koji pridonose ponovnoj aktivaciji polarizacije makrofaga u fenotip M1 i aktivaciji imunosnog odgovora na stanice tumora. Sumirajući podatke, obrada životinja s Cis i HT i Res + Cis + HT ima najveće učinke u antitumorskom djelovanju, ali očito preko nešto drugačijih sinergističkih/antagonističkih mehanizama. Prema dobivenim rezultatima, primjena resveratrola nije značajno pridonijela antitumorskom učinku cisplatine i hipertermiji, ali je djelomično pridonijela manjim razlikama u preživljenju životinja, koncentraciji MMP-2 i značajnom smanjenju aktivnosti arginaze što je važno u HIF-NO signalizaciji. Točnije, stanične razine NO i signalizacija NO važne su komponente stabilizacije i signalizacije HIF-1, stoga je važno razumijevanje zamršenosti njihovog stvaranja i cilja unutar stanice.

HIF-NO signalizacija podržava nekoliko procesa u tijelu, uključujući razvoj, angiogenezu, imunitet, apoptozu, preživljavanje i starenje (Hendrickson i O Poyton, 2015.; Keshet i Erez, 2018.). Moguće je da resveratrol kao snažan antioksidans mijenja odnos između HIF-NO signala, utječući na procese vezane uz angiogenezu, apoptozu, rasta tumora i preživljavanje. Hipoksija rezultira promijenjenom ekspresijom više od 1000 gena sisavaca zbog, velikim dijelom, povećane aktivnosti HIF-1. HIF-1 odgovoran je za prilagodbe stanica na hipoksiju, dok kisik ( $O_2$ ) negativno regulira njegovu stabilnost. Također, mnogi drugi čimbenici utječu na stabilnost i aktivnost HIF-1, uključujući dušikov oksid (NO). NO nastao iz L-arginina i nitrita ( $NO_2^-$ ) mogao bi nitrozilirati ili nitrirati HIF-1 i višestruke proteine uključene u regulaciju HIF-1, te može omogućiti HIF-1 da izbjegne normoksičnu razgradnju. S druge strane, HIF-1 može povećati proizvodnju NO kroz više mehanizama, uključujući povećanu ekspresiju inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) i ekspresiju podjedinice 4-2 citokrom c oksidaze (COX4-2). Stoga postoji visok stupanj križne interakcije između HIF-1 i NO signalizacije. Prema tome, mnogi stanični odgovori na NO su posredovani HIF-1, i obrnuto. Ovi procesi uključuju angiogenezu, apoptozu, starenje i metaboličke promjene, ali nisu

ograničeni samo na njih nego i druge procese. Razina  $O_2$  ima veliki utjecaj na ROS/RNS signalizaciju. Visoki  $O_2$  i  $H_2O_2$  mogu stabilizirati HIF-1 $\alpha$  oksidacijom i inhibicijom domene prolil hidroksilaze 2 (PHD2) i čimbenika inhibicije HIF-1 (FIH) iako se čini da je FIH daleko osjetljiviji na te oksidanse. Na aktivnost SIRT1 također negativno utječe ROS. Mješavina visoke proizvodnje ROS i visoke proizvodnje NO rezultira stvaranjem visoko toksičnih molekula kao što je ONOO<sup>-</sup>. ONOO<sup>-</sup> je sposoban nitrirati velik broj proteina, uključujući dimetilarginin dimetilaminohidrolazu 1 (DDAH1), katalazu i  $\alpha$ -ketoglutarat (ili 2-OG) dehidrogenazni kompleks (KGDHC), što rezultira smanjenom aktivnošću sva tri enzima. DDAH1 je temeljan za funkcioniranje NOS-a olakšavajući uklanjanje inhibitora ADMA (NG, NG-dimetil-L-arginin i L-NMA (NG-metil-L-arginin), a katalaza uklanja  $H_2O_2$  iz stanica. KGDHC je enzim ciklusa trikarboksilne kiseline, a njegova inhibicija će smanjiti razinu  $\alpha$ -ketoglutarata i utjecati na funkciju PHD/FIH. Visoka proizvodnja NO zajedno s niskom razinom ROS-a omogućuje tiolnu nitrozilaciju, koja može utjecati na HIF-1 $\alpha$ , PHD2 i SIRT1 (Hendrickson i O Poyton 2015.; Keshet i Erez, 2018.).

ROS se smatraju normalnim nusproduktima brojnih staničnih procesa. Tipično, stanice raka pokazuju više bazalne razine ROS-a u usporedbi s normalnim stanicama kao rezultat neravnoteže između oksidansa i antioksidansa (Nakamura i Takada, 2021.). ROS imaju dvostruku ulogu u staničnom metabolizmu: na niskim do umjerenim razinama, ROS djeluju kao pretvarači signala za aktiviranje stanične proliferacije, migracije, invazije i angiogeneze. Nasuprot tome, visoke razine ROS-a uzrokuju oštećenje proteina, nukleinskih kiselina, lipida, membrana i organela, što dovodi do stanične smrti. Kao što je prikazano u Tablicama 10 - 12, hipertermija ima pro-oksidativni učinak i povećava koncentraciju MDA u tkivu jetre, bubrega i tumora, smanjuje GSH i CAT aktivnost. Obrada životinja s cisplatinom, resveratrolom ili kombinacijom smanjuje koncentraciju MDA u odnosu na kontrolu u svih tkiva ali citotoksičnost cisplatine je potvrđena značajnim porastom GSH u jetri, dok u bubregu i tumoru aktivnost je bila značajno snižena. Indukcija oksidacijskog i nitrozativnog stresa predložena je kao dio mehanizma samog djelovanja cisplatine (Chirino i Pedraza-Chaverri, 2009.). Moguće je da snižena razina MDA nakon obrade može biti posljedica brze smrti tumorskih stanica (apoptozom/nekrozom) koje često karakterizira i nedostatna sinteza GSH te su podložnije staničnoj smrti ali dijelom i selekcije stanica otporniji na oksidacijski stres. Cisplatina inducira oksidacijski i nitrozativni stres u stanicama bubrežnog epitela povećanjem proizvodnje ROS-a i RNS-a (Yao i sur., 2007.). Tretman Cis-om uzrokuje promjene u

produktivni dušikovog(II)oksida (NO), za koje se smatra da imaju toksični učinak, a reakcija između NO-a i superoksidnog iona rezultira stvaranjem peroksinitrita, vrlo moćnog oksidansa koji potiče nitriranje proteina na tirozinu i proizvodnju 3-nitrotirozin (3-NT) (Qian i sur., 2013.). Razina 3-NT-a je kod pacijenata povezana sa smrtnošću prouzrokovanom akutnim oštećenjem bubrega neovisno o težini bolesti (Qian i sur., 2013.). Visoka proizvodnja NO u kombinaciji s niskim ROS-om omogućuje nitrozilaciju tiola, što može utjecati na HIF-1 $\alpha$ , PHD2 i SIRT1. S povećanim razumijevanjem mehanizama koji leže u pozadini ovih procesa, mogu se razviti preciznije i učinkovitije terapije za sve veći broj bolesti na koje utječe HIF-NO signalizacija. Moguće je da mikrookolišni uvjeti tumora, posebice dostupnost kisika, utječu na redoks ravnotežu resveratrola i mijenjaju njegovu kemotoksičnu aktivnost, ali i slabe aktivnost cisplatine. Iako uporaba prirodnih komponenti u kombinaciji s cisplatinom često daje prednost u smanjenju rasta tumora, angiogeneze, kronične upale i imunosne tolerancije, čime se smanjuju posljedice toksičnosti, potreban je oprez kod primjene multimodalne terapije jer uvjeti mikrookoliša tumora mogu značajno utjecati na konačni ishod terapije tumora. Međutim, točan mehanizam interakcije između resveratrola, cisplatine i HT ostaje nejasan i potrebno ga je dodatno istražiti.

## **5.2. Antiangiogeni potencijal sustavne hipertermije, cisplatine i nanokristala resveratrola u inhibiciji rasta Ehrlichovog solidnog karcinoma u miša**

Iako je potvrđeno da primjena resveratrola, fitoestrogena i polifenola, ima antioksidacijska, protuupalna, kardioprotektivna i protutumorska svojstva, ipak terapijska primjena resveratrola ograničena je njegovim fizičko-kemijskim i farmakokinetičkim značajkama. Njegova slaba topljivost i nestabilnost, brzi metabolizam, kratko vrijeme polueliminacije te niska bioraspoloživost i brza eliminacija glavne su prepreke njegove potpune djelotvornosti u terapiji tumora i drugih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom (Amri i sur., 2011.; Singh i sur., 2015.).

Jedan od mogućih načina za iskorištavanje antitumorskih svojstava resveratrola je povećanje količine slobodnog trans-resveratrola na ciljanom mjestu djelovanja, zaobilazeći mogućnost brzog metaboliziranja u crijevima i jetri (Singh i sur., 2015.). Jedan od važnijih pristupa povećanja bioraspoloživosti slabo topljivih tvari je smanjenje veličina čestica takve tvari do

nanometarskog područja dimenzija, odnosno izrada nanokristala slabo topljive tvari. Teško topljiva tvar u obliku nanokristala dispergirana je najčešće u vodeno disperzijsko sredstvo (> 97%). Mali udjel stabilizatora (1-2%) osigurava stabilnost takve nanosuspencije, a stabilizatori su pomoćne tvari koje se uobičajeno koriste u izradi odobrenih farmaceutskih oblika lijekova (Sigfridsson i sur., 2017.). Smanjenjem veličine čestica slabo topljive tvari do nanometarskih dimenzija različitim tehnološkim postupcima (primjerice, vlažno mljevenje, visokotlačno homogeniziranje) odnosno povećanjem površine čestica takve tvari u odnosu na volumen, povećava se topljivost i brzina otapanja te se poboljšavaju biofarmaceutske značajke slabo topljive tvari (Sun, 2012.). Primjena i terapijska vrijednost tehnologije nanokristala intenzivno se ispituje u razvoju farmaceutskih oblika lijekova za različite puteve primjene (oralna, dermalna, pulmonalna, intravenska, intramuskularna, intraperitonejska) i ciljanu dostavu (engl. *targeted drug delivery*) (Sun, 2012.). Posebno je potrebno naglasiti da je primjena tehnologija nanokristala znatno unaprijedila terapijsku vrijednost određeni djelatnih tvari u odobrenim lijekovima za oralnu (primjerice, sirolimus, aprepitant, fenofibrat) i parenteralnu (olanzapin, paliperidon) primjenu na području Europske unije (Malamatari i sur., 2018.).

Prema literaturnim podacima nanokristali citostatika paklitaksela pokazali su se kao perspektivan smjer razvoja farmaceutskih oblika za primjenu protutumorskih djelatnih tvari (De Smet i sur., 2012.; Hollis i sur., 2013.; Annaji i sur., 2021.).

Iako postoje brojni radovi kojima je dokazana protutumorska učinkovitost resveratrola, korištenje nanokristala resveratrola kao mogućeg načina poboljšanja fizičko-kemijskih i biofarmaceutskih značajki resveratrola, uz minimalno korištenje pomoćnih tvari bez značajnog utjecaja na sigurnosni profil resveratrola, do sada nije provedeno, posebice ne postoje podaci o združenoj primjeni nanokristala resveratrola i hipertermije.

Najčešći put primjene nanokristala je oralni. Tekući oralni oblici (suspencije) te čvrsti oralni oblici (tablete i kapsule) najčešći su farmaceutski oblici korišteni za primjenu nanokristala (Malamatari i sur., 2018.).

U ovom radu primjenili smo oralni unos suspencije nanokristala resveratrola pomoću gastrične kanile te potvrdili pad težine u svim skupinama obrađenim s Cis i kombinacijama NK Res sa i/ili bez hipertermije (Slika 44 ). Osim toga u skupini Cis + HT, NK Res + Cis te NK Res + Cis + HT smanjenjen je volumena tumora, povećana je inhibicija rasta tumora uz



produljenje životnog vijeka (Slika 45 i 46, Tablica 13, 14 i 15). Stoga se može pretpostaviti da povećanje životnog vijeka može biti posljedica smanjenja nutritivnih sastojaka u probavnom sustavu, smanjene ekspresije GLUT-1 prijenosnika i posljedično smanjenog unosa glukoze u tumorske stanice, te inhibicije i kašnjenja u proliferaciji i rastu tumorskih stanica (Slika 45, Tablica 13 i 14). Pokazano je da resveratrol značajno inhibira proizvodnju laktata, smanjujući invaziju stanica tumora i rezistenciju na apoptozu. Točnije, laktati snižavaju pH vrijednost u stanici stvarajući kompetitivnu prednost prilikom invazije dok glikolitički put vodi rezistenciji na apoptozu (Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.). Čini se da nanokristali resveratrola imaju još bolji učinak i značajno potiskuju metabolizam glukoze u stanicama raka. Očito, smanjenje unosa glukoze, smanjuje glikolitički metabolizam te tako proizvodnju laktata. Među glavnim odrednicama tumorskog glikolitičkog puta, pronađena je smanjena ekspresija proteina prijenosnika glukoze 1 (GLUT-1) koji može biti važniji od heksokinazne aktivnosti. Pad težine miševa zapažen je posebice u skupini NK Res + Cis + HT se može tumačiti promjenama u absorpciji hrane zbog zadržavanja nanokristala u epitelu probavnog sustava i u mezenterijalnim limfnim čvorićima (Hollis, 2014.) za razliku od kontrolnih miševa s Ehrlichovim solidnim tumorom gdje je zapaženo značajno povećanje tjelesne težine životinja zbog brzog i progresivno rasta tumorskih stanica (Slika 44). Točnije, oralno primijenjeni nanokristali susreću se s nizom fizioloških spojeva te pH gradijentom probavnog sustava koji se kreće od pH 1,0-2,0 želuca, preko pH 6,0-7,4 tankog crijeva do pH >7,0 u rektumu. Nanokristali koji „prežive“ susret s probavnim sustavom, apsorbiraju se putem sluznice. Kaveolin-posredovana endocitoza i makropinocitoza posredovana enterocitima kao i apsorbicija membranskim stanicama (M-stanice) smatraju se putevima prijenosa nanokristala iz probavnog sustava. Ovakav stanični prijenos nanokristala potvrđen je na modelu MDCKII jednoslojne kulture stanica primjenom nanokristala kumarina gdje je pokazano da je kaveolin-posredovana endocitoza dominantan put prijenosa, kao i da su endoplazmatski retikulum/golgijevo tijelo te golgijevo tijelo/plazmatska membrana uključeni u egzocitozu nanokristala (Miao i sur., 2016.) Protukancerogena aktivnost NK Res u kombinaciji s Cis protiv Ehrlichovog solidnog tumora vidljiva je kroz produženi životni vijek što je pouzdano načelo za prosuđivanje protukancerogene učinkovitosti bilo kojeg spoja. Najbolje povećanje preživljavanja (%ILS) zapaženo je u skupini NK Res + Cis (81,66%) te Cis + HT (67,90%) (Tablica 13). Ovi rezultati također ukazuju da ove skupine imaju izravni citotoksični ali i imunomodulatorni učinak.

Primjena resveratrola može poništiti rezistenciju na više lijekova, a u kombinaciji s cisplatinom ima aditivni i/ili sinergistički učinak u povećanju kemosenzitivnosti stanica raka. Resveratrol smanjuje citotoksični učinak na zdrave stanice i modulira imunski odgovor u mikrookruženju tumora reguliranjem lučenja citokina/kemokina, imunski kontrolne točke/MHC-I (engl. *Major Histocompatibility Complex I*), PD-1/PD-L1 u stanicama raka, zatim regulira nuklearni faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), signalni put AKT/mTOR i aktivaciju receptora na prirodnim stanicama ubojicama (NK) (Chhabra i sur., 2021.; Yang i sur., 2021.). Imunosne kontrolne točke odnose se na niz imunoregulacijskih molekula koje moduliraju imunski odgovor. Primjerice, proteini eksprimirani na površini T-stanica (uključujući PD-1 i CTLA-4) i njihovi ligandi (PD-L1 i B7-1/B7-2), koje eksprimiraju stanice raka i stanice koje predstavljaju antigen, potrebni su za spriječavanje pretjeranog imunskog odziva. Međutim, oni prigušuju protutumorski imunitet ograničavanjem aktivnosti T-stanica, što ih čini obećavajućim terapijskim ciljevima kod raka (Delmas i sur., 2021.). Iako su imunoterapije koje koriste protutijela za blokiranje/neutraliziranje kontrolnih točaka usmjerena na PD-L1 ili PD-1 dokazale svoju superiornost nad konvencionalnim kemoterapijama ili ciljanim terapijama jačanjem protutumorskog imuniteta posredovanog T-stanicama, pojavila su se i neka ograničenja uključujući nisku stopu "odgovora" (<50%; bez obzira na vrstu raka), visoka cijena injekcija i rijedak rizik od hiperprogresije, Čini se da primjena NK Res može pojačati imunski odgovor zbog bolje biodostupnosti nanoblika resveratrola gdje je iz rezultata Kaplan-Meierove analize (Slika 45) i log-rank testa (Tablica 14) razvidno da obrada miševa s NK Res + Cis pokazuje najbolji učinak u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,00117$ ), a potom slijede NK Res + Cis + HT ( $p=0,00288$ ), Cis + HT ( $p=0,003099$ ) te Cis ( $p=0,00933$ ). Prema tome, razvidno je da resveratrol kao i njegovi nanokristali igraju važnu ulogu u modulaciji osi PD-1/PD-L1 u stanicama raka, što ukazuje na mogućnosti potencijalne terapijske primjene resveratrola i NK Res u kombinaciji s PD-L1 ili anti-PD-1 inhibitorima.

Ligand programirane smrti 1 (PD-L1)/B7 homolog 1/klaster diferencijacije 274 (CD274) je transmembranski protein tipa I superfamilije imunoglobulina kodiran genom CD274. PD-L1 sastoji se od izvanstaničnih domena sličnih imunoglobulinu V i C, transmembranske domene i kratkog citoplazmatskog repa koji ne posjeduje kanonske signalne motive (Ying i sur., 2021). PD-L1 se uglavnom izražava na različitim vrstama stanica raka, kao i na imunskim stanicama kao što su T i B stanice, makrofagi, mastociti, stanice prirodne ubojice (NK) i dendritične stanice (DC). PD-L1 veže se na svoj receptor programirane smrti 1 (PD-1) na

stanicama T koje infiltriraju tumor (TIL), što dovodi do aktivacije fosfataza koje sadrže Src homolognu regiju 2 domene. PD-L1 uzrokuje imunosnu evaziju tumorskih stanica olakšavajući anergiju i iscrpljenost stanica T, potičući aktiviranu apoptozu stanica T i potiskujući aktivnost i proliferaciju stanica T (Teng i sur., 2015.). Nedavna istraživanja potvrdila su izvanstanični i substanični smještaj PD-L1, naime nuklearni PD-L1 (nPD-L1), citoplazmatski PD-L1 (cPD-L1), topljivi PD-L1 (sPD-L1) i PD- izvanstaničnih vezikula L1 (EV PD-L1), što bi moglo rasvijetliti otpornost na anti-PD1/PDL1 terapiju. Tako NK Res u kombinaciji s cisplatinom ili nekim drugim kemotoksikom može biti kao adjuvant za poboljšanje učinkovitosti anti-PD-1/anti-PD-L1 imunoterapije (Ying i sur., 2021.).

Inhibiciju rasta tumora i povećano preživljenje dijelom mogu biti posljedica epigenetske regulacije nanokristala resveratrola na aktivnost HDACs koje kontroliraju sve korake tumorogeneze, od inicijacije rasta i progresije tumora, angiogeneze, metastaziranja do djelovanja na aktivnosti HSP-a i HIF-1 $\alpha$ , i brojne druge procese (Qian i sur., 2006.; Munshi i sur., 2005.; Li i sur., 2020.; Zhang i Zhong, 2014.). Prema dobivenim rezultatima NK Res značajno utječu na aktivnost HDAC-a sam ili u kombinaciji s cisplatinom i/ili hipertermijom. U usporedbi s resveratrolom, NK Res ima značajniji učinak u inhibiciji HDAC-a (Slika 48) što je značajan doprinos u inhibiciji kontrole razvoja i progresije tumora. Rezultati su u suglasju s rezultatima Qian i sur., (2006.) koji su pokazali da HDAC inhibitori pokazuju antiangiogeno djelovanje snižavanjem regulacije proangiogenih gena poput VEGF, bFGF i HIF 1 $\alpha$  što je u suglasju s našim rezultatima (Slike 51, 52 i 60b, Tablica 16). Drugi učinak HDAC inhibitora je i inhibicija popravka DNA, tako da mogu senzibilizirati tumorske stanice na kemo i radioterapiju povećavajući učinke oštećenja DNA ovim terapijama (Munshi i sur., 2005.). Točnije, prekomjerna aktivnost HDAC-a neprimjereno potiskuje transkripciju tumor supresorskih gena (Zhang i sur. 2014.). Nadalje, hipoksični uvjeti reguliraju funkciju HDAC, izravno i neizravno, kroz posredovanje HDAC-a u kisikom regulirane ekspresije gena i hipoksijom-inducirane angiogeneze (Kim i sur. 2001.). Također treba istaknuti da NK Res učinkovito inhibira aktivnost HSP70 (Slika 49).

Poznato je da je HSP70 snažan negativni regulator stanične smrti i bitan čimbenik koji podržava preživljavanje tumorskih stanica i rast tumora; štoviše, povišene razine HSP70 unutar tumora koreliraju s lošom prognozom u bolesnika s karcinomom (Ciocca i Calderwood, 2005.). Osiromašenje HSP70 ne samo da povećava smrt tumorskih stanica, već i selektivno senzibilizira maligne stanice na kemoterapijska sredstva (Zhang i sur., 2020.).

Tako, niža regulacija HSP70 preokreće otpornost na stanice raka, vjerojatno kroz njegovu sposobnost da inhibira apoptozu i uzvodno i nizvodno od mitohondrijske signalizacije (Ray i sur. 2004.).

Međutim, kombinacija NK Res + Cis sa i/ili bez hipertermije povećava razinu HSP70 stvarajući imunogene peptide vezanjem za protein tumora gdje kao “signali opasnosti” potiču imunosni odziv kroz dozrijevanje i bolje predočavanje antigena od strane makrofaga, dendritičkih stanica te aktivaciju stanica T i NK. Nadalje, hipertermija stimulira pro-oksidativne reakcije pri čemu se povećava produkcija reaktivnih oblika kisika što dovodi do oksidativnog stresa i apoptoze stanica (Poe i O’Neill.; 1997.; Slimen i sur., 2014.). Zanimljiv je i podatak da primjena hipertermije u terapijske svrhe izaziva ekspresiju HSP-a na površini normalnih i tumorskih stanica. Međutim, nakon oporavka pri 37 °C ekspresija HSP-a je prisutna samo kod tumorskih stanica (Multhoff, 1995.). Stanice s izraženim HSP-om su osjetljivije na citotoksično djelovanje NK stanica. Tako, nakon nekroze stanica dolazi do otpuštanja HSP-a koji stimuliraju makrofage i dendritične stanice na lučenje citokina te aktiviraju antigen predočne stanice čime se pojačava imunosni odgovor prema tumorskim stanicama (Van Der Zee, 2002.). Iz ovoga slijedi da aktivnost makrofaga može biti potaknuta ne samo nanokristalima resveratrola, nego i apoptozom, hipertermijom te HSP proteinima. Prema tome uloga HSP70 je dvostruka; osim indukcije apoptoze ima i imunostimulacijski učinak. Štoviše, Kim i sur. (2016.) su razjasnili ključnu ulogu HSP70 kao proangiogenog regulatora. Zanimljivo je i da je razina HSP90 bila snižena u svim pokusnim skupinama u odnosu na kontrolne skupine (Slika 50). Prema tome, dvostruka inhibicija HSP90 i 70 može pojačati protutumorsku i antiangiogenu učinkovitost lijekova (Miyagawa i sur., 2014.). Doista razina VEGF-a je snižena u svim skupinama u odnosu na kontrolne skupine ali posebice obradom miševa s NK Res ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,01$ ) i NK Res + Cis ( $p \leq 0,05$ ). Gustoća mikrožilja potvrđuje da je NK Res u uvjetima sa i/ili bez hipertermije snažan antiangiogeni čimbenik. Ovi rezultati potvrđuju značaj NK Res kao HDAC inhibitora i njihovu poveznicu u regulaciji proangiogenih gena poput VEGF, bFGF i HIF-1 $\alpha$  (Qian i sur., 2006.; Kučan i sur., 2023.). Jasno je da različiti mikrokolišni uvjeti mogu mjenjati HDAC i njen odnos u regulaciji HIF čimbenika, poput izrazito visoke razine NO kao i visoke razine O<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji mogu stabilizirati HIF-1 $\alpha$  oksidacijom i inhibicijom domene prolil hidroksilaze 2 (PHD2) i čimbenika inhibicije HIF-1 (FIH) te utjecati na put angiogeneze, proliferacije i apoptoze. Pretjerana ekspresija HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  podjedinice pojačavaju stvaranje krvnih žila, malignitet

tumora, metastaziranje i otpornost na terapiju. Ovakve promjene posebice su vidljive u kombinaciji Cis + HT i NK Res + Cis + HT gdje je razina HIF-a bila najviše izražena. Rezultat navedenog je i smanjena inhibicija rasta tumora 33. dana u kombinaciji NK Res + Cis + HT što ukazuje na važnost ROS/RNS radikala u stabilizaciji HIF čimbenika zajedno s promjenama tumorskog mikrookoliša. Promjenjeni mikrookoliš tumora jest važan čimbenik proonkogene i antionkogene prirode HIF-a i njegove signalizacije. Hiperprodukcija ili disregulacija razine peroksinitrita može dovesti do kroničnog upalnog odgovora koji je mitogeni signal i potiče proliferaciju tumorskih stanica (Bauer, 2014.).

Također treba istaknuti da porodica proteina toplinskog šoka (HSP) uključuje skupinu molekularnih nadzornika koji igraju važnu ulogu tijekom smatanja proteina i konformacijskog sazrijevanja. HSP-90 je kritično uključen u funkciju i stabilnost mnogih onkogenih produkata i molekula koje djeluju na signalne procese unutar stanica. Tako je pokazano da inhibicija HSP90 vodi inhibiciji Raf-1, cdk4 i Akt17. Inhibicija Akt signalnog puta je posebice važna zato što Akt regulira preživljavanje stanica putem fosforilacije višestrukih supstrata uključenih u regulaciju apoptoze (Smith i sur., 2005.; Ito i sur., 2009.). Tako, smatra se da destabilizacija protein-HSP90 multi-molekularnih kompleksa vjerojatno uzrokuje brzo razaranje nekoliko važnih signalnih proteina preko ubikvitin-proteasom sustava (Stancato i sur.1997.). Ekspresija HSP90 je pojačana u tumorima, u usporedbi s normalnim tkivom, a tumorske stanice su posebno osjetljive na HSP90 inhibiciju (Kamal i sur., 2003.), kao i na sposobnost HSP90 inhibitora da poboljšaju osjetljivost tumorskih stanica na hipertermiju i djelotvornost kemoterapije protiv raka (Oršolić i Car, 2014.) na što ukazuju i naši rezultati povećanog preživljavanja životinja (Slika 45).

Kao što je spomenuto u skupinama izloženim hipertermiji, pro-oksidativne reakcije hipertermije preko povećane produkcije reaktivnih oblika kisika dovode do oksidativnog stresa i apoptoze stanica (Slimen i sur., 2014.) što potvrđuje visoka razina MDA u jetri, bubregu i tumoru (Tablica 17). Toplinski stres povećava razinu mitohondrijskog superoksidnog aniona ( $O_2^{\cdot-}$ ).  $O_2^{\cdot-}$  je prvi nusprodukt jedno-elektronske redukcije kisika. Ova reakcija se događa na određenim mjestima prijenosnog lanca elektrona u mitohondrijima koji su važan izvor  $O_2^{\cdot-}$  tijekom hipertermije. Nastanak  $O_2^{\cdot-}$  također je usko povezan s jednovalentnom redukcijom kisika preko mitohondrijskog semikinona. Semikinon radikali su izravno opaženi u portalnoj krvi hipertermičnih štakora (Hall i sur., 1994.). Moguće je da toplinska denaturacija redoks proteina koji sadrže flavin može povećati brzinu reakcije redukcije flavoproteina s kisikom da

nastane  $O_2^{\cdot-}$ . Toplinski stres smanjuje razinu superoksid mRNA dismutaze 1 (SOD-1), citoplazmatskog proteina SOD i aktivnosti enzima, što dovodi do povećanja ROS proizvodnje (Multhoff i sur., 2012.). Nadalje, toplinski stres dovodi do prekomjerne proizvodnje iona prijelaznih metala, koji mogu donirati elektrone kisiku, tvoreći superoksidne anione (Zheng i sur., 2021.). Na taj način je dokazano da toplinski stres povećava brzinu oslobađanja željeza iz feritina, a postoji i pozitivan odnos između veličine otpuštanja željeza i količina ksantin oksidaze (XO) u obliku tipa O, a time i stope proizvodnje  $O_2^{\cdot-}$  (Chen i sur., 2019.).  $O_2^{\cdot-}$  je prethodnik većine ROS i posrednik u oksidativnoj lančanoj reakciji. Vrlo je reaktivan i čini se da ne difundira lako kroz staničnu membranu. Superoksid anioni se mogu razgraditi u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) bilo spontano ili kroz reakciju kataliziranu enzimom SOD. Osim toga,  $O_2^{\cdot-}$  može reagirati s drugim radikalima uključujući NO stvarajući peroksinitrit (ONOO), koji je vrlo snažan oksidans.

Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) je drugi ključni igrač u mitohondrijskom ROS-u. To je proizvod detoksikacije superoksida od strane MnSOD. Pokazalo se da toplinski stres povećava  $H_2O_2$  i stvaranje hidroksilnih radikala. Proizvodnja  $OH^{\cdot}$  odgovara povećanom stvaranju  $O_2^{\cdot-}$  (Hendrickson i O Poyton, 2015.). Budući da hipertermija pojačava proizvodnju iona prijelaznih metala, hvatanje elektrona kisikom dovodi do stvaranja  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  se dalje reducira do ekstremno reaktivnog hidroksilnog radikala preko Fentonove reakcije, stvarajući ekstremno reaktivan hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ). Zbog svoje male veličine i relativno benigne reaktivnosti, u usporedbi s ostatkom ROS-a,  $H_2O_2$  može slobodno difundirati poprijeko stanične membrane te ostvariti svoje toksične učinke daleko od mjesta proizvodnje ROS-a.  $OH^{\cdot}$  ima vrlo kratko vrijeme poluraspada i reagira s bilo kojom molekulom u neposrednoj blizini.  $H_2O_2$  može izazvati reverzibilne kovalentne modifikacije cisteinskih (Cys) tiolnih ostataka smještenih u aktivnim i alosteričkim mjestima specifičnih proteina, što rezultira promjene njihove aktivnosti i funkcije. Bilo koji protein koji sadrži deprotonirani Cys ostatak osjetljiv je na oksidaciju pomoću  $H_2O_2$ . Proteinski tioli mogu proći dalje dvoelektronske oksidacije s  $H_2O_2$  u sulfinsku ( $R-SO_2H$ ) ili sulfonske kiseline ( $R-SO_3H$ ). Različiti proteini mogu biti modificirani s  $H_2O_2$ , uključujući fosfataze, transkripcijski čimbenici, ionski kanali, antioksidansi i metabolički enzimi, strukturni proteina i protein kinaze. (Hendrickson i O Poyton, 2015.). Zahvaljujući povećanom oksidacijskom stresu hipertermija u kombinaciji s cisplatinom povećava svoj toksični učinak na stanice tumora, apoptozu stanica tumora ali i već opisani učinak u stimulaciji makrofaga, dendritičkih stanica i stanica NK i T. Patofiziološki mehanizmi pojačanog protutumorskog djelovanja pri hipertermiji nisu do kraja

razjašnjeni. Ukupan porast u DNA oštećenjima koji nastaje nakon međureakcije hipertermije i mnogih tumorskih lijekova ne zna se da li je posljedica pojačanog unosa lijeka u stanicu, promjena u unutarstaničnoj raspodjeli lijeka, promjeni metabolizma lijeka, porastu međureakcije lijeka s DNA ili termalne inhibicije popravka DNA (Oršolić i sur., 2010.; 2013.; Oršolić i Car, 2014.; Oršolić i sur., 2020). Neki od mehanizama cisplatine pri hipertermiji opisani su u radu (Oršolić i sur., 2020.). Hipertermija povećava citotoksični učinak cisplatine induciranjem strukturnih i funkcionalnih promjena u stanicama kroz različite mehanizme: 1. povećano nakupljanje cisplatine; 2. denaturacija i agregacija proteina, s posljedičnim zaustavljanjem staničnog ciklusa; 3. poremećaj mitotičkog vretena i enzima; 4. inaktivacija sinteze proteina, inhibicija sinteze DNA, transkripcije, obrade i translacije RNA; 5. pojačano stvaranje adukta s kritičnim strukturama; 6. pojava različitih lezija na hipertermijskim temperaturama i inhibicija procesa popravka DNA izazvana toplinom; 7. povećana razgradnja agregiranih/pogrešno savijenih proteina kroz proteasomalne i lizosomalne putove; 8. poremećaj membranskog citoskeleta; 9. učinci na oksigenaciju tumora i mikrookruženje tumora (npr. odvajanje oksidativne fosforilacije) koji dovode do smanjenih razina ATP-a; i 10. promjene u propusnosti membrane koje uzrokuju povećanje unutarstaničnih razina  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ . Svi ovi mehanizmi, zajedno s povećanim aktivnim ili pasivnim prijenosom kroz oštećene stanične membrane i povećanu topljivost cisplatine i interakciju s DNA vode formiranju adukata cisplatine s DNA, prvenstveno adukata umreženih unutar lanaca, pridonose unutarstaničnom nakupljanju cisplatine što vodi aktivaciji apoptoze, smanjenom broju stanica tumora i produljenom životnom vijeku životinja (Slika 45, Tablica 13).

S druge strane, hipertermija povećava nastanak dušik oksida, vazodilatatora, koji nastaje razgradnjom arginina u citrulin, u reakciji koju katalizira obitelj nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH)-ovisnih enzima koji se nazivaju dušik-oksidsintaze (NOS) (Eliceiri i sur., 1999.) Teška hipertermija povećava razinu NOS-a i stimulira oslobađanje NO (Ratcliffe i sur., 2007.). Stvaranje NO u mitohondrijima posljedično se veže na skupine hema iz citokroma (posebice citokrom oksidaza) i inhibira proces respiracije. Inhibicijom respiracije, stimulira se formiranje  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . ONOO je vrlo štetno sredstvo s širokim repertoarom ciljeva i štetnih staničnih učinaka. ONOO mijenja proteine nitriranjem ostataka tirozina, stvaranjem ditirozina i oksidacijom triptofana i Cys. Glavni mitohondrijske mete ONOO su kompleksi I, II, IV i V prijenosnog lanca elektronu mitohondrijima, akonitaza, kreatin

kinaza, superoksid dismutaza, mitohondrija membrane i mitohondrijska DNA (mtDNA) (Hendrickson i O Poyton, 2015.).

Osim mitohondrija, ROS stvaraju NADPH oksidaze dok pretvaraju NADPH u NADP<sup>+</sup>. Primjena hipertermije (HT) povećava NADP<sup>+</sup>/NADPH omjer bez utjecaja na NADPH podjedinice, kao i na ekspresija mRNA NADPH oksidaze 1 (NOX1) (Moon i sur., 2010). Prema podacima Moon i sur., (2010.) hipertermija aktivira NADPH oksidaze putem pojačane regulacije NOX1. NOX-om posredovana proizvodnja ROS-a preko ERK signalnog puta dovodi do aktivacije hipoksija inducibilnog čimbenika-1 (HIF-1). Upravo ovakav put vidljiv je i u kombinaciji Cis + HT kroz povećanje HIF aktivnosti i iNOS. HIF olakšava rast tumora potičući: 1. angiogenezu preko VEGF i SDF-1; 2. metabolizam preko regulacije GLUT-1 i GLUT-3 i glikolitičkih enzima; 3. regulaciju stanične apoptoze i staničnog preživljenja preko BNIP-3, p53, TGF- $\beta$  i bFGF. HIF- $\alpha$  pridonosi metastaziranju mijenjajući adhezivnost i motilitet stanice regulacijom epitelno-mezehimalne tranzicije i ekspresije E-cad, ZEB-1-2 i TCF3 kao i migraciju i invaziju preko CXCR4, CAIX, LOX, MMP-2 i MMP-9. Točnije, pretjeranom ekspresijom HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  podjedinica pojačavaju stvaranje krvnih žila, malignitet tumora, metastaziranje i otpornost na terapiju. Aktivacijom HIF puta dolazi do transkripcije više od 1000 različitih gena povezanih sa angiogenezom te metastaziranjem poput VEGF, SDF-1, Ang-1, PlGF, PDGF-B, čimbenika matičnih stanica (SCF, engl. *Stem Cell Factor*), VE-kadherina, efrina-B, CD31, sema4D, plaksinB1, integrina, MMPs, nodala, te endotelnog VEGFR-1 i VEGFR-2 (Rey i Semenza, 2010). Članovi HIF obitelji imaju različite uloge u procesu angiogeneze. HIF-1 $\alpha$  potiče stvaranje izbojaka krvnih žila, dok HIF-2 $\alpha$  pomaže u održavanju krvnih žila. Također HIF-1 se smatra početnim čimbenikom odgovora na hipoksiju (<24 h), dok je HIF-2 odgovoran za kronični odgovor (>24 h).

Međutim treba naglasiti i mogućnosti različitih interakcija između slobodnih radikala. Poznato je da dušikov (II) oksid posjeduje pro-oksidativna i anti-oksidativna svojstva. U reakciji sa superoksidom, NO stvara vrlo toksičan peroksinitrit koji može potaknuti lipidnu peroksidaciju (Oršolić i Jazvinščak Jembrek, 2022.), dok peroksinitrit s lipofilnim peroksilnim radikalima (ROO•) stvara relativno stabilni ROONO koji može zaustaviti proces lipidne peroksidacije. Nadalje, sam resveratrol stimulira različite signalne puteve u normalnim i tumorskim stanicama, te ovisno o koncentraciji i uvjetima u mikrookolišu, može imati antioksidativni ili prooksidativni učinak. Primjerice, aktivacija Nrf-2 signalnih puteva štiti normalne stanice od oksidativnog stresa odnosno slobodnih radikala stimulacijom Nrf2



posredovanog enzima kinon reduktaze (NQO1, engl. *NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1*), za razliku od tumorskih stanica kod kojih je Nrf2 uključen u proces promocije tumora te u kasnijoj fazi odgovoran i za rezistenciju tumora na kemoterapiju (Shaito i sur., 2020.; Ančić i sur., 2022.).

Zanimljivo je da koncentracija NO, prati razinu iNOS u tumoru miševa obrađenih s Cis i Cis + HT dok je razina arginazne aktivnosti niska što govori o polarizaciji prema M1 fenotipu (Slike 55, 56, 59 i 60). Visoku razinu NO u tumoru možemo vidjeti i kod skupine NK Res + Cis + HT ali i povećanu arginaznu aktivnost što pokazuje polarizaciju od M1 prema M2 fenotipu.

Razlike u populacijama makrofaga posljedica su mikrokolišnih uvijeta; citokinskog miljea te metaboličkog stanja tkiva, koji uz modulaciju ekspresije gena mijenjaju i metabolički status stanica. Proces upale koji završava uspostavom homeostaze tkiva nakon uklanjanja izvora upale zahtjeva određeni vremenski slijed djelovanja imunskih stanica. Makrofagi pritom prolaze polarizaciju od M1 fenotipa; ubijanje patogena i novačenje ostalih imunskih stanica na mjesto upale, prema M2 fenotipu; poticanje proliferacije stanica i popravka tkiva.

Pojam polarizacije odnosi se na svojstvo plastičnosti populacija makrofaga; dinamične adaptacije staničnog programa, a time i fenotipa, na uvijete u kojima se nalaze. Opće prihvaćena klasifikacija makrofaga dijeli ih u dvije klase; M1 i M2, s obzirom na profil genske ekspresije i tip upalnih medijatora koje izlučuju.

M1 skupinu makrofaga karakterizira proupalna aktivnost; stvaranje i lučenje proupalnih citokina od kojih su neki čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ , engl. *Tumor Necrosis Factor*), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12 i IL-18 te kemokini CCL5, CXCL9, CXCL10 i CXCL5 kojima se potiče stanični imunski upalni odgovor. Njihova sposobnost predočavanja antigena pritom se povećava zbog pojačane ekspresije gena glavnoga sustava tkivne snošljivosti skupine II. (MHC-II, engl. *Major Histocompatibility Complex Class II*). Pojačano eksprimiraju i kostimulacijske molekule CD40, CD80 čime se pojačava učinak aktivacije limfocita Th1. Zbog povećane sinteze dušikovog oksida (NO) djelovanjem inducibilne dušik oksid sintaze te stvaranja reaktivnih kisikovih oblika (ROS) izravno oštećuju fagocitirane mikroorganizme i sprečavaju proliferaciju stranih stanica i vlastitih promijenjenih stanica (Wang i sur. 2014). Diferencijacija makrofaga u ovu fenotipsku grupu potaknuta je mikrobnim produktima kao što su lipopolisahardi (LPS), lipoteikoična kiselina (LTH),

granulocitni-makrofagni stimulirajući čimbenik (GM-CSF, engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-StimulatingFactor*) te citokin interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Višestruko djelovanje makrofaga posljedica je reakcije na velik broj vanjskih podražaja i sposobnosti proizvodnje velikog broja efektorskih molekula potrebnih za međustaničnu komunikaciju, mikrobnu obranu te modulaciju upalnih reakcija putem kojih makrofagi potiču, suzbijaju ili moduliraju kako urođene, tako i adaptivne imunosne odgovore (Murray i Wynn, 2011.). Regulacijski mehanizmi polarizacije makrofaga u M1 i M2 makrofage su suprotni, a u većini slučajeva klasično aktivirani M1 makrofagi uključeni su u upalni odgovor, uništavanje patogena i protutumorsku imunost, dok alternativno aktivirani M2 makrofagi utječu na protuupalni odgovor, zacjeljivanje rana i imaju prokarcinogene značajke potičući proces angiogeneze i rasta tumora. Specifičnosti protuupalnih makrofaga M2 skupine jesu poticanje razrješenja upale, obnova i remodeliranje oštećenog tkiva, obrana od helminta te uključenost u alergijske reakcije. Na površini nose biljege CD36, transferinske receptore CD71 i CD163 te makrofagni manozni receptor (MMR ili CD206). Odlikuje ih i pojačana ekspresija enzima arginaza-1 (Arg-1) te transglutaminaze 2 čime potiču sintezu proteinskog izvanstaničnog matriksa. U nekrotičkim regijama tumora, u uvjetima hipoksije i manjka glukoze, uočena je specifična populacija makrofaga nazvana tumoru pridruženi makrofagi (TAM, engl. *Tumor Associated Macrophages*). Pretpostavlja se kako oni potiču remodeliranje strome, supresiju imunosnog sustava i metastaziranje tumora stvaranjem plazmina i katepsina B koji pojačavaju invazivnost tumorskih stanica. Iako su dugo vremena TAM smatrani podtipom M2 klase zbog stvaranja IL-10, karakterizira ih signalni put aktivacije nalik M1 makrofagima te poprimaju neke proupalne značajke. Važno je spomenuti da hipoksija, povećana koncentracija mliječne kiseline i reduciranih metabolita, koji karakteriziraju oštećena tkiva i prisustvo tumorskih stanica, moduliraju funkciju makrofaga aktivirajući čimbenik HIF (Escribese i sur., 2012.). Faktor HIF-2 $\alpha$  stimulira obnovu izvanstaničnog matriksa, dok HIF-1 potiče sintezu citokina koji aktiviraju Th1 limfocite, odnosno privlači i potiče stečeni imunosni odgovor.

Promjenjivost i plastičnost makrofaga te njihove imunomodulatorne i protu-upalne značajke jasno su prikazane na Slici 56 gdje je razvidna stimulatorna aktivnost NK Res i snažni protuupalni učinak u upalnim uvjetima dok cisplatina pokazuje aktivnost u stimulaciji makrofaga tijekom upale posebice u hipertermijskim uvjetima uz inhibiciju arginazne aktivnosti. Prema tome, ovisno je o patofiziološkom statusu tkiva, posebice metaboličkim uvjetima, prisustvu mikrobnih antigena i imunomodulatora poput citokina i kemokina koji

mijenjaju lokalno i vremenski, makrofagi poprimanje različite funkcionalne značajke. U slučaju promijene uvjeta, svojstvo plastičnosti odnosno funkcionalne adaptabilnosti, omogućuje im usmjeravanje prema potrebnim ulogama (Funes i sur., 2018.). Tako različiti stimulansi u izvanstaničnom prostoru i njihova koncentracija, mogu istovremeno potaknuti ekspresiju proteina karakterističnih za oba fenotipa. Različiti profili genske ekspresije, kao i pleiotropnost uključenih gena rezultiraju stvaranjem spektra populacija makrofaga koji se teško razlučuje na isključivo M1 ili M2 fenotip (He i sur., 2020.).

Nadalje, obrada s Cis, Cis + HT, NK Res + Cis, i NK Res + Cis + HT pokazuje i promjene u masi slezene u odnosu na kontrolne skupine ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,01$ ; i  $p \leq 0,001$ ). Ove promjene su očekivane s obzirom da je slezena važan hematopoetski i limfatički organ. Obrada miševa s NK Res + Cis izazvala je neznatne promjene u masi bubrega (Slika 47).

Aktivnost MMP-2 također je bila snižena kod svih skupina u odnosu na kontrolne skupine, posebice u skupine miševa obrađene s NK Res ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,01$ ) i NK Res + Cis (Slika 53). Nasuprot tome koncentracija MMP-9 je bila viša i statički značajna pri hipertermalnim uvjetima kod skupine NK Res + HT i Cis + HT dok je u skupini NK Res + Cis + HT bila niža u odnosu na navedene skupine što u potonjoj skupini sugerira na brže propadanje stanica procesom apoptoze ili nekroze (Slika 54). Iako povišena reakcija MMP-9 je uglavnom negativna za tumore, ponovno treba naglasiti i njenu dvojak ulogu na rast tumora, preživljavanje, angiogenezu, apoptozu, i imunost. Točnije, raspad komponenti ECM i drugih izvanstaničnih molekula može stvoriti ulomke sa novim bioaktivnim svojstvima koji inhibiraju angiogenezu (Ribatti, 2009.). Biološki aktivan endostatin stvara se cijepanjem kolagena tipa XVIII pomoću MMP-3, -7, -9, -13 i -20 (Heljasvaara i sur., 2005.). Raspad kolagena IV $\alpha$ 3 pomoću MMP-9 rezultira stvaranjem monomerne NC1 domene zvane tumstatin, koja je potentni supresor angiogeneze. Dodatno, raspad plazminogena pomoću MMP -2, -9, -12 može stvoriti značajne količine angiostatina, raspadnog produkta sa antiangiogenom funkcijom (Cornelius i sur., 1998.). Prema tome, MMP mogu stvoriti signale koji potiču i inhibiraju angiogenezu. Ovisno o vremenskom okviru ekspresije MMP i dostupnosti supstrata utjecaj MMP na angiogenezu može biti dvojak. MMP također reguliraju krvožilnu stabilnost i permeabilnost.

Poznato je da primjena nanomedicine u liječenju tumora ima određene prednosti u odnosu na konvencionalne oblike terapije uključujući: 1. bolju dostavu i regulaciju isporuke lijeka na

točno ciljana mjesta; 2. bolju akumulaciju lijeka u samom tumoru te njegova poboljšana farmakokinetička svojstva zahvaljujući „EPR učinku“ odnosno učinku poboljšane propusnosti i zadržavanja (EPR, engl. *Enhanced Permeation And Retention*) nanočestica u tumorskom tkivu. Upravo ove značajke mogu pospješiti antiangiogeno djelovanje NK Res ali i dokinuti supresivni učinak tumorskog mikrookoliša na imunostane stanice, uz izravno povećanje citotoksičnog učinka na stanice tumora i njihov mikrookoliš vodeći poboljšanju terapijskog ishoda (Khan i sur., 2013.). Različitost krvožilja i brza proliferacija tumorskih stanica rezultira stvaranjem fenestriranog krvožilja koje je podložno ekstravazaciji makromolekula, uključujući i nanočestice dok smanjena limfatička drenaža tumorskog tkiva dovodi do produljenog zadržavanja nanočestica unutar tumorske mase te gubitak hijerarhije. Promjenjen i izvijugan tijek, nepravilan lumen i narušena normalna prekapilarna arhitektura, abnormalno i kaotično grananje, promjene u promjeru lumena, slijepi krajevi i zavojitost i heterogena gustoća krvožilja posljedično doprinose 10-50 puta većoj koncentraciji nanočestica u odnosu na zdravo tkivo (Summerlin i sur., 2015.; Bonferoni i sur., 2017.). Ovi mehanizmi zasigurno mogu pomoći u protutumorskom učinku NK Res u kombinaciji s Cis. Hipertermija dodatno može pojačati citotoksični učinak Cis na stanice tumora, potaknuti smrt stanica tumora i zajedno s NK pojačati imunostni odziv te dokinutu otpornost stanica tumora na kemoterapeutik doprinoseći povećanju životnog vijeka miševa. Nadalje djelotvornost nanokristala resveratrola kao inhibitora HDAC može utjecati na inhibiciju rasta tumora i dokidanje rezistencije tumora na kemoterapiju kroz blokadu kontrolnih imunostnih točki, aktivaciju imunostnog nadzora i povećanje osjetljivosti na kemoterapiju te druge inhibitore imunostnih kontrolnih točaka reguliranjem protutumorskog imunostnog odgovora.

## § 6. ZAKLJUČCI

1. Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) inokuliran *sc* u Balb/c miševe uspješno uzrokuje brzi rast Ehrlichovog solidnog tumora u miša. Navode temeljimo na:
  - brzoj pojavnost vidljivog tumora; desetog dana volumen tumora je  $\sim 1000 \text{ mm}^3$
  - povećanju mase tumora u miševa nositelja solidnog EAT-a,
  - narušavanje funkcije i povećanju mase unutarnjih organa (bubreg, jetre i slezene) u miševa nositelja solidnog EAT-a kao posljedice obilne lezije tumorskih stanica, toksina tumorskih i stanica imunskog sustava, visokih razina citokina, proteaza, te reaktivnih radikala.
  - povećanju volumena tumora (do 33 dana  $\sim 7700 \text{ mm}^3$ ) i kratkom periodu preživljavanja (22-38 dana) miševa nositelja solidnog EAT
  - brzom rastu tumora praćenog porastom gustoće mikrožilja (MVD) i proangiogenih čimbenika poput VEGF-a u tumoru i serumu, i matriksnih metaloproteinaza MMP2 i MMP9
  - visokoj razini HDAC i narušenoj regulaciji i kontroli rasta tumora epigenetskim čimbenicima
  - poremećajima u izražaju HSP70/90 proteina
  - povećanoj razini oksidacijskog stresa,
  - povećanju M2 tumorske aktivnosti TAMs,
  - povećanoj razni Arg-1,
  - smanjenoj aktivnosti dušikova(II) oksida (NO).
2. Resveratrol sam ima-antiangiogeni učinak što potvrđuje:
  - usporeni rast tumora i duže preživljavanje nositelja solidnog EAT tumora u miša
  - značajna inhibicija MMP2 utječe na povećanje životnog vijeka životinja
  - povećana aktivnost M1 TAM i njihove protutumorske aktivnosti te značajna inhibicija aktivnosti arginaze karakteristične za M2 fenotip TAM s prokarcinogenim značajkama
  - inhibicija arginaze resveratrolom onemogućava pro-tumorsku, proangiogenu i imunosupresivnu ulogu M2 makrofaga;

3. Prisutnost resveratrola u fiziološkim i hipertermalnim uvjetima može djelomično zaštititi stanice bubrega i jetre od cisplatinom-izazvane toksičnosti preko svojih antioksidativnih, protuupalnih i imunostimulatornih značajki vidljivih kroz:
  - Povećanje razine GSG, i CAT aktivnosti,
  - očuvanje tkiva i redukcija upale tkiva
  - povećanje adaptabilne i funkcionalne polarizacije makrofaga
  
4. Resveratrol može povećati kemosenzitivnost stanica solidnog EAT na toksični učinak cisplatine u fiziološkim a posebice u hipertermalnim uvjetima. Slijedeći navodi potvrđuju zaključak:
  - obrada miševa s Res + Cis + HT ima najbolji protutumorski učinak; značajno povećava životni vijeka miševa nositelja solidnog EAT (%ILS, 68,5%), smanjuje masu miševa i volumen tumora kroz inhibiciju angiogeneze i rasta tumora
  - ima izraziti antiangiogeni učinak; znatno smanjuje gustoću krvožilja i proangiogenih čimbenika VEGF i MMP2 i MMP9
  - modulira aktivnost HDAC i razinu HSP70 i HSP90, čime pridonosi izravnoj toksičnosti na rast stanica tumora, te posljedično produžuje život miševa.
  - vodi brzom smrti stanica apoptozom/nekrozom preko modulacije HSP70/90, dokidanja osi PD1/PD1L i jačanja imunskog odgovora kroz aktivnost makrofaga, dendritičkih stanica i stanica NK i T
  - inhibira HDAC, jača aktivnost p53 i pokretanje proapoptotičkog puta
  - značajno inhibira aktivnost arginaze utječući na HIF-NO signalizaciju, smanjujući stabilizaciju HIF-a, rast i njegov izražaj na gene koji potiču angiogenezu, apoptozu, starenje i metaboličke promjene
  
5. Hipertermija pojačava lokalni protok krvi u tumoru i povećava akumulaciju cisplatine unutar tumorskog tkiva i remodulira mikrokruženje tumora
  - obrada miševa s Cis u hipertermalnim uvjetima ima najbolji učinak u inhibiciji rasta tumora te posljedičnom povećanju životnog vijeka miševa (68%) u odnosu na kontrolu
  - indukcijom „signala opasnosti“ i oslobađanje antigena iz tumorskih stanica hipertermija pridonosi reaktivaciji i polarizacije makrofaga prema M1 fenotipu

- povećavajući njihovu tumorocidnu aktivnost promjenama u pojačanoj ekspresiji MHC i kostimulacijskih molekula
- hipertermija znatno pojačava citotoksični učinak cisplatine, preko kalretikulina i DAMP-a, povećanom razinom ROS-ai „bystender“ učinka znatno povećava apoptozu tumorskih stanica
  - znatno povećava razinu oksidacijskog stresa potičući brzu smrt stanica tumora
  - povećava izražaj i oslobađanje HSP70/90 potičući aktivaciju makrofaga i NK i T stanica
  - povećava sazrijevanje makrofaga, polarizaciju prema M1 fenotipu, njihovu tumorocidnu i antigen-predočnu aktivnost te pojačani odziv imunskih stanica
  - visoka razina iNOS i visoka razina HIF-a ključne su u NO stabilizaciji HIF-1 $\alpha$  u hipoksiji i normoksiji
6. Resveratrol u obliku nanokristala (NK Res) ima bolju dostupnost, topivost i zadržavanje u specifičnom krvožilju tumora povećavajući protutumorski i antiangiogeni učinak cisplatine pri fiziološkim uvjetima dok u hipertermalnim uvjetima može neznatno smanjiti učinkovitost cisplatine kroz slijedeće mehanizme:
- Snižena koncentracija MMP-2 ukazuje na mogući antiangiogeni učinak NK Res dok povećana razina MMP-9 vjerojatno ukazuje na nastanak angiostatina koji vodi inhibiciji čimbenika angiogeneze VEGF.
  - protutumorska aktivnost NK Res + HT u odnosu na NK Res je manja, moguće kroz povećanje ROS signalizacije izazvano hipertermalnim uvjetima te njihovu mitogenu aktivnost u poticanju proliferacijet umorskih stanica
  - NK Res pri hipertermalnim uvjetima povećava lipidnu peroksidaciju i CAT aktivnost u stanicama jetre i bubrega dok u bubregu značajno smanjuje razinu GSH
  - NK Res ima kemosenzitivnii adjuvatni učinak u kombinaciji s Cis, znatno inhibira rasta tumora i povećava životni vijek miševa za 81,66%
  - jasna poveznica između VEGF-a i MMP-2 potvrđuje snažni antiangiogeni potencijal NK Res + Cis.

- smanjene koncentracije HSP-70 i HSP-90 u skupini obrađenoj NK Res i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima pogoduju smrti tumorskih stanica i dokidanju rezistencije te jačanju imunskog odgovora efektorskih T i NK stanica.
- prooksidativni učinak NK Res + Cis u nazočnosti HT u stanicama tumora u konačnici mijenja tumorski mikrookoliš i povećava polarizaciju M1 makrofaga prema M2 TAM fenotipu povećavajući prokarcinogene značajke tumora vodeći kraćem preživljavanju mišva u odnosu na NK Res + Cis (36,85 vs. 81,66%)
- Visoka koncentracija  $O_2$  i  $H_2O_2$  može stabilizirati HIF-1 $\alpha$  oksidacijom i inhibicijom domene protil hidrosilaze 2 (PHD2) i faktora inhibicije HIF-1 (FIH) te utjecati na put angiogeneze, proliferacije i apoptoze; pretjeranom ekspresijom HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  podjedinica pojačavaju stvaranje krvnih žila, malignitet tumora, metastaziranje i otpornost na terapiju.
- mikrookolišni uvjeti tumora, posebice dostupnost kisika, utječu na redoks ravnotežu NK Res i mijenjaju njegovu kemotoksičnu aktivnost, ali i slabe aktivnosti cisplatine u hipertermalnim uvjetima.

7. Odnos ROS/RNS radikala u stabilizaciji HIF čimbenika zajedno s promjenama tumorskog mikrookoliša mogao bi biti važan čimbenik proonkogene i antionkogene prirode HIF-a i njegove signalizacije

8. Zbog heterogenosti i plastičnosti tumora kombinacija različitih oblika terapije je nužna u liječenju raka, uključujući solidni EAT gdje HDAC inhibitori igraju glavnu ulogu u regulaciji imunskog nadzora molekula kontrolnih točaka, proliferacije stanica raka i aktivacije onkogenih signalnih puteva.

10. 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, inhibicijom angiogeneze, kronične upale i imunskog tolerancije, te tako doprinosi povećanju životnog vijeka miševa. Međutim, potreban je oprez kod primjene multimodalne terapije jer uvjeti mikrookoliša tumora mogu značajno utjecati na konačni ishod terapije tumora. Mikrookolišni uvjeti mijenjaju HIF-NO signalizaciju prema onkogenoj ili antionkogenoj prirodi HIF signalnog puta.



11. Mehanizam interakcije između resveratrola, cisplatine i HT ostaje nejasan i potrebno ga je dodatno istražiti zbog moguće pro-oksidativne i antioksidativne prirode resveratrola i njegovih nanokristala u različitim mikrokolišnim uvjetima.

## § 7. LITERATURA

1. Afik R, Zigmond E, Vugman M. (2016) Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *J Exp Med.*; 213(11):2315-2331.
2. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A. (2019) Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules.* 9(11):735
3. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M. (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 203(4):1007-1019.
4. Ahluwalia A, Tarnawski AS. (2012) Critical role of hypoxia sensor--HIF-1 $\alpha$  in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem.* 19(1):90-97.
5. Ahmad A, Syed FA, Singh S, Hadi SM. (2005) Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol Lett.* 159(1):1-12.
6. Ahmed K, Zaidi SF, Mati-Ur-Rehman, Rehman R, Kondo T. (2020) Hyperthermia and protein homeostasis: Cytoprotection and cell death. *J Therm Biol.* 91:102615.
7. Ahn GO, Brown JM. (2008) Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell.* 13(3):193-205.
8. Ahn JB, Rha SY, Shin SJ (2010) Circulating endothelial progenitor cells (EPC) for tumor vasculogenesis in gastric cancer patients. *Cancer Lett.* 288(1):124-132.
9. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(8):545-555.
10. Alexandre J, Batteux F, Nicco C (2006) Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 119(1):41-48.
11. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. (2000) Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med.* 6(1):100-102.
12. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcão A (2009) Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res.* 53 Suppl 1:S7-S15.
13. Alobaedi OH, Talib WH, Basheti IA. (2017) Antitumor effect of thymoquinone combined with resveratrol on mice transplanted with breast cancer. *Asian Pac J Trop Med.* 2017;10(4):400-408.
14. Amable L. (2016) Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res.* 106:27-36.
15. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. (2012) Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?. *J Control Release.* 158(2):182-193.

16. Ančić D, Oršolić N, Odeh D, Tomašević M, Pepić I, Ramić S. (2022) Resveratrol and its nanocrystals: A promising approach for cancer therapy?. *Toxicol Appl Pharmacol.* 435:115851.
17. Annaji M, Poudel I, Boddu SHS, Arnold RD, Tiwari AK, Babu RJ. (2021) Resveratrol-loaded nanomedicines for cancer applications. *Cancer Rep (Hoboken).* 4(3):e1353.
18. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. (2007) Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(51):20262-20267.
19. Arwert EN, Harney AS, Entenberg D. (2018) A Unidirectional Transition from Migratory to Perivascular Macrophage Is Required for Tumor Cell Intravasation. *Cell Rep.* 23(5):1239-1248.
20. Asahara T, Murohara T, Sullivan A (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275(5302):964-967.
21. Assi M. (2017) The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 313(6):R646-R653.
22. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 27:669-692.
23. Auger, M.J. and Ross, J.A. (1992) The biology of the macrophage. In: Lewis, C.E. and McGee, J.O'D., Eds., *The Macrophage*, Oxford University Press, Oxford, 1-74.
24. Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Burnier J, Bikfalvi A, Brodt P. (2007) The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation. *Am J Pathol.* 170(5):1781-1792.
25. Bahadır A, Ceyhan A, Öz Gergin Ö. (2018) Protective effects of curcumin and beta-carotene on cisplatin-induced cardiotoxicity: An experimental rat model. *Anatol J Cardiol.* 19(3):213-221.
26. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. (2012) The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 125:5591-5596.
27. Bandolik JJ, Hamacher A, Schrenk C, Weishaupt R, Kassack MU. (2019) Class I-Histone Deacetylase (HDAC) inhibition is superior to pan-HDAC inhibition in modulating cisplatin potency in high grade serous ovarian cancer cell lines. *Int J Mol Sci.* 20(12):3052.
28. Bannister AJ, Kouzarides T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21(3):381-395
29. Barnes JA, Collins BW, Dix DJ, Allen JW. (2002) Effects of heat shock protein 70 (Hsp70) on arsenite-induced genotoxicity. *Environ Mol Mutagen.* 40(4):236-242.
30. Barr MP, Byrne AM, Duffy AM (2005) A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br J Cancer.* 92(2):328-333.
31. Bauer G. (2014) Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells. *Anticancer Res.* 34(4):1467-1482.
32. Baylin SB. (2002) Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Semin Cancer Biol.* 12(5):331-337.

33. Bergers G, Brekken R, McMahon G (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2(10):737-744.
34. Berretta M, Bignucolo A, Di Francia R (2020) Resveratrol in cancer patients: From bench to bedside. *Int J Mol Sci.* 21(8):2945.
35. Bettaieb A, Averill-Bates DA. (2005) Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J Cell Physiol.* 205(1):47-57.
36. Bettaieb A, Averill-Bates DA. (2008) Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signaling. *Biochem Cell Biol.* 86(6):521-538.
37. Bishayee A, Politis T, Darvesh AS. (2010) Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 36(1):43-53.
38. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? (2011) A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med.* 17(3):320-329.
39. Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim JY. (2012) Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res.* 253(1-3):11-24.
40. Biswas SK, Mantovani A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11(10):889-896.
41. Böger C, Behrens HM, Krüger S, Röcken C. (2017) The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy? *Oncoimmunology.* 26(4):e1293215.
42. Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. (2005) PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell.* 120(3):303-313.
43. Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G, Ferrari F. (2017) Nanoparticle formulations to enhance tumor targeting of poorly soluble polyphenols with potential anticancer properties. *Semin Cancer Biol.* 46:205-214.
44. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. (1997) Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today.* 18(6):267-268.
45. Bos PD, Zhang XH, Nadal C (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 459(7249):1005-1009.
46. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P (2018) NK Cells stimulate recruitment of cDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control. *Cell.* 172(5):1022-1037.
47. Bouras T, Fu M, Sauve AA, (2005) SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem.* 280(11):10264-10276.
48. Bowman RL, Klemm F, Akkari L (2016) Macrophage ontogeny underlies differences in tumor-specific education in brain malignancies. *Cell Rep.* 17(9):2445-2459.
49. Brewer TF, Garcia FJ, Onak CS, Carroll KS, Chang CJ. (2015) Chemical approaches to discovery and study of sources and targets of hydrogen peroxide redox signaling through NADPH oxidase proteins. *Annu Rev Biochem.* 84:765-790.

50. Bronte V, Zanovello P. (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 5(8):641-654.
51. Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin (2004) A cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell.* 5(4):365-374.
52. Brozovic G, Orsolic N, Rozgaj R (2010) DNA damage and repair after exposure to sevoflurane in vivo, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. *J Appl Genet.* 51(1):79-86.
53. Bruyère F, Melen-Lamalle L, Blacher S (2008) Modeling lymphangiogenesis in a three-dimensional culture system. *Nat Methods.* 5(5):431-437.
54. Buhmann C, Shayan P, Popper B, Goel A, Shakibaei M. (2016) Sirt1 is required for resveratrol-mediated chemopreventive effects in colorectal cancer cells. *Nutrients.* 8(3):145
55. Burnet FM. Oxford: Pergamon Press; 1970. Immunological surveillance.
56. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 50(11):3337-3340.
57. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. (2009) A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 9(2):108-122.
58. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. (2005) Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 9(4):777-794.
59. Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M. (2011) Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol.* 32(6):241-247.
60. Calderwood SK, Ciocca DR. (2008) Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer. *Int J Hyperthermia.* 24(1):31-39.
61. Cao Y, Xue L. (2004) Angiostatin. *Semin Thromb Hemost.* 30(1):83-93.
62. Carmeliet P, Jain RK. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 473(7347):298-307.
63. Carmeliet P. (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 69:4-10.
64. Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. (2014) Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer.* 21(3):R209-R225.
65. Casagrande F, Darbon JM. (2001) Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol.* 61(10):1205-1215.
66. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. (2018) Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol.* 9:847.
67. Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. (2013) B7 family check point regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol.* 34(11):556-563.
68. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):563-572.

69. Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ (2007) Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia. *Circulation*. 116(24):2818-2829.
70. Chatterjee N, Walker GC. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 58(5):235-263.
71. Chen J, Sivan U, Tan SL (2021) High-resolution 3D imaging uncovers organ-specific vascular control of tissue aging. *Sci Adv*. 7(6):eabd7819.
72. Chen K, Tang T, Song Q. (2019) Transcription analysis of the stress and immune response genes to temperature stress in *Ostrinia furnacalis*. *Front Physiol*. 10:1289.
73. Chen S, Li F, Xu D, Hou K, Fang W, Li Y. (2019) The Function of RAS mutation in cancer and advances in its drug research. *Curr Pharm Des*. 25(10):1105-1114.
74. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. (2005) Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell*. 123(3):437-448.
75. Chen Y, Zhang S, Wang Q, Zhang X. (2017) Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. *J Hematol Oncol*. 10(1):36.
76. Cheng W, Yang Z, Wang S (2019) Recent development of CDK inhibitors: An overview of CDK/inhibitor co-crystal structures. *Eur J Med Chem*. 164:615-639.
77. Chhabra G, Singh CK, Amiri D, Akula N, Ahmad N. (2021) Recent advancements on immunomodulatory mechanisms of resveratrol in tumor microenvironment. *Molecules*. 26(5):1343.
78. Chiba S, Ikushima H, Ueki H (2014) Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrate innate immune cells for anti-tumor responses. *Elife*. 3:e04177.
79. Chimento A, De Amicis F, Sirianni R (2019) Progress to improve oral bioavailability and beneficial effects of resveratrol. *Int J Mol Sci*. 20(6):1381.
80. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. (2009) Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol*. 61(3):223-242.
81. Choi JH, Kwon HJ, Yoon BI (2001) Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res*. 92(12):1300-1304.
82. Chopra H, Hung MK, Kwong DL, Zhang CF, Pow EHN. (2018) Insights into endothelial progenitor cells: origin, classification, potentials, and prospects. *Stem Cells Int*. 9847015.
83. Chow SE, Wang JS, Chuang SF (2010) Resveratrol-induced p53-independent apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells is correlated with the downregulation of  $\Delta$ Np63. *Cancer Gene Ther*. 17(12):872-882.
84. Ciocca DR, Calderwood SK. (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 10(2):86-103.
85. Cohen I, Poręba E, Kamieniarz K, Schneider R. (2011) Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes Cancer*. 2(6):631-647.

86. Cohen-Kaplan V, Naroditsky I, Zetser A, Ilan N, Vlodavsky I, Doweck I. (2008) Heparanase induces VEGF C and facilitates tumor lymphangiogenesis. *Int J Cancer*. 123(11):2566-2573.
87. Conteduca V, Kopf B, Burgio SL, Bianchi E, Amadori D, De Giorgi U. (2014) The emerging role of antiangiogenic therapy in ovarian cancer. *Int J Oncol*. 44(5):1417-1424.
88. Cook JA, Gius D, Wink DA, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB. (2004) Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol*. 14(3):259-266.
89. Cosse JP, Michiels C. (2008) Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem*. 8(7):790-797.
90. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudeau JL. (2010) Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res*. 54(1):7-16.
91. Cowman SJ, Koh MY. (2022) Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment. *Trends Cancer*. 8(1):28-42.
92. Cragg GM, Pezzuto JM. (2016) Natural Products as a vital Source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Med Princ Pract*. 25 Suppl 2(Suppl 2):41-59.
93. Crile G Jr. (1963) The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. *Cancer Res*. 23:372-380.
94. Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. (2002) Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta )-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem*. 277(24):21352-21360.
95. Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116(2):205-219.
96. Dasari S, Tchounwou PB. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 740:364-378.
97. Davatgaran-Taghipour Y, Masoomzadeh S, Farzaei MH (2017) Polyphenol nano formulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. *Int J Nanomedicine*. 12:2689-2702.
98. de Biasi AR, Villena-Vargas J, Adusumilli PS. (2014) Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: a review of preclinical and clinical evidence. *Clin Cancer Res*. 20(21):5384-5391.
99. De Palma M, Lewis CE. (2013) Macrophage regulation of tumor responses to anti cancer therapies. *Cancer Cell*. 23(3):277-286.
100. de Sá Junior PL, Câmara DAD, Porcacchia AS. (2017) The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:2467940.
101. De Smet L, Colin P, Ceelen W (2012) Development of a nanocrystalline Paclitaxel formulation for HIPEC treatment. *Pharm Res*. 29(9):2398-2406.
102. Decker NK, Abdelmoneim SS, Yaqoob U (2008) Hifoxide regulates tumor cell cross-talk with stromal cells in the tumor microenvironment of the liver. *Am J Pathol*. 173(4):1002-1012.

103. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y (2009) The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*. 30(6):832-844.
104. Delmas D, Hermetet F, Aires V. (2021) PD-1/PD-L1 Checkpoints and Resveratrol: A Controversial new way for a therapeutic strategy. *Cancers (Basel)*. 13(18):4509.
105. Delmas D, Rébé C, Lacour S (2003) Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 278(42):41482-41490.
106. Dembic Z. (2020) Antitumor drugs and their targets. *Molecules*. 25(23):5776.
107. Demoulin JB, Essagher A. (2014) PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 25(3):273-283.
108. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov*. 1(1):54-67.
109. DeNardo DG, Ruffell B. (2019) Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 19(6):369-382.
110. Deryugina EI, Quigley JP. (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 25(1):9-34.
111. Deryugina EI, Quigley JP. (2015) Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biol*. 44-46:94-112.
112. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. (2008) Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response *Nat Rev Cancer*. 8(6):425-437.
113. Dhar S, Kumar A, Li K, Tzivion G, Levenson AS. (2015) Resveratrol regulates PTEN/Akt pathway through inhibition of MTA1/HDAC unit of the NuRD complex in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1853(2):265-275.
114. Dmitriev OY. (2011) Mechanism of tumor resistance to cisplatin mediated by the copper transporter ATP7B. *Biochem Cell Biol*. 89(2):138-147.
115. Dörrie J, Gerauer H, Wachter Y, Zunino SJ. (2001) Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res*. 61(12):4731-4739.
116. Du R, Lu KV, Petritsch C (2008) HIF1 $\alpha$  induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*. 13(3):206-220.
117. Duarte TL, Lunec J. (2005): When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res*. 39(7):671-686.
118. Dudley AC, Griffioen AW. (2023) Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*. 26(3):313-347.
119. Duhan V, Joshi N, Nagarajan P, Upadhyay P. (2012) Protocol for long duration whole body hyperthermia in mice. *J Vis Exp*. (66):e3801.
120. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. (2002) Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 3(11):991-998.
121. Dunne M, Regenold M, Allen C. (2020) Hyperthermia can alter tumor physiology and improve chemo- and radio-therapy efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*. 163-164:98-124.



122. Easton DP, Kaneko Y, Subjeck JR. (2000) The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones*. 5(4):276-290.
123. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 29(5):258-289.
124. Egeblad M, Werb Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2(3):161-174.
125. El Sayed SM, Mahmoud AA, El Sawy SA (2013) Warburg effect increases steady-state ROS condition in cancer cells through decreasing their antioxidant capacities (anticancer effects of 3-bromopyruvate through antagonizing Warburg effect). *Med Hypotheses*. 81(5):866-870.
126. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. (1999) Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*. 4(6):915-924.
127. Ellis LM, Liu W, Fan F (2002) Synopsis of angiogenesis inhibitors in oncology. *Oncology (Williston Park)*. 16(5 Suppl 4):14-22.
128. Elshaer M, Chen Y, Wang XJ, Tang X. (2018) Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sci*. 207:340-349.
129. Escribese MM, Casas M, Corbí AL. (2012) Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization. *Immunobiology*. 217(12):1233-1240.
130. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. (2007) *Hum Mol Genet*. 16 Spec No 1:R50-R59.
131. Fang Y, Zhang C, Wu T, Wang Q, Liu J, Dai P. (2017) Transcriptome sequencing reveals key pathways and genes associated with cisplatin resistance in lung adenocarcinoma A549 Cells. *PLoS One*. 12(1):e0170609.
132. Fantin A, Vieira JM, Plein A (2013) NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis. *Blood*. 121(12):2352-2362.
133. Ferrara N, Davis-Smyth T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 18(1):4-25.
134. Fiddler RN. (1977) Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products. *J Assoc Off Anal Chem*. 60(3):594-599.
135. Fidler IJ. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 3(6):453-458.
136. Finisguerra V, DiConza G, Di Matteo M (2015) MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*. 522(7556):349-353.
137. Firestein R, Blander G, Michan S (2008) The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One*. 3(4):e2020.
138. Flanagan SW, Moseley PL, Buettner GR. (1998) Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett*. 431(2):285-286.
139. Florea AM, Büsselberg D. (2011) Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*. 3(1):1351-1371.

- 140.Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. (2004) Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 48(5-6):411-424.
- 141.Fontanella C, Ongaro E, Bolzonello S, Guardascione M, Fasola G, Aprile G. (2014) Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors. *Ann Transl Med.* 2(12):123.
- 142.Fraga MF, Esteller M. (2005) Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle.* 4(10):1377-1381.
- 143.Friedl P, Wolf K. (2008) Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res.* 68(18):7247-7249.
- 144.Friedman AD, Claypool SE, Liu R. (2013) The smart targeting of nanoparticles. *Curr Pharm Des.* 19(35):6315-6329.
- 145.Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19(1):92-105.
- 146.Fruhwrith GO, Hermetter A. (2008) Mediation of apoptosis by oxidized phospholipids. *Subcell Biochem.* 49:351-367.
- 147.Frydrychowicz M, Boruckowski M, Kolecka-Bednarczyk A, Dworacki G. (2017) The dual role of T reg in cancer. *Scand J Immunol.* 86(6):436-443.
- 148.Fu R, Ma X, Bian Z, Ma J. (2015) Digital separation of diaminobenzidine-stained tissues via an automatic color-filtering for immunohistochemical quantification. *Biomed Opt Express.* 6(2):544-558.
- 149.Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. (2003) Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem.* 278(31):28403-28409.
- 150.Fukai T, Ushio-Fukai M. (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 15(6):1583-1606.
- 151.Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. (2006) The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 6(7):521-534.
- 152.Fulda S, Debatin KM. (2004) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 4(7):569-576.
- 153.Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. (2018) Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology.* 154(2):186-195.
- 154.Fustier P, LeCorre L, Chalabi N (2003) Resveratrol increases BRCA1 and BRCA2 mRNA expression in breast tumour cell lines. *Br J Cancer.* 89(1):168-172.
- 155.Gagliano N, Moscheni C, Torri C, Magnani I, Bertelli AA, 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. *Biomed Pharmacother.* 59(7):359-364.
- 156.Galiniak S, Aebischer D, Bartusik-Aebischer D. (2019) Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim Pol.* 66(1):13-21.

157. Gálvez BG, Matías-Román S, Albar JP, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG. (2001) Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem.* 276(40):37491-37500.
158. Ganta S, Paxton JW, Baguley BC, Garg S. (2009) Formulation and pharmacokinetic evaluation of an asulacrine nanocrystalline suspension for intravenous delivery. *Int J Pharm.* 367(1-2):179-186.
159. Gao J, Ward JF, Pettaway CA (2017) VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nat Med.* 23(5):551-555.
160. Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB (2020) Bevacizumab (Avastin®) In cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev.* 86:102017.
161. Gavalas NG, Lontos M, Trachana SP (2013) Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 14(8):15885-15909.
162. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T (2016) L-Arginine modulates T Cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell.* 167(3):829-842.e13.
163. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N (2005) Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 113(11):1555-1560.
164. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 161(6):1163-1177.
165. Germano G, Lamba S, Rospo G (2017) Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature.* 552(7683):116-120.
166. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S (2005) Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 202(7):919-929.
167. Ghosh S. (2019) :Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 88:102925.
168. Giacca M, Zacchigna S. (2012) VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. *Gene Ther.* 19(6):622-629.
169. Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. (2009) Localized and reversible TGF beta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol.* 11(11):1287-1296.
170. Giatromanolaki A, Tsolou A, Daridou E, Kouroupi M, Chlichlia K, Koukourakis MI. (2020) iNOS expression by tumor-Infiltrating lymphocytes, PD-L1 and prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancers (Basel).* 12(11):3276.
171. Gigliobianco MR, Casadidio C, Censi R, Di Martino P. (2018) Nanocrystals of poorly soluble drugs: Drug bioavailability and physicochemical stability. *Pharmaceutics.* 10(3):134.
172. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(9):722-728.

173. Glasauer A, Chandel NS. (2014) Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 92(1):90-101.
174. Glick D, Barth S, Macleod KF. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 221(1):3-12.
175. Gordon S, Martinez FO. (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 32(5):593-604.
176. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 12(12):931-947.
177. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 140(6):883-899.
178. Grohmann U, Bronte V. (2010) Control of immuneresponse by amino acid metabolism. *Immunol Rev.* 236:243-264.
179. Gross J, Lapiere CM. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 48(6):1014-1022.
180. Guerriero JL. (2018) Macrophages: The road less traveled, changing anticancer therapy. *Trends Mol Med.* 24(5):472-489.
181. Guo W, Giancotti FG. (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(10):816-826.
182. Gupta GP, Massagué J. (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 127(4):679-695.
183. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC (2007) Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature.* 446(7137):765-770.
184. Hahn GM. (1979) Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res.* 39(6 Pt 2):2264-2268.
185. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. (2004) Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 59(2):177-189.
186. Hall DM, Buettner GR, Matthes RD, Gisolfi CV. (1994) Hyperthermia stimulates nitric oxide formation: electron paramagnetic resonance detection of NO-heme in blood. *J Appl Physiol* (1985). 77(2):548-553.
187. Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 5):1147-1150.
188. Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H (2003) Physiological levels of tustatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alpha V beta3 integrin. *Cancer Cell.* 3(6):589-601.
189. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-674.
190. Handy DE, Loscalzo J. (2022) The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic Biol Med.* 188:146-161.
191. Hato SV, Khong A, de Vries IJ, Lesterhuis WJ. (2014) Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clin Cancer Res.* 20(11):2831-2837.

192. He W, Kapate N, Shields CW 4th, Mitragotri S. (2020) Drug delivery to macrophages: A review of targeting drugs and drug carriers to macrophages for inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 165-166:15-40.
193. Heissig B, Hattori K, Dias S (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 109(5):625-637.
194. Hellström M, Phng LK, Gerhardt H. (2007) VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr.* 1(3):133-136.
195. Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J (2005) Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res.* 307(2):292-304.
196. Hendriks M, Ramasamy SK. (2020) Blood vessels and vascular niches in bone development and physiological remodeling. *Front Cell Dev Biol.* 8:602278.
197. Hicklin DJ, Ellis LM. (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 23(5):1011-1027.
198. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O (2002) The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 43(1):33-56.
199. Hinshaw DC, Shevde LA. (2019) The Tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res.* 79(18):4557-4566
200. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem.* 279(31):32804-32812.
201. Hoff PM, Machado KK. (2012) Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treat Rev.* 38(7):825-833.
202. Hoffmann J, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. (2001) TNF $\alpha$  and oxLDL reduce protein S-nitrosylation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 276(44):41383-41387.
203. Hollis CP, Weiss HL, Evers BM, Gemeinhart RA, Li T. (2014) In vivo investigation of hybrid Paclitaxel nanocrystals with dual fluorescent probes for cancer theranostics. *Pharm Res.* 31(6):1450-1459.
204. Hu Y, Xiang J, Su L, Tang X. (2020) The regulation of nitric oxide in tumor progression and therapy. *J Int Med Res.* 48(2):300060520905985.
205. Huang BH, Laban M, Leung CH (2005) Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21<sup>Cip1</sup>/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ.* 12(4):395-404.
206. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23):12475-12480.
207. Huang M, Lin Y, Wang C. (2022) New insights into antiangiogenic therapy resistance in cancer: Mechanisms and therapeutic aspects. *Drug Resist Updat.* 64:100849.
208. Huang Y, Song N, Ding Y (2009) Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer Res.* 69(19):7529-7537.
209. Hynes NE, Lane HA. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors *Nat Rev Cancer.* 5(5):341-354.

210. Islam AB, Richter WF, Lopez-Bigas N, Benevolenskaya EV. (2011) Selective targeting of histone methylation. *Cell Cycle*. 10(3):413-424.
211. İşlekel H, Oktay G, Terzi C, Canda AE, Füzün M, Küpelioglu A. (2007) Matrix metalloproteinase-9,-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cell Biochem Funct*. 25(4):433-441.
212. Issels RD. (2008) Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer*. 44(17):2546-2554.
213. Ito A, Saito H, Mitobe K (2009) Inhibition of heat shock protein 90 sensitizes melanoma cells to thermosensitive ferromagnetic particle-mediated hyperthermia with low Curie temperature. *Cancer Sci*. 100(3):558-564.
214. Jain RK. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 9(6):685-693.
215. Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H. (2009) VEGFR and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans*. 37(Pt 6):1233-1236.
216. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K (2010) Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol*. 12(10):943-953.
217. Jang JY, Im E, Kim ND. (2022) Mechanism of resveratrol-induced programmed cell death and new drug discovery against cancer: A Review. *Int J Mol Sci*. 23(22):13689.
218. Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M. (2018) Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 58(10):405-421.
219. Jiménez-Sánchez A, Memon D, Pourpe S (2017) Heterogeneous Tumor-Immune Microenvironments among Differentially Growing Metastases in an Ovarian Cancer Patient. *Cell*. 170(5):927-938.e20.
220. John A, Tuszynski G. (2001) The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*. 7(1):14-23.
221. Jones PA, Baylin SB. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell*. 128(4):683-692.
222. Joyce JA, Pollard JW. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 9(4):239-252.
223. Jukić S, Jukić D, Nola M, (2002) Neoplazme (novotvorine). U: Jukić S, Damjanov I, ur. *Opća patologija*, Zagreb: Medicinska naklada, 129–161.
224. Junghanns JU, Müller RH. (2008) Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. 3(3):295-309.
225. Juretić A (2000) Metastaziranje i angiogeneza. U: Šamija M I suradnici, *Onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 41–45.
226. Juretić, A. i Bašić-Koretić, M. (2017). Tumor Immunotherapy in clinical setting based on the blockade of molecular interactions of the negative feedback mechanism. *Liječnički vjesnik*, 139 (5-6):, 168-172.
227. Kai L, Samuel SK, Levenson AS. (2010) Resveratrol enhances p53 acetylation and apoptosis in prostate cancer by inhibiting MTA1/NuRD complex. *Int J Cancer*. 126(7):1538-1548.
228. Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 119(6):1420-1428.

- 229.Kamal A, Thao L, Sensintaffar J (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. 425(6956):407-410.
- 230.Kamiya T, Courtney M, Laukkanen MO. (2016) Redox-activated signal transduction pathways mediating cellular functions in inflammation, differentiation, degeneration, transformation, and death. *Oxid Med Cell Longev*. 8479718.
- 231.Kang Y, Siegel PM, Shu W (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 3(6):537-549.
- 232.Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 438(7069):820-827.
- 233.Karar J, Maity A. (2011) PI3K/AKT/mTOR Pathway in angiogenesis. *Front Mol Neurosci*. 4:51.
- 234.Kasiotis KM, Pratsinis H, Kletsas D, Haroutounian SA. (2013) Resveratrol and related stilbenes: their antiaging and antiangiogenic properties. *Food Chem Toxicol*. 61:112-120.
- 235.Kaufmann SHE. (2019) Immunology's Coming of Age *Front Immunol*. 10:684.
- 236.Keshet R, Erez A. (2018) Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Model Mech*. 11(8):dmm033332.
- 237.Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141(1):52-67.
- 238.Khan FH, Dervan E, Bhattacharyya DD, McAuliffe JD, Miranda KM, Glynn SA. (2020) The role of nitric oxide in cancer: Master regulator or not?. *Int J Mol Sci*. 21(24):9393.
- 239.Khan MA, Chen HC, Wan XX, (2013) Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: a mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells. *Mol Cells*. 35(3):219-225.
- 240.Khan O, La Thangue NB. (2012) HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol*. 90(1):85-94.
- 241.Khan S, Moinuddin, Alam R, Ali A. (2010) Oxidatively Damaged DNA: A Possible Antigenic Stimulus for Cancer Autoantibodies. *Indian J Clin Biochem*. 25(3):244-249.
- 242.Khromova NV, Kopnin PB, Stepanova EV, Agapova LS, Kopnin BP. (2009) p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett*. 276(2):143-151
- 243.Kim J, Bae JS. (2016) Tumor-Associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm*. 6058147.
- 244.Kim MS, Kwon HJ, Lee YM (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*. 7(4):437-443.
- 245.Kim YN, Choe SR, Cho KH (2017) Resveratrol suppresses breast cancer cell invasion by inactivating a RhoA/YAP signaling axis. *Exp Mol Med*. 49(2):e296.
- 246.Kiskova T, Kubatka P, Büsselberg D, Kassayova M. (2020) The plant-derived compound resveratrol in brain cancer: A Review. *Biomolecules*. 10(1):161.
- 247.Ko JH, Sethi G, Um JY (2017) The role of resveratrol in cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 18(12):2589.

- 248.Koivunen P, Kietzmann T. (2018) Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases and metabolism. *Trends Mol Med.* 24(12):1021-1035.
- 249.Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A (2020) Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res.* 40(11):6009-6015.
- 250.Kopp HG, Ramos CA, Raffi S. (2006) Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol.* 13(3):175-181.
- 251.Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. (2018) Regulatory mechanism of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci.* 109(3):560-571.
- 252.Kregel KC. (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92(5):2177-2186.
- 253.Kreso A, Dick JE. (2014) Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* 14(3):275-291.
- 254.Krishna G, Hayashi M. (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 455(1-2):155-166.
- 255.Kryczek I, Zou L, Rodriguez P (2006) B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med.* 203(4):871-881.
- 256.Kuczynski EA, Vermeulen PB, Pezzella F, Kerbel RS, Reynolds AR. (2019) Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 16(8):469-493.
- 257.Kučan D, Oršolić N, Odeh D (2023) The role of hyperthermia in potentiation of antiangiogenic effect of cisplatin and resveratrol in mice bearing solid form of Ehrlich ascites tumour. *Int J Mol Sci.* 24(13):11073.
- 258.Kudchadkar RR, Lowe MC, Khan MK, McBrien SM. (2020) Metastatic melanoma. *CA Cancer J Clin.* 70(2):78-85.
- 259.Kumar A, Dhar S, Rimando AM (2015) Epigenetic potential of resveratrol and analogs in preclinical models of prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1348(1):1-9.
- 260.Kumari S, Badana AK, G MM, G S, Malla R. (2018) Reactive Oxygen Species: A key constituent in cancer survival. *Biomark Insights.* 13:1177271918755391.
- 261.Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A (2005) Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(6):1859-1864.
- 262.Labinskyy N, Csiszar A, Veress G (2006) Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem.* 13(9):989-996.
- 263.Langcake P, Pryce RJ. (1977) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia.* 33(2):151-152.
- 264.Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML. (2005) Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 20(3):245-252.
- 265.Lee S, Son B, Park G (2018) Immunogenic effect of hyperthermia on enhancing radiotherapeutic efficacy. *Int J Mol Sci.* 19(9):2795.



- 266.Lenard A, Ellertsdottir E, Herwig L (2013) In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Dev Cell*. 25(5):492-506.
- 267.Lepock JR. (2005) How do cells respond to their thermal environment?. *Int J Hyperthermia*. 21(8):681-687.
- 268.Lewis CE, Pollard JW. (2006) Distinct role of macrophages indifferent tumor microenvironments. *Cancer Res*. 66(2):605-612.
- 269.Li C, Jiang P, Wei S, Xu X, Wang J. (2020) Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol Cancer*. 19(1):116.
- 270.Li G, Rivas P, Bedolla R (2013) Dietary resveratrol prevents development of high-grade prostatic intraepithelial neoplastic lesions: involvement of SIRT1/S6K axis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 6(1):27-39.
- 271.Li G, Tian Y, Zhu WG. (2020) The roles of histone deacetylases and their inhibitors in cancer therapy. *Front Cell Dev Biol*. 8:576946.
- 272.Li J, Lee Y, Li Y (2018) Co-inhibitory molecule B7 superfamily member 1 expressed by tumor-infiltrating myeloid cells induces dysfunction of anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity*. 48(4):773-786.e5
- 273.Li Y, Seto E. (2016) HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6(10):a026831.
- 274.Li Z, Howell SH. (2021) Heat Stress Responses and Thermotolerance in Maize. *Int J Mol Sci*. 22(2):948.
- 275.Liang D, Kong X, Sang N. (2006) Effects of histone deacetylase inhibitors on HIF-1. *Cell Cycle*. 5(21):2430-2435.
- 276.Liao Z, Tan ZW, Zhu P, Tan NS. (2019) Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. *Cell Immunol*. 343:103729.
- 277.Liebl MC, Hofmann TG. (2021) The role of p53 signaling in colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. 13(9):2125.
- 278.Lim SO, Gu JM, Kim MS (2008) Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterology*. 135(6):2128-2140.
- 279.Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS. (2006) Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev*. 26(4):397-413.
- 280.Lin HY, Tang HY, Davis FB, Davis PJ. (2011) Resveratrol and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1215:79-88.
- 281.Lin RJ, Sternsdorf T, Tini M, Evans RM. (2001) Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 20(49):7204-7215.
- 282.Lin WW, Karin M. (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 117(5):1175-1183.
- 283.Ling V. (1997) Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol*. 40 Suppl:S3-S8.
- 284.Linster CL, Van Schaftingen E. (2007) Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J*. 274(1):1-22.

- 285.Liu H, Zhang T, Li X (2008) Predictive value of MMP-7 expression for response to chemotherapy and survival in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 99(11):2185-2192.
- 286.Liu Z, Li Y, Yang R. (2012) Effects of resveratrol on vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma cells and cell proliferation. *Oncol Lett.* 4(4):837-839.
- 287.Liu Z, Peng Q, Li Y, Gao Y. (2018) Resveratrol enhances cisplatin-induced apoptosis in human hepatoma cells via glutamine metabolism inhibition. *BMB Rep.* 51(9):474-479.
- 288.Liu ZJ, Semenza GL, Zhang HF. (2015) Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 16(1):32-43.
- 289.Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(3):776-781.
- 290.Loftsson T. (2010) Aqueous solubility and true solutions. *Pharmazie.* 65(6):404-407.
- 291.Longo DL, Rosen N. (2022) Targeting oncogenic RAS protein. *N Engl J Med.* 387(2):184-186.
- 292.López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P., Sanches-Silva, A.T (2007) Study of the changes of *trans*-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Spanish white wines. *Eur Food Res Technol.* 225, 789–796.
- 293.Lord-Fontaine S, Averill DA. (1999) Enhancement of cytotoxicity of hydrogen peroxide by hyperthermia in chinese hamster ovary cells: role of antioxidant defenses. *Arch Biochem Biophys.* 363(2):283-295.
- 294.Lord-Fontaine S, Averill-Bates DA. (2002) Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radic Biol Med.* 32(8):752-765.
- 295.Lowe MM, Boothby I, Clancy S (2019) Regulatory T cells use arginase 2 to enhance their metabolic fitness in tissues. *JCI Insight.* 4(24):e129756.
- 296.Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. (2020) Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 77(9):1745-1770.
- 297.Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. (2004) Inhibition of NF-kappa B in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNF alpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell.* 6(3):297-305.
- 298.Machado ND, Fernández MA, Díaz DD. (2019) Recent strategies in resveratrol delivery systems. *Chempluschem.* 84(7):951-973.
- 299.MacKie RM, Reid R, Junor B. (2003) Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med.* 348(6):567-568.
- 300.Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. (2020) Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer.* 11(15):4474-4494.
- 301.Maguire OA, Ackerman SE, Szwed SK (2021) Creatine-mediated crosstalk between adipocytes and cancer cells regulates obesity-driven breast cancer. *Cell Metab.* 33(3):499-512.e6.
- 302.Mahyar-Roemer M, Köhler H, Roemer K. (2002) Role of Bax in resveratrol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. *BMC Cancer.* 2:27.

- 303.Malamatari M, Taylor KMG, Malamataris S, Douroumis D, Kachrimanis K. (2018) Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov Today*. 23(3):534-547.
- 304.Malik JA, Lone R. (2021) Heat shock proteins with an emphasis on HSP 60. *Mol Biol Rep*. 48(10):6959-6969.
- 305.Malladi S, Macalinao DG, Jin X (2016) Metastatic latency and immune evasion through autocrine inhibition of WNT. *Cell*. 165(1):45-60.
- 306.Mamlouk S, Wielockx B. (2013) Hypoxia-inducible factors as key regulators of tumor inflammation. *Int J Cancer*. 132(12):2721-2729.
- 307.Manicone AM, McGuire JK. (2008) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol*. 19(1):34-41.
- 308.Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 14(7):399-416.
- 309.Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 25(12):677-686.
- 310.Maretzky T, Reiss K, Ludwig A (2005) ADAM10 mediates E-cadherins hedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(26):9182-9187.
- 311.Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D (2018) TGF $\beta$  attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 554(7693):544-548.
- 312.Marie P.Clunet J. (1910) Fréquences des metastases viscérales chez les souris cancére uses aprèsablation chirurgicale de leurtumeur.*Bull Assoc Franç pour l'étude du cancer*. 3: 19-23
- 313.Marimuthu P, Razzokov J, Singaravelu K, Bogaerts A. (2020) Predicted hotspot residues involved in allosteric signal transmission in proapoptotic peptide-mcl1 complexes. *Biomolecules*. 10(8):1114.
- 314.Marina D Hendrickson & Robert O Poyton (2015) Crosstalk between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways: an update. *Res Rep Biochem*. 5: 147-161.
- 315.Marine JC, Berx G. (2009) Transforming growth factor-beta and mutant p53 conspire to induce metastasis by antagonizing p63: a (ternary) complex affair. *Breast Cancer Res*. 11(4):304.
- 316.Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. (2004) Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res*. 91:137-168.
- 317.Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. 177(10):7303-7311
- 318.Martinez M, Moon EK. (2019) CAR T cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 10:128.
- 319.Massagué J. (2008) TGF beta in Cancer. *Cell*. 134(2):215-230.

320. Mattila E, Auvinen K, Salmi M, Ivaska J. (2008) The protein tyrosine phosphatase TCPTP controls VEGFR2 signaling. *J Cell Sci.* 121(Pt 21):3570-3580.
321. Mauludin R, Müller RH, Keck CM. (2009) Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int J Pharm.* 370(1-2):202-209.
322. Mbimba T, Awale P, Bhatia D (2012) Alteration of hepatic proinflammatory cytokines is involved in the resveratrol-mediated chemoprevention of chemically-induced hepatocarcinogenesis. *Curr Pharm Biotechnol.* 13(1):229-234.
323. McAllister SS, Gifford AM, Greiner AL (2008) Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell.* 133(6):994-1005.
324. McAllister SS, Weinberg RA. (2014) The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol.* 16(8):717-727.
325. McClure JJ, Li X, Chou CJ. (2018) Advances and challenges of HDAC inhibitors in cancer therapeutics. *Adv Cancer Res.* 138:183-211.
326. McGinity CL, Palmieri EM, Somasundaram V (2021) Nitric oxide modulates metabolic processes in the tumor immune microenvironment. *Int J Mol Sci.* 22(13):7068.
327. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R (2016) Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science.* 351(6280):1463-1469.
328. McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT (2017) Allele-specific HLA loss and immune escape in lung cancer evolution. *Cell.* 171(6):1259-1271.e11.
329. McGranahan N, Swanton C. (2015) Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell.* 27(1):15-26.
330. Ménard C, Martin F, Apetoh L, Bouyer F, Ghiringhelli F. (2008) Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 57(11):1579-1587.
331. Mentzel T, Brown LF, Dvorak HF (2001) The association between tumour progression and vascularity in myxofibrosarcoma and myxoid/round cell liposarcoma. *Virchows Arch.* 438(1):13-22.
332. Miao X, Li Y, Wang X, Lee SM, Zheng Y. (2016) Transport mechanism of coumarin 6 nanocrystals with two particle sizes in MDCKII monolayer and larval zebrafish. *ACS Appl Mater Interfaces.* 8(20):12620-12630.
333. Miller JF, Grant GA, Roe FJ. (1963) Effect of thymectomy on the induction of skin tumours by 3,4-benzopyrene. *Nature.* 199:920-922.
334. Miller JF. (1961) Immunological function of the thymus. *Lancet.* 2(7205):748-749.
335. Minati R, Perreault C, Thibault P. (2020) A roadmap toward the definition of actionable tumor-specific antigens. *Front Immunol.* 11:583287.
336. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 436(7050):518-524.
337. Minucci S, Pelicci PG. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer.* 6(1):38-51.

338. Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades CS, Anderson KC. (2001) Induction of tumour cell apoptosis by matrix metalloproteinase inhibitors: new tricks from a (not so) old drug. *Expert Opin Investig Drugs*. 10(6):1075-1084.
339. Miyagawa T, Saito H, Minamiya Y (2014) Inhibition of Hsp90 and 70 sensitizes melanoma cells to hyperthermia using ferromagnetic particles with a low Curie temperature. *Int J Clin Oncol*. 19(4):722-730.
340. Mizukoshi E, Kaneko S. (2019) telomerase-targeted cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 20(8):1823.
341. Moon EJ, Sonveaux P, Porporato PE (2010) NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(47):20477-20482.
342. Moreno-Sánchez R, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández Á. (2017) Control of the NADPH supply for oxidative stress handling in cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 112:149-161.
343. Moretta A. (2005) The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 17(3):306-311.
344. Morgan MJ, Liu ZG. (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res*. 21(1):103-115.
345. Mostafalou S, Mohammadi H, Ramazani A, Abdollahi M. (2013) Different biokinetics of nanomedicines linking to their toxicity; an overview. *Daru*. 21(1):14.
346. Moynihan KD, Opel CF, Szeto GL (2016) Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. *Nat Med*. 22(12):1402-1410.
347. Muggia FM, Bonetti A, Hoeschele JD, Rozenzweig M, Howell SB. (2015) Platinum Antitumor Complexes: 50 Years Since Barnett Rosenberg's Discovery. *J Clin Oncol*. 33(35):4219-4226.
348. Müller RH, Schmidt S, Buttle I, Akkar A, Schmitt J, Brömer S. (2004) SolEmuls- novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int J Pharm*. 269(2):293-302.
349. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M (1995) A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer*. 61(2):272-279.
350. Multhoff G, Pockley AG, Streffer C, Gaipl US. (2012) Dual role of heat shock proteins (HSPs) in anti-tumor immunity. *Curr Mol Med*. 12(9):1174-1182.
351. Multhoff G. (2002) Hyperthermia classic commentary: Activation of natural killer (NK) cells by heat shock protein 70, Gabriele Multhoff, *International Journal of Hyperthermia*, 18:576-585.
352. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T (2005) Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res*. 11(13):4912-4922.
353. Murata Y, Shimamura T, Tagami T, Takatsuki F, Hamuro J. (2002) The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by

- macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Int Immunopharmacol.* 2(5):673-689.
354. Murias M, Jäger W, Handler N (2005) Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol.* 69(6):903-912.
355. Murray PJ, Wynn TA. (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 11(11):723-737.
356. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S (2007) Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by micro chip technology. *Nature.* 450(7173):1235-1239.
357. Nakahata K, Miyakoda M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. (2002) Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes non-apoptotic mitotic catastrophe in human tumour cells. *Int J Hyperthermia* 18(4):332-343.
358. Nakamura ES, Koizumi K, Kobayashi M, Saiki I. (2004) Inhibition of lymphangiogenesis-related properties of murine lymphatic endothelial cells and lymph node metastasis of lung cancer by the matrix metalloproteinase inhibitor MMI270. *Cancer Sci.* 95(1):25-31.
359. Nakamura H, Takada K. (2021) Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci.* 112(10):3945-3952.
360. Nan J, Xing YF, Hu B (2018) Endoplasmic reticulum stress induced LOX-1<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma. *Immunology.* 154(1):144-155.
361. Narita N, Fujieda S, Tokuriki M (2005) Inhibition of histone deacetylase 3 stimulates apoptosis induced by heat shock under acidic conditions in human maxillary cancer. *Oncogene.* 24(49):7346-7354.
362. Navasardyan I, Bonavida B. (2021) Regulation of T cells in cancer by nitric oxide. *Cells.* 10(10):2655.
363. Nico B, Annese T, Guidolin D, Finato N, Crivellato E, Ribatti D. (2011) Epo is involved in angiogenesis in human glioma. *J Neurooncol.* 102(1):51-58.
364. Nikounezhad N, Nakhjavani M, Shirazi FH. (2017) Cellular glutathione level does not predict ovarian cancer cells' resistance after initial or repeated exposure to cisplatin. *J Exp Ther Oncol.* 12(1):1-7.
365. Nishimoto-Sauceda D, Romero-Robles LE, Antunes-Ricardo M. (2022) Bio polymer nanoparticles: a strategy to enhance stability, bioavailability, and biological effects of phenolic compounds as functional ingredients. *J Sci Food Agric.* 102(1):41-52.
366. Nogueira V, Park Y, Chen CC, et al. (2008) Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell.* 14(6):458-470.
367. Novak K. Epigenetics changes in cancer cells. (2004) *MedGenMed.* 6(4):17
368. Nowak EC, Lines JL, Varn FS (2017) Immunoregulatory functions of VISTA. *Immunol Rev.* 276(1):66-79.
369. Noy R, Pollard JW. (2014) Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 41(1):49-61.

370. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. (2006) Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multi stage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(33):12493-12498.
371. Olefsky JM, Glass CK. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 72:219-246.
372. Opzoomer JW, Sosnowska D, Anstee JE, Spicer JF, Arnold JN. (2019) Cytotoxic chemotherapy as an immune stimulus: A molecular perspective on turning up the immunological heat on cancer. *10:1654 Front Immunol.*
373. Oršolić N, Bašić I. (2005) Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J Ethnopharmacol.* 102(1):37-45.
374. Oršolić N, Benković V, Lisičić D, Dikić D, Erhardt J, Knežević AH. (2010) Protective effects of propolis and related polyphenolic/flavonoid compounds against toxicity induced by irinotecan. *Med Oncol.* 27(4):1346-1358.
375. Oršolić N, Car N, Lisičić D (2013) Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on ehrlich ascites tumor in mice. *J Pharm Sci.* 102(12):4395-4405.
376. Oršolić N, Car N. (2014) Quercetin and hyperthermia modulate cisplatin-induced DNA damage in tumor and normal tissues in vivo. *Tumour Biol.* 35(7):6445-6454.
377. Oršolić N, Jazvinščak Jembrek M. (2022) Molecular and cellular mechanisms of propolis and its polyphenolic compounds against cancer. *Int J Mol Sci.* 23(18):10479.
378. Oršolić N, Kunštić M, Kukulj M, Gračan R, Nemrava J. (2016) Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. *Chem Biol Interact.* 256:111-124.
379. Oršolić N, Odeh D, Jembrek MJ, Knežević J, Kučan D. (2020) Interactions between cisplatin and quercetin at physiological and hyperthermic conditions on cancer cells in vitro and in vivo. *Molecules.* 25(14):3271.
380. Ostberg JR, Kaplan KC, Repasky EA. (2002) Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 18(6):552-562.
381. O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W (2012) Cancer immune editing by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J Exp Med.* 209(10):1869-1882.
382. Outzen HC, Custer RP, Eaton GJ, Prehn RT. (1975) Spontaneous and induced tumor incidence in germ free "nude" mice. *J Reticuloendothel Soc.* 17(1):1-9.
383. Ouzounova M, Puisieux A. (2017) Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer-initiating cells. *Bull Cancer.* 104(12):1068-1071.
384. Ozdağ H, Teschendorff AE, Ahmed AA (2006) Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *7:90 BMC Genomics.*
385. Padua D, Zhang XH, Wang Q (2008) TGF beta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell.* 133(1):66-77.
386. Page-McCaw A. (2008) Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Semin Cell Dev Biol.* 19(1):14-23.

387. Pallepati P, Averill-Bates D. (2010) Mild thermotolerance induced at 40 degrees C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. *Arch Biochem Biophys.* 495(2):97-111.
388. Pallepati P, Averill-Bates DA. (2011) Mild thermotolerance induced at 40°C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 50(6):667-679.
389. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. (2020) Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front Immunol.* 11:583084.
390. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. (2008) Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer.* (5):329-340.
391. Panzarini E, Mariano S, Tacconi S, Carata E, Tata AM, Dini L. (2020) Novel therapeutic delivery of nanocurcumin in central nervous system related disorders. *Nanomaterials (Basel).* 11(1):2
392. Parbin S, Kar S, Shilpi A (2014) Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *J Histochem Cytochem.* 62(1):11-33.
393. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 4(8):617-629.
394. Pasquariello R, Verdile N, Brevini TAL (2020) The role of resveratrol in mammalian reproduction. *Molecules.* 25(19):4554.
395. Patan S, Alvarez MJ, Schittny JC, Burri PH. (1992) Intussusceptive microvascular growth: a common alternative to capillary sprouting. *Arch Histol Cytol.* 55 Suppl:65-75.
396. Pelicano H, Lu W, Zhou Y (2009) Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species imbalance promote breast cancer cell motility through a CXCL14-mediated mechanism. *Cancer Res.* 69(6):2375-2383.
397. Perše M. (2021) Cisplatin mouse models: Treatment, toxicity and translatability. *Biomedicines.* 9(10):1406. Published 2021 Oct 7.
398. Pervaiz S. (2003) Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 17(14):1975-1985.
399. Peters R. (2006) Nanoscopic medicine: the next frontier. *Small.* 2(4):452-456.
400. Pietrocola F, Mariño G, Lissa D (2012) Proautophagic polyphenols reduce the acetylation of cytoplasmic proteins. *Cell Cycle.* 11(20):3851-3860.
401. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. (2016) Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 17(6):868.
402. Pizzinga M, Harvey RF, Garland GD. (2020) The cell stress response: extreme times call for post-transcriptional measures. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 11(3):e1578.
403. Poe BS, O'Neill KL. (1997) Inhibition of protein synthesis sensitizes thermotolerant cells to heat shock induced apoptosis. *Apoptosis.* 2(6):510-517.
404. Pollard JW. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 4(1):71-78.
405. Poyton RO, Castello PR, Ball KA, Woo DK, Pan N. (2009) Mitochondria and hypoxic signaling: a new view. *Ann N Y Acad Sci.* 1177:48-56.



406. Prasad DV, Richards S, Mai XM, Dong C. (2003) B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity*. 18(6):863-873.
407. Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE (2006) Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PloS Genet*. 2(3):e40.
408. Psaila B, Lyden D. (2009) The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. (4):285-293.
409. Pyo IS, Yun S, Yoon YE, Choi JW, Lee SJ. (2020) Mechanisms of Aging and the Preventive Effects of Resveratrol on Age-Related Diseases. *Molecules*. 25(20):4649.
410. Qian BZ, Li J, Zhang H (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 475(7355):222-225.
411. Qian BZ, Pollard JW. (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 141(1):39-51.
412. Qian DZ, Kachhap SK, Collis SJ (2006) Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1-alpha. *Cancer Res*. 66(17):8814-8821.
413. Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S (2006) Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res*. 12(2):634-642.
414. Qian J, Fulton D. (2013) Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol*. 4:347.
415. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. (2013) *Nat Med*. 19(11):1423-1437.
416. Garrett RH, Grisham CM, (2013) *Biochemistry*, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont
417. Raaphorst GP, Yang H, Wilkins DE, Ng CE. (1996) Cisplatin, hyperthermia and radiation treatment in human cisplatin-sensitive and resistant glioma cell lines. *Int J Hyperthermia*. 12(6):801-812.
418. Radisky DC. (2005) Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 118(Pt 19):4325-4326.
419. Ramaiah MJ, Tangutur AD, Manyam RR. (2021) Epigenetic modulation and understanding of HDAC inhibitors in cancer therapy. *Life Sci*. 277:119504.
420. Ramer R, Schmied T, Wagner C, Haustein M, Hinz B. (2018) The antiangiogenic action of cisplatin on endothelial cells is mediated through the release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Oncotarget*. 9(75):34038-34055.
421. Ratcliffe PJ. (2007) HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest*. 117(4):862-865. doi:10.1172/JCI31750
422. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. (2014) Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*. 5:532.
423. Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS. (2018) Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 58(9):1428-1447.

424. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 24(5):981-990.
425. Ray S, Lu Y, Kaufmann SH (2004) Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 279(34):35604-35615.
426. Raza MH, Siraj S, Arshad A (2017) ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 143(9):1789-1809.
427. Ren B, Kwah MX, Liu C (2021) Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Lett*. 515:63-72.
428. Rezatabar S, Karimian A, Rameshknia V (2019) RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J Cell Physiol*. 234(9):14951-14965.
429. Ribatti D, Solimando AG, Pezzella F. (2021) The anti-VEGF(R) drug discovery legacy: Improving attrition rates by breaking the vicious cycle of angiogenesis in cancer. *Cancers (Basel)*. 13(14):3433.
430. Ribatti D. (2005) The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol*. 128(3):303-309.
431. Ribatti D. (2009) Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk Res*. 33(5):638-644.
432. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells [published correction appears in *Nature*. *Nature* 20;469(7330):432]
433. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*. 40(2):253-266.
434. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A (2015) Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 348(6230):124-128.
435. Rodríguez PC, Ochoa AC. (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev*. 222:180-191.
436. Rodríguez-Prados JC, Través PG, Cuenca J (2010) Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol*. 185(1):605-614.
437. Romero GB, Keck CM, Müller RH. (2016) Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int J Pharm*. 501(1-2):236-244.
438. Roodhart JM, Langenberg MH, Witteveen E, Voest EE. (2008) The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. *Curr Clin Pharmacol*. 3(2):132-143.
439. Rotches-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Estruch R, Escribano E, Urpi-Sarda M. (2012) Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacol Res*. 66(5):375-382.

440. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V (2014) Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*. 26(5):623-637.
441. Rupp PA, Visconti RP, Czirák A, Cheresch DA, Little CD. (2008) Matrix metalloproteinase 2-integrin alpha(v)beta3 binding is required for mesenchymal cell invasive activity but not epithelial locomotion: a computational time-lapse study. *Mol Biol Cell*. 19(12):5529-5540.
442. Sahin E, Haubenwallner S, Kuttke M (2014) Macrophage PTEN regulates expression and secretion of arginase I modulating innate and adaptive immune responses *J Immunol*. 193(4):1717-1727.
443. Saito Y, Jones PA. (2006) Epigenetic activation of tumor suppressor micro RNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*. 5(19):2220-2222.
444. Sakaguchi Y, Stephens LC, Makino M (1995) Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia in rats. *Cancer Res*. 55(22):5459-5464.
445. Salimian Rizi B, Achreja A, Nagrath D. (2017) Nitric Oxide: The forgotten child of tumor metabolism. *Trends Cancer*. 3(9):659-672.
446. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. (2019) Oxidative stress indexes for diagnosis of health or disease in humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:4128152.
447. Saraswati S, Agrawal SS, Alhaider AA. (2013) Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor. *Chem Biol Interact*. 206(2):153-165.
448. Sarin N, Engel F, Rothweiler F (2018) Key players of cisplatin resistance: Towards a systems pharmacology approach. *Int J Mol Sci*. 19(3):767.
449. Sasaki T, Hiroki K, Yamashita Y. (2013) The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *Biomed Res Int*. 546318.
450. Savage ND, de Boer T, Walburg KV (2008) Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. *J Immunol*. 181(3):2220-2226.
451. Sawaji Y, Sato T, Takeuchi A, Hirata M, Ito A. (2002) Antiangiogenic action of hyperthermia by suppressing gene expression and production of tumour-derived vascular endothelial growth factor in vivo and in vitro. *Br J Cancer*. 86(10):1597-1603.
452. Schafer FQ, Buettner GR. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 30(11):1191-1212.
453. Scheau C, Badarau IA, Costache R. (2019) The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019:9423907.
454. Schiller JT, Lowy DR. (2021) An Introduction to Virus Infections and Human Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 217:1-11.
455. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 331(6024):1565-1570.

- 456.Schreiber RD. (2001) Measurement of mouse and human interferon gamma. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 6:.
- 457.Schulte M, Reiss K, Lettau M (2007) ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ*. 14(5):1040-1049.
- 458.Semenza GL. (2013) HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*. 123(9):3664-3671.
- 459.Sengottuvelan M, Deeptha K, Nalini N. (2009) Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact*. 181(2):193-201.
- 460.Shaito A, Posadino AM, Younes N (2020) Potential adverse effects of resveratrol: A literature review. *Int J Mol Sci*. 21(6):2084.
- 461.Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT (2001) IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 410(6832):1107-1111.
- 462.Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H. (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 233(9):6425-6440.
- 463.Sharifi-Rad J, Quispe C, Patra JK (2021) Paclitaxel: Application in Modern Oncology and Nanomedicine-Based Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 3687700.
- 464.Sharma RA. (2001) Aspirin against cancer *Clin Med (Lond)*. (3):247.
- 465.Sharma RN, Bhardwaj A, Behera D, Khanduja KL. (2002) Oxidative burden and antioxidant defense system in polymorphonuclear leukocytes of human lung diseases. *Indian J Biochem Biophys*. 39(2):124-129.
- 466.Sharma S, Kelly TK, Jones PA. (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 31(1):27-36.
- 467.Shegokar R, Müller RH. (2010) Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm*. 399(1-2):129-139.
- 468.Shi X, Yang J, Deng S (2022) TGF- $\beta$  signaling in the tumor metabolic micro environment and targeted therapies. *J Hematol Oncol*. 15(1):135.
- 469.Shi ZD, Pang K, Wu ZX. (2023) Tumor cell plasticity in targeted therapy-induced resistance: mechanisms and new strategies. *Signal Transduct Target Ther*. 8(1):113.
- 470.Shibuya M. (2014) VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomol Ther (Seoul)*. 22(1):1-9.
- 471.Shrihari TG. (2017) Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancermedalscience*. 11:721.
- 472.Shukla Y, Singh R. (2011) Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*. 1215:1-8.
- 473.Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. (2014) Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014(7):694-708.
- 474.Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 42(6):717-727.

475. Sigfridsson K, Skantze P, Skantze U (2017) Nanocrystal formulations of a poorly soluble drug. 2. Evaluation of nanocrystal liver uptake and distribution after intravenous administration to mice. *Int J Pharm.* 524(1-2):248-256.
476. Silva A, Yunes JA, Cardoso BA (2008) PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest.* 118(11):3762-3774.
477. Singh A, Veeriah V, Xi P (2019) Angiocrine signals regulate quiescence and therapy resistance in bone metastasis. *JCI Insight.* 4(13):e125679.
478. Singh CK, Liu X, Ahmad N. (2015) Resveratrol, in its natural combination in whole grape, for health promotion and disease management. *Ann N Y Acad Sci.* 1348(1):150-160.
479. Singh UP, Singh NP, Singh B (2010) Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappa B activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 332(3):829-839.
480. Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. (2014) Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia.* 30(7):513-523.
481. Smith LK, Boukhaled GM, Condotta SA (2018) Interleukin-10 Directly Inhibits CD8<sup>+</sup> T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity.* 48(2):299-312.e5.
482. Smith PG, Wang F, Wilkinson KN (2005) The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 105(1):308-316.
483. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. (2000) Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 192(5):755-760.
484. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL (2019) ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid Med Cell Longev.* 6175804.
485. Sobierajska K, Ciszewski WM, Sacewicz-Hofman I, Niewiarowska J. (2020) Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 1234:71-86.
486. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 92(6):735-745.
487. Soleimani A, Jalili-Nik M, Avan A, Ferns GA, Khazaei M, Hassanian SM. (2019) The role of HSP27 in the development of drug resistance of gastrointestinal malignancies: Current status and perspectives. *J Cell Physiol.* 234(6):8241-8248.
488. Song CW, Park HJ, Lee CK, Griffin R. (2005) Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia.* 21(8):761-767.

489. Song HA, Kim YS, Cho HJ (2017) Hypoxia modulates epithelial permeability via regulation of vascular endothelial growth factor in airway epithelia *Am J Respir Cell Mol Biol.* 57(5):527-535.
490. Song J, Noh JH, Lee JH (2005) Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS.* 113(4):264-268.
491. Soto-Reyes E, González-Barríos R, Cisneros-Soberanis F (2012) Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers. *BMC Cancer.* 12:40.
492. Sounni NE, Dehne K, van Kempen L (2010) Stromal regulation of vessel stability by MMP14 and TGF beta. *Dis Model Mech.* 3(5-6):317-332.
493. Souslova T, Averill-Bates DA. (2004) Multidrug-resistant hela cells overexpressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 60(5):1538-1551.
494. Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P, Shen YF. (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 562(1-3):11-15.
495. Stadtman ER, Levine RL. (2000) Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 899:191-208.
496. Stancato LF, Silverstein AM, Owens-Grillo JK, Chow YH, Jove R, Pratt WB. (1997) The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J Biol Chem.* 272(7):4013-4020.
497. Steel R, Doherty JP, Buzzard K, Clemons N, Hawkins CJ, Anderson RL. (2004) Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J Biol Chem.* 279(49):51490-51499.
498. Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II (2021) Growth factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways in colorectal cancer pathogenesis: Where are we now?. *Int J Mol Sci.* 22(19):10260.
499. Sternlicht MD, Werb Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:463-516.
500. Stout RD, Suttles J. (2004) Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 76(3):509-513.
501. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 482(1-2):21-26.
502. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. (2001) Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 97(1):192-197.
503. Sugahara T, van der Zee J, Kampinga HH (2008) Kadota Fund International Forum 2004. Application of thermal stress for the improvement of health, 15-18 June 2004, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan. Final report. *Int J Hyperthermia.* 24(2):123-140.
504. Summerlin N, Soo E, Thakur S, Qu Z, Jambhrunkar S, Popat A. (2015) Resveratrol nanoformulations: challenges and opportunities. *Int J Pharm.* 479(2):282-290.
505. Sun B, Yeo Y. Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 16(6):295-301.

- 506.Sun Y, Zhou QM, Lu YY (2019) Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecules*. 24(6):1131.
- 507.Swanton C. (2013) Plasma-derived tumor DNA analysis at whole-genome resolution. *Clin Chem*. 59(1):6-8.
- 508.Szadvari I, Krizanova O, Babula P. (2016) Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res*. 65(Suppl 4):S441-S453.
- 509.Taguchi A, Koga K, Kawana K (2016) Resveratrol enhances apoptosis in endometriotic stromal cells. *Am J Reprod Immunol*. 75(4):486-492.
- 510.Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. (2013) Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 10(9):519-530.
- 511.Takashina M, Inoue S, Tomihara K (2017) Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. *Int J Oncol*. 50(3):787-797.
- 512.Tammela T, Zarkada G, Wallgard E (2008) Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 454(7204):656-660.
- 513.Tanaka A, Sakaguchi S. (2017) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*. 27(1):109-118.
- 514.Taneja S, Vetter SW, Leclerc E. (2021) Hypoxia and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling in cancer. *Int J Mol Sci*. 22(15):8153.
- 515.Teleanu RI, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu DM. (2019) Tumor angiogenesis and antiangiogenic strategies for cancer treatment. *J Clin Med*. 9(1):84.
- 516.Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. (2015) Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 75(11):2139-2145.
- 517.Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139(5):871-890.
- 518.Thomas L. (1959) Discussion of cellular and humoral aspects of hypersensitive states. In: Lawrence HS, editor. New York, Hoeber-Harper
- 519.Tobar N, Villar V, Santibanez JF. (2010) ROS-NF $\kappa$ B mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem*. 340(1-2):195-202.
- 520.Tonks NK. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(11):833-846.
- 521.Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett*. 358(1):1-3.
- 522.Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. (2009) Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf*. 32(12):1109-1122.
- 523.Uetaki M, Tabata S, Nakasuka F, Soga T, Tomita M. (2015) Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Sci Rep*. 13896.
- 524.Ulusu NN, Tandoğan B. (2007) Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem*. 303(1-2):45-51.
- 525.Ushio-Fukai M, Alexander RW. (2004) Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem*. 264(1-2):85-97.

526. Valastyan S, Weinberg RA. (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 147(2):275-292.
527. Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(1):44-84.
528. van der Zee J. (2002) Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol*. 13(8):1173-1184.
529. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI (2006) Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation *Cell Metab*. 4(1):13-24.
530. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 107(2):149-159.
531. Venturelli S, Berger A, Böcker A (2013) Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells [published correction appears in *PLoS One*. *PLoS One*. 8(8):e73097.
532. Verdura S, Cuyàs E, Cortada E (2020) Resveratrol targets PD-L1 glycosylation and dimerization to enhance antitumor T-cell immunity. *Aging (Albany NY)*. 12(1):8-34.
533. Verneau J, Sautés-Fridman C, Sun CM. (2020) Dendritic cells in the tumor microenvironment: prognostic and theranostic impact. *Semin Immunol*. 48:101410.
534. Vesely MD, Schreiber RD. (2013) Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1284(1):1-5.
535. Viallard i Larrivé B. (2017) Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 20(4):409-426.
536. Villar-Garea A, Esteller M. (2004) Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer*. 112(2):171-178.
537. Visconti R, Grieco D. (2009) New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 12(2):240-245.
538. Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. (2019) Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment. *Cell Metab*. 30(1):36-50.
539. Wajant H. (2009) The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ*. 49:1-15.
540. Walle T. (2011) Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 1215:9-15.
541. Wang C, Chen L, Hou X (2006) Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol*. 8(9):1025-1031
542. Wang J, Li J, Cao N, Li Z, Han J, Li L. (2018) Resveratrol, an activator of SIRT1, induces protective autophagy in non-small-cell lung cancer via inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK. *Onco Targets Ther*. 11:7777-7786.
543. Wang K, Chen Z, Shi J (2020) Resveratrol inhibits the tumor migration and invasion by upregulating TET1 and reducing TIMP2/3 methylation in prostate carcinoma cells. *Prostate*. 80(12):977-985.
544. Wang N, Liang H, Zen K. (2014) Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol*. 5:614.
545. Wang X, Khalil RA. (2018) Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease. *Adv Pharmacol*. 81:241-330.



546. Wang Y, Qi H, Liu Y (2021) The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*. 11(10):4839-4857.
547. Weidemann, A., Johnson, R. (2008) Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ* 15, 621-627
548. Weis S, Cui J, Barnes L, Chersesh D. (2004) Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol*. 167(2):223-229.
549. Weng CJ, Wu CF, Huang HW, Wu CH, Ho CT, Yen GC. (2010) Evaluation of anti-invasion effect of resveratrol and related methoxy analogues on human hepatocarcinoma cells. *J Agric Food Chem*. 58(5):2886-2894.
550. Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J. (2009) Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Toxicol*. 47(9):2170-2182.
551. Wilson AJ, Byun DS, Popova N (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem*. 281(19):13548-13558.
552. Witters L, Scherle P, Friedman S (2008) Synergistic inhibition with a dual epidermal growth factor receptor/HER-2/neu tyrosine kinase inhibitor and a disintegrin and metalloprotease inhibitor. *Cancer Res*. 68(17):7083-7089.
553. Wong E, Wei CL. (2011) Genome-wide distribution of DNA methylation at single-nucleotide resolution. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 101:459-477.
554. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, Leong CO, Ngai SC. (2018) E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 121:11-22.
555. Woodcock CL, Ghosh RP. (2010) Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(5):a000596.
556. Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. (2005) The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway *J Pharmacol Exp Ther*. 312(2):424-431.
557. Wyckoff J, Wang W, Lin EY (2004) A paracrine loop between tumor cells and macrophage is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*. 64(19):7022-7029
558. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY (2007) Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res*. 67(6):2649-2656.
559. X, Khalil RA. (2018) Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol*. 2018;81:241-330.
560. Xiao Y, Yu D. (2021) Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*. 221:107753.
561. 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. *Oncol Lett*. 2016;11(1):484-490.
562. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. (2015) Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res*. 9(6):XE01-XE05.

563. Yang MD, Sun Y, Zhou WJ (2021) Resveratrol enhances inhibition effects of cisplatin on cell migration and invasion and tumor growth in breast cancer MDA-MB-231 Cell Models In Vivo and In Vitro. *Molecules*. 26(8):2204.
564. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W (2016) Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol*. 231(12):2570-2581.
565. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. (2007) Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci*. 334(2):115-124. doi:10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e
566. Yasui W, Oue N, Ono S, Mitani Y, Ito R, Nakayama H. (2003) Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 983:220-231.
567. Yeh CH, Kaplinsky NJ, Hu C, Chang YY. (2012) Some like it hot, some like it warm: phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Sci*. 195:10-23.
568. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 23(12):2369-2380.
569. Ying H, Zhang X, Duan Y (2021) Non-cytomembrane PD-L1: An atypical target for cancer. *Pharmacol Res*. 170:105741.
570. Yu H, Pan C, Zhao S, Wang Z, Zhang H, Wu W. (2008) Resveratrol inhibits tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Pharmacother*. 62(6):366-372.
571. Yuan Y, Xue X, Guo RB, Sun XL, Hu G. (2012) Resveratrol enhances the antitumor effects of temozolomide in glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR signaling pathway. *CNS Neurosci Ther*. 18(7):536-546.
572. Yuguchi T, Saito M, Yokoyama Y (2002) Combined use of hyperthermia and irradiation cause antiproliferative activity and cell death to human esophageal cell carcinoma cells--mainly cell cycle examination. *Hum Cell*. 15(1):33-42.
573. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB (2005) Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*. 65(8):3044-3048.
574. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 33(3):337-349.
575. Zentner GE, Henikoff S. (2013) Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*. 20(3):259-266.
576. Zhang B, Liu Z, Hu X. (2013) Inhibiting cancer metastasis via targeting NADPH oxidase 4. *Biochem Pharmacol*. 86(2):253-266.
577. Zhang J, Zhong Q. (2014) Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cell Mol Life Sci*. 71(20):3885-3901.
578. Zhang LX, Li CX, Kakar MU (2021) Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother*. 143:112164.
579. Zhang M, Zhang L, Hei R (2021) CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *Am J Cancer Res*. 11(5):1913-1935.
580. Zhang Q, Tang X, Lu QY, Zhang ZF, Brown J, Le AD. (2005) Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF

- expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther.* 4(10):1465-1474.
581. Zhang X, Chen LX, Ouyang L, Cheng Y, Liu B. (2012) Plant natural compounds: targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. *Cell Prolif.* 45(5):466-476.
582. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. (2009) Mechanoenzymatic cleavage of the ultra large vascular protein von Willebrand factor. *Science.* 324(5932):1330-1334.
583. Zhang Z, Jing J, Ye Y (2020) Characterization of the dual functional effects of heat shock proteins (HSPs) in cancer hallmarks to aid development of HSP inhibitors. *Genome Med.* 12(1):101.
584. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T (2005) Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 94(1):11-16.
585. Zhao H, Zhang R, Yan X, Fan K. (2021) Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. *J Mater Chem B.* 9(35):6939-6957.
586. Zheng H, Weaver JM, Feng C. (2021) Heat shock protein 90 $\alpha$  increases superoxide generation from neuronal nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem.* 214:111298.
587. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK (2017) Tissue-resident macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma originate from embryonic hematopoiesis and promote tumor progression immunity. *47(2):323-338.e6.*
588. Zhuang Y, Wu H, Wang X, He J, He S, Yin Y. (2019) Resveratrol attenuates oxidative stress-induced intestinal barrier injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 7591840.
589. Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. (2010) Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology.* 151(2):458-465.
590. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 94(3):909-950.
591. Zuazo-Gaztelu I, Casanovas O. (2018) Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Front Oncol.* 8:248.

## § 8. ŽIVOTOPIS

Darko Kučan, dr.med rođen je u Zagrebu 1983. godine. U Zagrebu je završio osnovnu školu i Opću II. gimnaziju u Križanićevoj. 2001. upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija 2004. klinička praksa na Odjelu za transplantacijsku kirurgiju u Sveučilišnoj bolnici, Karolinska, Stockholm. 2005. klinička praksa na Odjelu za transplantacijsku kirurgiju LKH, Graz. 2006. studijski boravak na Chung Gung Sveučilištu, Taoyuan, Tajvan u Gliko – imunokemijskom laboratoriju na projektu "Molecular Immunology of Complex Carbohydrates / Lectins as Recognition Molecules". Diplomirao je 2007. godine. Iste godine započeo je staž na KB Merkur.

2008. započeo je specijalizaciju iz Opće kirurgije na KB Merkur. 2013. položio je specijalistički ispit. 2014. započinje subspecijalizaciju iz Digestivne kirurgije. Tijekom specijalizacije i subspecijalizacije sudjeluje na brojnim domaćim i stranim stručnim skupovima kao aktivni sudionik. 2017. položio je subspecijalistički ispit iz Digestivne kirurgije.

Zaposlen je kao abdominalni kirurg na Zavodu za abdominalnu kirurgiju KB Merkur. Član je eksplantacijsko – transplantacijskog tima. Poseban interes pokazuje za onkološku kirurgiju probavnog sustava. Sudjeluje u nastavi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kao nastavnik predmeta "Temelji liječničkog umijeća". Autor je ili koautor više radova indeksiranih u Curent Contents bazi podataka.

Oženjen je i otac tri kćeri.