

# Utjecaj statina na stanične linije karcinoma prostate čovjeka u 2D i 3D uvjetima rasta in vitro

---

Uhrl, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:059309>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Klara Uhlr

**Utjecaj statina na stanične linije karcinoma  
prostata čovjeka u 2D i 3D uvjetima rasta *in  
vitro***

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Klara Uhrl

**Effect of statins on human prostate cancer  
cell lines in 2D and 3D growth conditions *in  
vitro***

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Maje Sabol te komentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

# Zahvale

---

*Prije svega hvala mentorici doc. Maji Sabol na vjeri, strpljenju te pomoći od prvog dana. Zaista možete biti uzor svim studentima kada pomisle da ne postoji plan B i da se pokus ne može spasiti.*

*Vi ste pokazali što znači biti dobar učitelj te nesebično podijeliti svo svoje znanje sa svojim diplomandicama. Također Vam hvala na iskustvu i znanju koje sam stekla obavljajući stručnu praksu u Vašem labosu.*

*Veliko hvala Dori R., i Josipi Č. na bezgraničnoj pomoći, suradnji i pruženim savjetima. Vi ste mi pokazale što znači voljeti znanost te bile poticaj na ovom putu!*

*Hvala mojoj lab partnerici Ivoni K. na društvu te uveseljavanju svih onih dugih dana provedenih u labosu.*

*Hvala komentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na suradnji i pomoći prilikom izrade rada.*

*Hvala mojoj obitelji na vjeri, podršci i ohrabrivanju tijekom svih mojih „školskih“ dana. Bez vas bi ova priča ostala nedovršena!*

*Hvala Martini J. što je neumorno slušala sva moja dramtiziranja tijekom svih 5 godina, dijelila savjete te bila podrška kada je bilo najteže. Hvala Martini K. Mateji M. Sari. B., Jeleni P. te Marii B. na prijateljstvu i druženjima.*

*Hvala prof. dr. sc. Maji Čemažar, mag. pharm. inv. Ivi Šantek i ostaloj ekipi iz OI što su me ugostili u svom laboratoriju u Ljubljani. Hvala Vam na pruženom znanju i iskustvu koje sam stekla obavljajući praksu u vašem labosu.*

*„It took cancer to realize that being self-centered is not the way to live. The answer is to try and help others.“*

*~ Terry Fox*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj statina na stanične linije karcinoma prostate čovjeka u 2D i 3D uvjetima  
rasta *in vitro*

Klara Uhl

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Statini su inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaze (HMGCR) koji blokirajući aktivnost ovog enzima smanjuju razinu kolesterola u stanicama. S obzirom na svoj reducirajući učinak na kolesterol, statini se uglavnom koriste za liječenje kardiovaskularnih bolesti. Usprkos svojoj širokoj primjeni u liječenju bolesti krvožilnog sustava, brojna pretklinička istraživanja dokazala su antineoplastični učinak statina na neke vrste tumora poput kolorektalnog karcinoma ili karcinoma prostate (PCa). U ovom radu ispitivali smo učinak simvastatina i lovastatina na stanice karcinoma prostate (LNCaP i PC3) te fibroblasta prostate (WPMY-1) u dvodimenzionalnim i trodimenzionalnim uvjetima rasta. Tri stanične linije pokazuju različitu osjetljivost na statine, pri čemu su LNCaP stanice najotpornije u oba uvjeta rasta. Oba statina smanjuju ekspresiju *AR* (gen za androgeni receptor), *PSA* (antigen specifičan za prostatu) i *KLK2* (kalikrein 2) gena u 2D i 3D staničnim kulturama. Stanice uzgojene u trodimenzionalnim uvjetima pokazuju slabiji ili čak suprotan odgovor na tretmane što ukazuje na rezistenciju na ove spojeve.

Ključne riječi: karcinom prostate, kolesterol, androgeni receptor, statini  
( 52 stranica, 24 slike, 5 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Maja Sabol  
Komentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:  
prof. dr. sc. Nada Oršolić  
prof. dr. sc. Inga Urlić  
prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 5 prosinca 2024.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

## Effect of statins on human prostate cancer cell lines in 2D and 3D growth conditions *in vitro*

Klara Uhl

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Statins are inhibitors of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) which, by blocking the activity of this enzyme, reduce the level of cholesterol in the cells. Due to their cholesterol-lowering effect, statins are mainly used to treat cardiovascular diseases. Despite their wide application in treatment of vascular diseases, numerous preclinical studies found antineoplastic effect of statins on different tumors such as colon or prostate cancer. In this work, we investigated the effect of simvastatin and lovastatin on the prostate cancer cells (LNCaP and PC3) and prostate fibroblasts (WPMY-1) in two dimensional and three dimensional growth conditions. The three cell lines show different sensitivity to statins, with LNCaP cells being the most resistant in both growth conditions. Both statins downregulate the expression of androgen receptor gene (*AR*), prostate specific antigen (*PSA*) and kallikrein related peptidase 2 (*KLK2*) in two dimensional and three dimensional cell cultures. Cells grown in three dimensional conditions show weaker or even opposite response to treatments indicating the resistance to these compounds.

Keywords: prostate cancer, cholesterol, androgen receptor, statins  
(52 pages, 24 figures, 5 tables, 56 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: dr. sc. Maja Sabol  
Co-mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Reviewers:  
prof. dr. Nada Oršolić  
prof. dr. Inga Urlić  
prof. dr. Maja Matulić

Thesis accepted: 5<sup>th</sup> December 2024.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Karcinom prostate .....	1
1.2. Metabolizam normalnih i tumorskih stanica prostate.....	2
1.3. Metabolizam kolesterola .....	3
1.3.1. Unos i sinteza kolesterola .....	3
1.3.2. Regulacija homeostaze kolesterola na transkripcijskoj razini .....	6
1.3.3. Uloga kolesterola u razvoju karcinoma prostate .....	8
1.4.1. Struktura i funkcija androgenog receptora .....	9
1.4.2. Regulacija transkripcijske aktivnosti androgenog receptora .....	10
1.4.3. Interakcija kolesterola sa signalnim putem androgenog receptora.....	12
1.5. Statini kao potencijalna terapija za rak prostate .....	13
1.6. Primjena dvodimenzionalnih (2D) i trodimenzionalnih (3D) staničnih kultura u istraživanju PCa .....	16
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>18</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>19</b>
3.1. Materijali .....	19
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Rad s 2D staničnim kulturama .....	19
3.2.2. Rad s 3D staničnom kulturom .....	23
3.2.3. Fluorescentno bojanje stanica.....	25
3.2.4. Izolacija RNA.....	26
3.2.5. Reverzna transkripcija .....	27
3.2.6. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR) .....	28
3.2.7. Statistička obrada podataka .....	30
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>31</b>
4.1. Test MTT.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2. Analiza vijabilnosti sferoida.....	33
4.3. Analiza ekspresije ciljnih gena.....	37
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>46</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>47</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>53</b>



## **POPIS KRATICA**

**ABCA1** – kazetni prijenosnik A1 koji veže ATP

**ABCG** – kazetni prijenosnik G koji veže ATP

**AR** – androgeni receptor

**ARE** – elementi odgovora na androgene (engl. *androgen response element*)

**Coa** – acetil koenzim A

**DBD** – domena koja veže DNA

**DHT** – dihidrotestosteron

**DMEM** – Dulbeccov modificirani Eagle medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

**DMEM/Ham's F-12** – DMEM i Hamova hranjiva smjesa F-12

**DMSO** – dimetil- sulfoksid

**EGFR** – receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

**ER** – endoplazmatski retikulum

**HDL** – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*)

**HMG-CoA** - 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A

**HMGCR** - 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaza

**HSP** – proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*)

**INSIG1** – gen induciran inzulinom (engl. *insulin induced gene 1*)

**KLK2** – kalikrein 2

**LBD** – domena koja veže ligand

**LDL** – lipoprotein niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*)

**LDLR** – receptor za LDL

**LH** – luteinizirajući hormon

**LXR** – jetreni X receptor (engl. *liver X receptor*)

**NTD** – amino-terminalna domena

**PCa** – karcinom prostate (engl. *prostate cancer*)

**PSA** – antigen specifičan za prostatu (engl. *prostate specific antigen*)

**RPMI** - *Roswell Park Memorium Institute 1640*

**SCAP** – protein koji cijepanjem aktivira SREBP (engl. *SREBP cleavage activating protein*)

**SM** – skvalen monooksigenaza

**SRE** – sekvenca elementa odgovora na sterole (engl. *sterol response element sequence*)

**SREBP2** – protein koji se veže na regulacijski element odgovora na sterole (engl. *sterol regulatory element- binding protein 2*)

# 1. UVOD

## 1.1. Karcinom prostate

Rak prostate (PCa) drugi je najčešće dijagnosticirani rak u muškaraca te osmi vodeći uzrok smrti u svijetu s više od 1,4 milijuna novih slučajeva (Bray i sur., 2024). Do 2030. godine očekuje se porast tereta bolesti na 499 000 smrtnih slučajeva te više od 1,7 milijuna novooboljelih (Cao i sur., 2023). Isti trend obilježio je i Hrvatsku te je tako u 2021. godini PCa bio jedno od najčešćih sijela raka u muškaraca s više od 2000 novooboljelih (HZJZ, 2024). Pojavnost i smrtnost razlikuju se po regijama te se tako u istočnim zemljama može vidjeti porast smrtnosti, ali smanjenje incidencije, dok je u zapadnim zemljama suprotno (Cao i sur., 2023). Razlog razlikama u pojavnosti su nedostatak dijagnostičkih testiranja i organospecifičnih biljega probira, uključujući antigen specifičan za prostatu (PSA engl. *prostate specific antigen*) u slabije razvijenim zemljama, dok na varijacije u smrtnosti utječu genetički i okolišni faktori (McHugh i sur., 2022).

Jedini utvrđeni faktori rizika za razvoj PCa jesu dob, etnička pripadnost i obiteljska anamneza. Analizom krivulja pojavnosti prema dobi utvrđeno je kako rizik počinje naglo rasti nakon 55. godine života te svoj vrhunac dosiže oko 74. godine, nakon čega lagano opada (Gann, 2002). Iako još nije dokazano kako spriječiti rak prostate, neka istraživanja su pokazala da smanjeni unos masne hrane te povećana konzumacija voća i povrća uvelike može umanjiti rizik (Rawla i sur., 2019).

Određivanje koncentracije PSA u perifernoj krvi temeljni je način dijagnostike PCa te jedan od najčešćih testova probira za rak. Protein PSA stvaraju normalne i tumorske stanice prostate, a nalazi se uglavnom u krvi i sjemenoj tekućini. Razina PSA mjeri se u nanogramima/mililitru (ng/mL), a rizik od obolijevanja povećava se zajedno sa razinama PSA. Većina zdravih muškaraca ima razinu PSA nižu od granične vrijednosti (4 ng/mL), dok razine iznad 4 upućuju na PCa (ACS, 2023). Međutim, budući da na povećane vrijednosti PSA mogu utjecati i drugi čimbenici (dob, infekcije te neki lijekovi), biopsija tkiva postaje sve učestaliji način dijagnostike (Rawla, 2019; ACS, 2023). Postoje različiti načini liječenja PCa. Aktivno praćenje napredovanja bolesti temeljni je pristup za bolesnike s manje agresivnim PCa te one kojima je razina PSA manja od 10 ng/mL. Prostatektomija i radioterapija najučestaliji su načini liječenja lokalizirane bolesti unatoč brojnim štetnim učincima koji uvelike mogu narušiti kvalitetu života bolesnika. Kod metastatske bolesti, kemoterapija i

terapija lišavanja androgena (ADT, eng. *androgen deprivation therapy*) povećavaju preživljenje umanjujući tako stopu smrtnosti od PCa (Litwin i Tan, 2017).

Prethodno navedene terapije olakšale su život oboljelih od PCa te povećale stopu preživljavanja pacijenata s lošom prognozom. Unatoč tome, postoje brojne poteškoće s kojima se kliničari susreću prilikom pripisivanja terapije. Stjecanje otpornosti na terapiju usmjerenu protiv receptora androgena (AR, engl. *androgen receptor*) uvelike otežava liječenje metastatskog stadija bolesti. Razumijevanje mehanizama koji dovode do otpornosti uvelike će olakšati razvoj novih lijekova protiv PCa te tako unaprijediti liječenje oboljelih. (Fujita i Nonomura, 2019).

## 1.2. Metabolizam normalnih i tumorskih stanica prostate

Prostata igra bitnu ulogu u muškom reproduktivnom sustavu te je važan dio muškog spolnog aparata. Njezina glavna uloga je proizvodnja blago kiselog sekreta koji se većim dijelom sastoji od citrata, cinka, kolesterola i fosfolipida, dok proteolitički enzimi poput PSA čine manje od 1% sekreta. Zahvaljujući svojoj blagoj kiselosti, prostatna tekućina podupire spermije štiteći ih istovremeno od ženskog imunološkog sustava i vaginalnih sekreta. Osim toga, epitelne stanice prostate prehranjuju spermije svojim metaboličkim produktima omogućujući im tako normalno funkcioniranje (Beier i sur., 2022).

Zdrave epitelne stanice prostate za proizvodnju ATP-a (adenozim trifosfata) koriste glikolizu dok se acetyl-CoA (acetyl-koenzim A) generiran iz glukoze najvećim dijelom koristi za sintezu citrata. Stanice prostate ne oksidiraju proizvedeni citrat već ga akumuliraju što se postiže nakupljanjem visokih koncentracija cinkovih iona. Ioni cinka inhibiraju m-akonitazu, enzim zaslužan za konverziju citrata te tako zaustavljaju Krebsov ciklus. Osim smanjene glikolitičke aktivnosti i oksidativne fosforilacije, epitel prostate ima povećanu proizvodnju kolesterola u usporedbi sa ostalim stanicama i tkivima u organizmu (Škara i sur., 2021).

Kako bi mogle proliferirati i rasti, tumorske stanice trebaju veću količinu hranjivih tvari što rezultira promjenama u metabolizmu. Tijekom maligne transformacije, stanice prostate stječu sposobnost oksidacije citrata što rezultira njegovim smanjenjem u sjemenoj tekućini. Ova promjena u metabolizmu nastaje uslijed ponovne aktivacije m-akonitaze koja će inicirati oksidaciju citrata putem Krebsovog ciklusa (Škara i sur., 2021; Beier i sur., 2022). Za razliku od ostalih

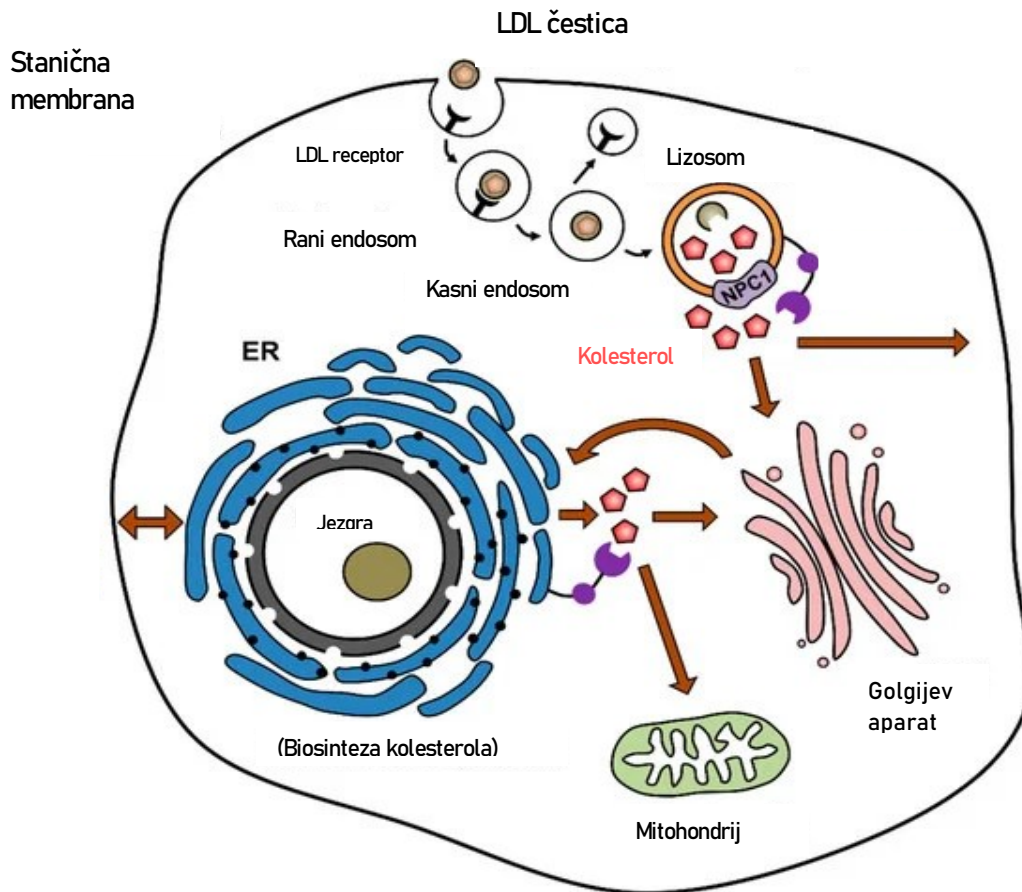
solidnih tumora, PCa energiju većinom dobiva iz lipida, a ne aerobne glikolize. Budući da je unos glukoze u ranim fazama razvoja PCa ograničen, on neće pokazivati Warburgov učinak (Eidelman i sur., 2017). U kasnijim stadijima PCa ima visok unos glukoze uz istovremeno povećanu sintezu masnih kiselina (Škara i sur., 2021).

### 1.3. Metabolizam kolesterola

#### 1.3.1. Unos i sinteza kolesterola

Kolesterol je najraširenija steroidna molekula u organizmu koja čini jednu trećinu sastava plazma membrane te je ključna za održavanje njezine cjelovitosti i fluidnosti (Zhang i sur., 2023). Amfipatske i gotovo planarne molekule kolesterola neophodne su za strukturnu modulaciju membranskih proteina i formiranje lipidnih splavi (Paukner i sur., 2022). Lipidne splavi su domene unutar stanične membrane koje su iznimno bogate kolesterolom i igraju ključnu ulogu u provođenju staničnih signala posredovanim receptorima. Ovi dijelovi membrane sadrže regulatore staničnog rasta, adhezije, migracije i apoptoze poput receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*), protein kinaze C, caveolina, flotilina i drugih. Kolesterol je bitan u održavanju staničnog ciklusa te je prekursor mnogih važnih molekula poput steroidnih hormona, oksisterola, žučnih kiselina i vitamina D (Škara i sur., 2021). Osim toga, kolesterol ima važnu ulogu u metabolizmu mnogih vrsta karcinoma, a sudjeluje i u aktivaciji nekih onkogenih signalnih puteva (Škara i sur., 2021; Zhang i sur., 2023).

Kolesterol u stanicu može biti unesen izravno kao lipoprotein ili se može sintetizirati mevalonatnim putem *de novo* (Škara i sur., 2021). Dnevno se u stanicama sintetizira približno 700-900 mg kolesterola, dok je samo 300-500 mg uneseno prehranom (Shi i sur., 2022). Egzogeni kolesterol se u stanice transportira u obliku lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *low density lipoprotein*) ili lipoproteina visoke gustoće (HDL, engl. *high density lipoprotein*) (Zhang i sur., 2023). Nakon vezanja čestice LDL za receptor LDL (LDLR), nastali kompleks receptor-ligand ulazi u stanice procesom endocitoze. Zakiseljavanjem endosoma, receptor se odvaja od liganda te se ponovno ugrađuje u plazma membranu. Čestica LDL ostaje u endosomu gdje se hidrolizira u kolesteril ester i naposljetku oslobađa kao kolesterol (Slika 1). Višak nastalog kolesterola, veže se za čestice HDL te se kao takav isporučuje u jetru gdje se reciklira, izlučuje ili koristi za sintezu steroidnih hormona (Škara i sur., 2021).

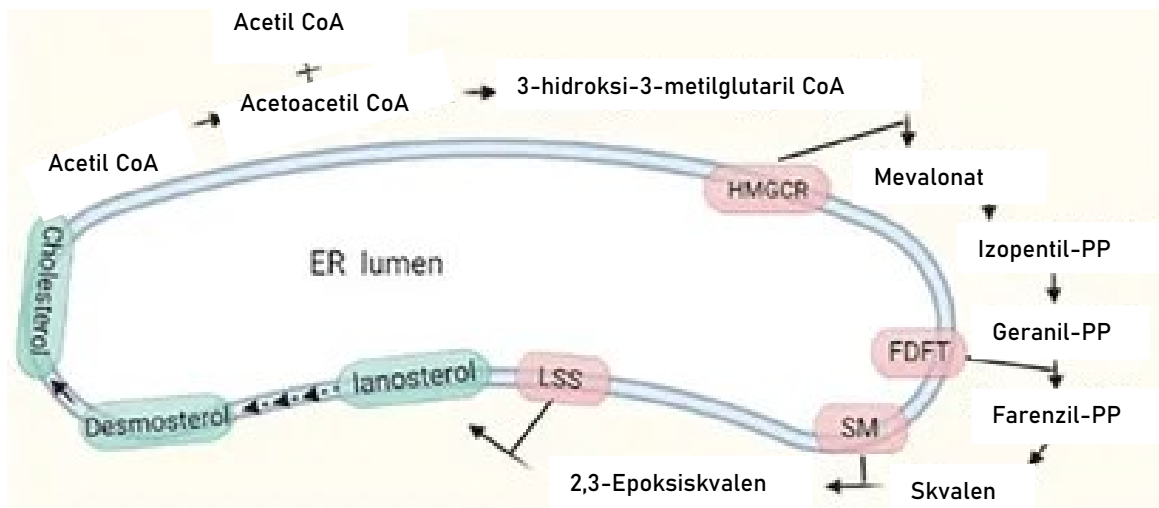


**Slika 1:** Prikaz unutarstaničnog prijenosa kolesterola (Preuzeto i prilagođeno prema Lyu i sur., 2019).

Lipoprotein niske gustoće (LDL) veže se za receptor LDL (LDLR) na staničnoj membrani te endocitozom ulazi u stanicu. Kasni endosom spaja se sa lizosomom, LDL hidrolizira u kolesteril ester koji se naposljetku oslobađa kao kolesterol. Oslobođeni kolesterol prenosi se do plazma membrane ili staničnih organela. Prijenos kolesterola može se vršiti putem proteina za prijenos sterola poput oksisterola (OSBP) ili membranskim vezikulama.

Približno 10% ukupne sinteze kolesterola odvija se u jetri i probavnom sustavu (Mayes i Botham, 2003). Biosinteza kolesterola energetski je skup proces koji se događa u citoplazmi i endoplazmatskom retikulumu (ER) svih stanica s jezgrom (Mayes i Botham, 2003; Škara i sur., 2021). Ishodišne molekule za sintezu su dvije molekule acetil koenzima A (CoA) koje formiraju acetoacetyl-koenzim A (Shi i sur., 2022). Acetoacetyl koenzim A se također može formirati iz acetoacetata koji je konačni produkt ketogeneze. Dodavanjem treće molekule CoA nastaje 3-

hidroksi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) kojega u konačnici 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA reductaza (HMGCR) reducira do mevalonata. Fosforilacijom i dekarboksilacijom mevalonata nastaje izopentil pirofosfat (IPP) koji se polimerizira do farenzil pirofosfata (FPP). Kondenzacijom dviju molekula FPP-a nastaje skvalen koji se prerađuje u kolesterol (Slika 2).



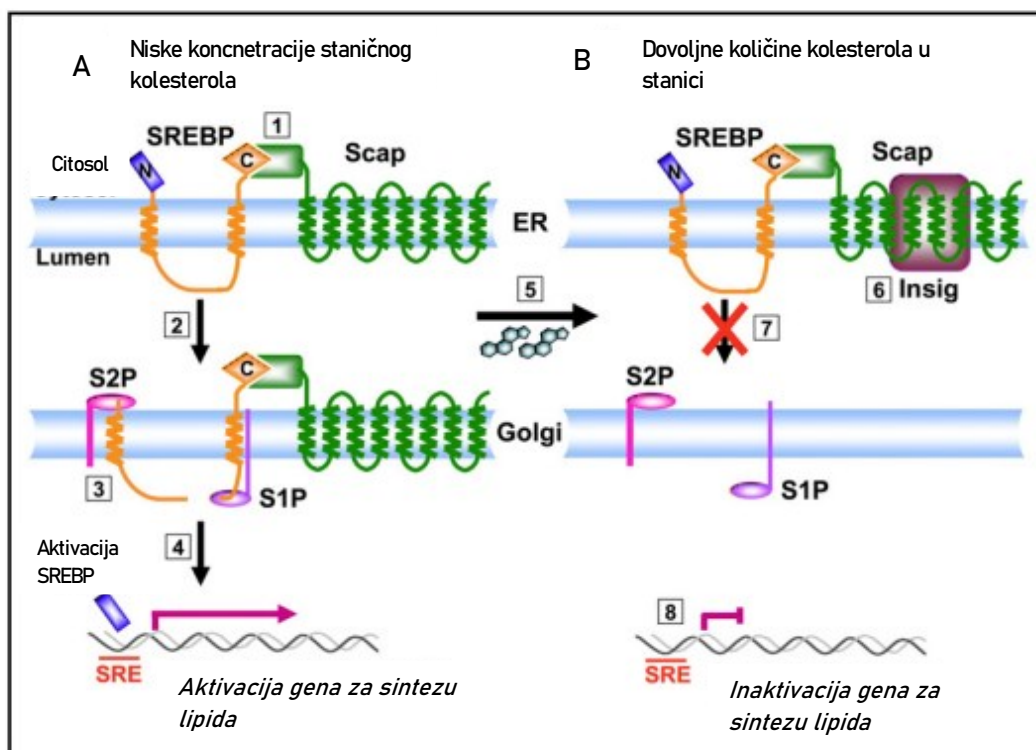
**Slika 2:** Prikaz glavnog puta sinteze kolesterola (Preuzeto i prilagođeno prema Shi i sur., 2022). Biosinteza kolesterola uključuje gotovo 30 različitih reakcija. Koraci ograničavanja brzine sinteze katalizirani su 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktazom (HMGCR) i skvalen monoooksigenazom (SM).  
 Kratice: HMGCR - 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaza, FDFT – farenzil-difosfat farenziltransferaza, SM – skvalen monoooksigenaza, LSS – lanosterol sintaza

Unatoč tome što kolesterol igra značajnu ulogu u staničnoj građi i metabolizmu, visoke razine mogu biti toksične. Kako bi se spriječila njegova toksičnost, višak sintetiziranog kolesterola esterificira se acil-CoA aciltransferazama te se pohranjuje u lipidnim kapljicama ili se izbacuje iz stanice kazetnim prijenosnikom A1 koji veže ATP (ABCA1) i kazetnim prijenosnikom G koji veže ATP (ABCG) (Škara i sur., 2021).

### 1.3.2. Regulacija homeostaze kolesterola na transkripcijskoj razini

U regulaciji homeostaze staničnog kolesterola sudjeluju dva transkripcijska faktora: protein koji se veže na regulacijski element ovisan o sterolu (SREBP2, engl. *sterol regulatory element-binding protein 2*) i jetreni receptor X (LXR, engl. *liver X receptors*) (Krycer i Brown, 2013). Protein SREBP2 jedna je od tri izoforme transkripcijskog čimbenika SREBP te je jedan od glavnih regulatora ekspresije gena koji sudjeluju u sintezi kolesterola. Njegova se sinteza odvija na membrani ER-a u obliku neaktivnog prekursora veličine 125 kDa. S obzirom da je podložan razgradnji, SREBP2 je konstantno vezan za protein SCAP (engl. *SREBP cleavage activating protein*) koji veže SREBP odmah nakon sinteze (Škara i sur., 2021). SCAP je politopni membranski proteini koji se sastoji od amino-terminalne domene i karboksil-terminalne WD40 domene. Amino-terminalna regija sastoji se od osam transmembranskih helikaza međusobno povezanih sa četiri male i tri velike petlje. Pri visokim koncentracijama, kolesterol se veže za SCAP uzrokujući konformacijsku promjenu koja odvaja petlju 1 od petlje 7. Kada su petlje SCAP se veže s proteinom gena induciranog inzulinom (INSIG1, engl. *insulin induced gene 1*) spriječavajući nastanak SCAP-SREBP2 kompleksa. Na taj način onemogućen je transport SREBP2 iz retikuluma za sintezu kolesterola (Lee i sur., 2020). Suprotno, kada razina kolesterola padne ispod 5%, petlja 1 i petlja 7 stupaju u interakciju što će spriječiti vezanje INSIG1 za SCAP. SREBP2 stupa u interakciju sa SCAP-om, a nastali se kompleks prenosi od retikuluma prema Golgijevom aparatu. U Golgiju proteaze Site -1 (S1P) i Site-2 (S2P) proteolitički cijepaju SREBP2 koji se potom transportira u jezgru gdje se veže za sekvencu elementa odgovora na sterole (SRE, engl. *sterol response element sequence*) i stimulira sintezu kolesterola (Slika 3) (Škara i sur., 2021).





**Slika 3:** Regulacija homeostaze kolesterola u stanici proteinom koji se veže na regulacijski element ovisan o sterolu (SREBP) (Preuzeto i prilagođeno prema Škara i sur., 2021).

A) Pri niskim koncentracijama intracelularnog kolesterola kompleks SREBP2-SCAP se transportira iz endoplazmatskog retikuluma (ER) u Golgijev aparat gdje se sa SREBP2 odcjepljuje amino-terminalna domena (n-SREBP2). U jezgri n-SREBP2 inducira ekspresiju gena uključenih u biosintezu kolesterola. B) Suprotno, kada su koncentracije kolesterola visoke, SCAP formira kompleks sa proteinom gena induciranog inzulinom (INSIGN1) što sprječava transport SREBP2 od retikuluma prema Golgijevom aparatu.

Kratice: SREBP - regulacijski element ovisan o sterolu, SCAP - engl. *SREBP cleavage activating protein*, S2P i S1P – proteaze Site 2 i Site 1, INSIG – gen induciran inzulinom, SRE - sekvenca elementa odgovora na sterole

Povišene razine kolesterola u stanici također mogu stimulirati nuklearni receptor LX. Ovaj se transkripcijski faktor pojavljuje u dvije izoforme: LXR $\alpha$  i LXR $\beta$ . Izoforma LXR $\beta$  eskprimirana je u gotovo svim stanicama i tkivima, dok je ekspresija LXR $\alpha$  ograničena samo na pluća, vezivno te masno tkivo. Obje izoforme stvaraju heterodimere s retinoidnim X receptorom (RXR). Heterodimer u odsustvu liganda veže korepresor utišavajući tako ekspresiju ciljnih gena. Suprotno tome, vezanje liganda potiče zamjenu korepresora sa koaktivatorima što aktivira ekspresiju gena uključenih u retrogradni transport kolesterola i degradaciju LDL receptora (Krycer i Brown, 2013).

### 1.3.3. Uloga kolesterola u razvoju karcinoma prostate

Deregulacija lipidnog metabolizma glavna je karakteristika PCa. Mnoga istraživanja dokazala su povećane koncentracije kolesterola i LDL čestica u tumorskim stanicama prostate, a poznato je i kako muškarci oboljeli od hiperkolesterolemije imaju značajno veći rizik za razvoj PCa (Škara i sur., 2021). Prvi dokaz o povezanosti kolesterola i PCa bila su istraživanja (Haenszel i sur. 1968; Shimizu i sur. 1991) provedena na japanskim imigrantima koji su nakon migracije u SAD imali 4 do 6 puta veći rizik za razvoj karcinoma. Povećanje je učeno i na muškarcima rođenima u SAD-u, a razlog tomu vjerojatno leži u prelasku na „zapadnjačku prehranu“ bogatu mastima (Krycer i Brown, 2013). Iako su danas mnoga istraživanja potvrdila potencijalnu ulogu kolesterola u nastanku PCa, postoje brojna neslaganja. Nedavno provedena istraživanja opovrgnula su povezanost kolesterola s nastankom PCa, ali su potvrdila da povećane razine HDL-a mogu povećati rizik od razvoja teškog oblika bolesti. S druge strane, neka istraživanja nisu pronašla povezanost povećanih razina LDL-a i HDL-a s nastankom PCa (Škara i sur., 2021).

Brojni čimbenici koji reguliraju metabolizam kolesterola u stanicama poremećeni su što dovodi do promjene signalnih puteva i nastanka tumora. Neke signalne molekule mogu utjecati na aktivnost transkripcijskih čimbenika koji reguliraju razine kolesterola u stanici te na taj način promijeniti cjelokupni lipidni metabolizam. Osim toga, vanjski čimbenici poput upale ili zakiseljavanja tumorskog okoliša također mogu dovesti do disbalansa metabolizma kolesterola u stanici (Xiao i sur., 2023).

Kao što je rečeno u prethodnom poglavlju, transkripcijski faktor SREBP2 jedan je od najvažnijih regulatora lipogeneze i homeostaze staničnog kolesterola. U suradnji s ostalim molekulama, SREBP2 održava ravnotežu unutarstaničnog kolesterola, a bilo kakva modifikacija može ozbiljno narušiti stanični metabolizam. U tumorskim stanicama, prekomjerna aktivacija signalnog puta AKT/mTOR inhibira degradaciju SREBP2 potičući tako ekspresiju gena uključenih u sinzezu kolesterola. Osim poremećaja održavanja homeostaze kolesterola, deregulacija njegove sinteze i apsorpcije također je jedno od obilježja PCa. Enzim HMGCR pojačano je eksprimiran u tumorskim stanicama prostate, te se povezuje s pojavom recidiva bolesti. Uz to, ABCA1 niža je u tumorskim nego u normalnim stanicama te je negativno povezana s Gleasonovim uzorkom 1 (Škara i sur., 2021)

---

<sup>1</sup> Najčešći način stupnjevanja raka prostate. Stupnjevi se određuju na temelju mikroskopskog pregleda tkiva te izgleda stanica.

## 1.4. Androgeni receptor

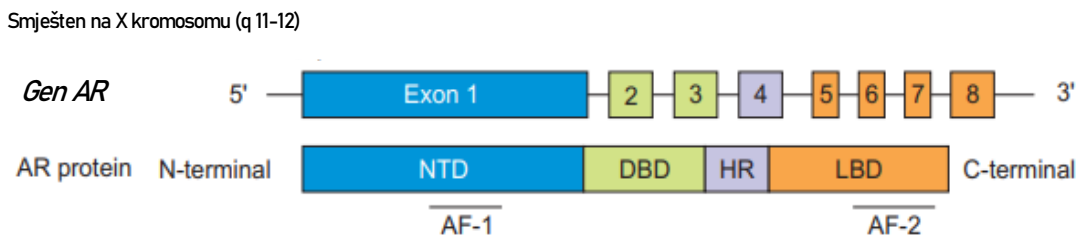
### 1.4.1. Struktura i funkcija androgenog receptora

Androgeni su steroidni hormoni koji su neophodni za razvoj i normalno funkcioniranje prostate (Škara i sur., 2021). Androgeni hormoni se najvećim dijelom sintetiziraju u testisima i adrenalnim žlijezdama (Fujita i Nonomura, 2019). Testosteron se tijekom života proizvodi u dvije različite vrste Lydigovih stanica. U fetalnom se razdoblju njegova proizvodnja odvija u fetalnim Lydigovim stanicama, dok u odraslom organizmu tu ulogu preuzimaju odrasle Lydigove stanice (Banrjee i sur., 2018). Proizvedeni se testosteron veže za spolni hormon koji veže globulin, dok se ostatak u stanicama prostate pretvara u dihidrotestosteron (DHT) (Fujita i Nonomura, 2019).

Nuklearni receptor AR član je superobitelji receptora steroidnih hormona te je receptor ovisan o ligandu. Gen za AR smješten je na kromosomu X (q11-12) i sastoji se od 8 egzona koji kodiraju protein prosječne veličine 110 kDa. Receptor je strukturalno sličan ostalim nuklearnim hormonskim receptorima te se sastoji od četiri različite domene: amino-terminalne domene (NTD), domene koja veže ligand (LBD), domene koja veže DNA (DBD) i zglobne regije (Slika 4). Amino-terminalna domena sadrži ponavljanja glutamina čiji broj može varirati. U zdravih muškaraca broj ponavljanja varira između 19 i 25 aminokiselina, dok kraći broj ponavljanja predstavlja veći rizik od razvoja PCa. Pacijenti s Kennedyjevom bolešću<sup>2</sup> imaju više od 40 ponavljanja što rezultira ginekomastijom, erektilnom disfunkcijom, te atrofijom mišića i testisa. Domena koja veže ligand visokim afinitetom veže testosteron i DHT što rezultira promjenom konformacije AR. Nakon translokacije u jezgru, AR se domenom koja veže DNA veže za element odgovora na androgen (ARE, engl. *androgen response element*) potičući tako transkripciju ciljnih gena. AR regulira ekspresiju gena smještenih nizvodno od ARE uključujući proteine kalikrein 2 i kalikrein 3 (KLK2 i KLK3), fuzijske gene (TMPRSS-ERG), stimulatore rasta (IGF1R i APP), transkripcijske čimbenike te neke metaboličke enzime i regulatore staničnog rasta (Fujita i Nonomura, 2019).

---

<sup>2</sup> X-vezana progresivna neuromuskularna bolest, karakterizirana grčevima u rukama i nogama, mišićnom slabosti, fascikulacijama lica i poteškoćama u govoru. Uglavnom se javlja kod muškaraca.



**Slika 4:** Prikaz strukture gena androgenog receptora (AR) (Preuzeto i prilagođeno prema Fujita i Nonomura, 2019).

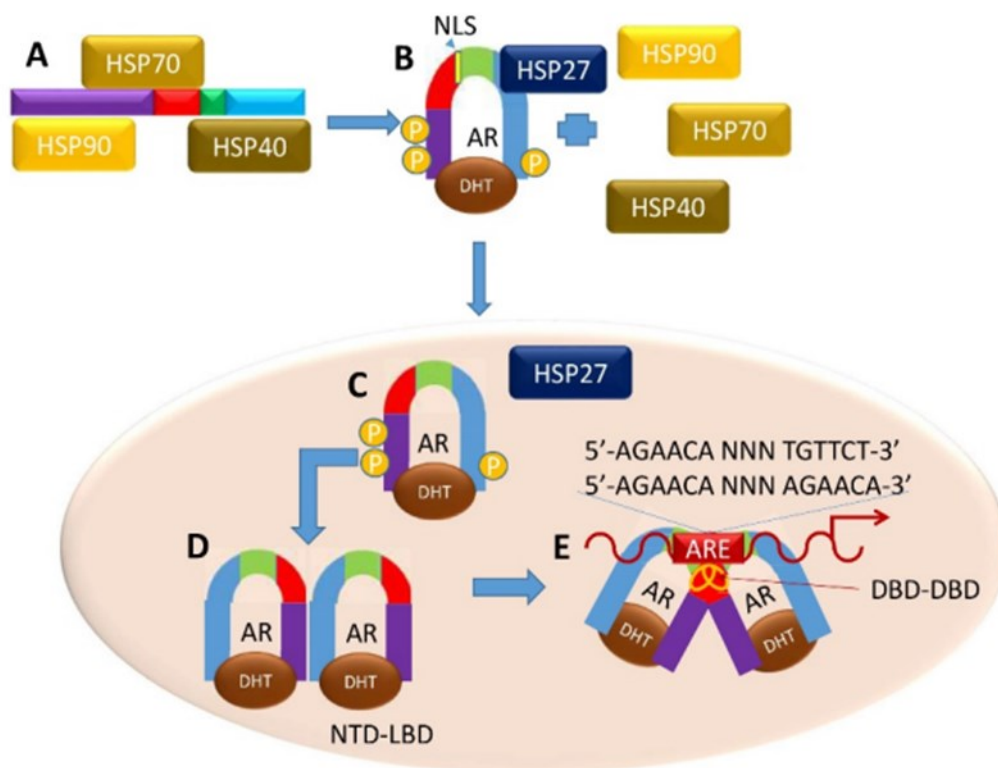
Protein *AR* sastoji se od 8 egzona.

Kratice: NTD – amino-terminalna domena, DBD – domena koja veže DNA, HR – zglobna regija (engl. *hinge region*), LBD – domena koja veže ligand.

#### 1.4.2. Regulacija transkripcijske aktivnosti androgenog receptora

Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju testosteron i DHT su dva glavna liganda koja se vežu za regiju LBD AR-a. Cjelokupni proces sinteze kolesterola reguliran je osi hipotalamus-hipofiza-testisi. Hipotalamus luči gonadotropin-oslobađajući hormon (GnRH) koji potiče prednji režanj hipofize na otpuštanje luteinizirajućeg hormona (LH). On se krvlju prenosi do testisa gdje se veže za receptor LH na Lydigovim stanicama. Vezanjem LH, aktivira se enzim P450<sub>scc</sub> koji započinje proizvodnju testosterona iz kolesterola (Messner i sur., 2020). U biosintezu testosterona uključene su dvije skupine enzima: citokromi P450 i dehidrogenaze, koje djeluju ili kao aldo-keto reduktaze ili dehidrogenaze/reduktaze kratkog lanca (Batth i sur., 2020). Oko 90% cirkulirajućeg testosterona proizvede se u Lydigovim stanicama dok samo mali dio opskrbljuje kora nadbubrežne žlijezde. Novosintetizirani testosteron se zatim veže na globulin koji veže spolne hormone (SHBG) ili albumin. Jednom kada uđe u stanice prostate, testosteron se 5 $\alpha$ -reduktazom (5AR) konvertira u metabolit DHT. Poznate su dvije izoforme enzima koje vežu testosteron različitim afinitetima. Izoforma 5AR1 ima izrazito niski afinitet prema testosteronu te se uglavnom eksplicira u tkivima poput jetre, kože i folikula dlake. Suprotno tome, izoforma 5AR2 pokazuje visok afinitet te se ispoljava samo u tkivu prostate. Nastali DHT pokazuje veći afinitet za AR od testosterona što ga čini efektivnijim androgenom. U neaktivnom obliku, monomer AR je vezan za proteine toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock proteins*) 40, 70 i 90 koji ga štite od degradacije (Messner i sur., 2020). Vezanjem liganda, AR disocira sa šaperona HSP čime se pokreće interakcija između N i C krajeva

receptora i njegova translokacija u jezgru. Receptorski dimeri se u jezgri vežu za već spomenute elemente odgovora na androgene (ARE) smještenima u promotorima ciljnih gena (PSA, TMPRSS-ERG) koji aktiviraju koregulatorne proteine što na kraju dovodi do konačnog staničnog odgovora (Slika 5) (Tan i sur., 2015).



**Slika 5:** Shematski prikaz kanonske aktivacije androgenog signalnog puta (Preuzeto i prilagođeno prema Messner i sur., 2020).

(A) Vežanje androgena na AR i disocijacija proteina toplinskog šoka (HSP), (B) stvaranje monomera NTD i LBD, (C) translokacija monomera u jezgru, (D) NTD i LBD formiraju homodimere (E) homodimeri vezani za androgene (C) i (D) formiraju heterodimere DBD-DBD koji se vežu na ARE kako bi započela transkripcija ciljnih gena.

Kratice: AR – androgeni receptor, DHT – dihidrotestosteron, HSP – protein toplinskog šoka, ARE – element odgovora na androgene NTD-LBD

Posttranslacijske modifikacije mogu utjecati na aktivnost gena *AR* ili negenomskih proteina u citoplazmi i jezgri. Modifikacije se mogu dogoditi na bilo kojem mjestu u genu uključujući mjesta fosforilacije u regiji NTD, acetilacije, metilacije ili ubikvitinizacije. U normalnim stanicama sintetizirani testosteron i DHT reguliraju aktivnost gena *AR* vezanjem za LBD. Posttranslacijske modifikacije reguliraju transkripciju gena te aktivnost i stabilnost proteina *AR* održavajući tako aktivnost gena u homeostazi. Ipak u tumorskim je stanicama signalni put AR najčešće promijenjen čime se postiže onkogeni aktivnost gena (Messner i sur., 2020).

#### 1.4.3. Interakcija kolesterola sa signalnim putem androgenog receptora

Tumorske stanice prostate razlikuju se u razini ekspresije AR te pokazuju različitu osjetljivost na androgene. U istraživanju koje su proveli Bookhoven i sur. (2003) utvrđeno je kako od ukupno 17 analiziranih staničnih linija prostate njih 9 ekspresira AR, dok je u svega 5 staničnih linija pronađena mutacija ovog gena. Do hiperaktivacije signalnog puta androgena dolazi uslijed djelovanja različitih čimbenika, uključujući točkaste mutacije, amplifikacije gena *AR*, promijenjenu ekspresiju koaktivatora AR te intratumoralnu sintezu androgena (Guerrero-Ochoa i sur., 2024). Amplifikacija gena jedna je od najčešćih modifikacija, koja je nađena u 30 do 50% pacijenata s metastatskim tumorom. Iza njih slijede točkaste mutacije (15-30% oboljelih), najčešće u domeni koja veže ligand i amino-terminalnoj domeni (Fujita i Nonomura, 2019).

Osim prethodno navedenih čimbenika, kolesterol isto može utjecati na AR povećavajući tako onkogeni potencijal stanica. Grolez i sur. (2019) dokazali da kolesterol iz lipidnih splavi ulazi u interakciju sa N-terminalnom domenom AR-a aktiviranog androgenima formirajući tako kompleks s proteinom TRPM8 (prolazni receptorski potencijalni kationski kanal melastatina 8) (Guerrero-Ochoa i sur., 2024). Ova interakcija inhibira funkciju kationskog kanala TRPM8 potičući tako migraciju, invaziju i metastaziranje tumorskih stanica. Aktivirani AR regulira TRPM8 te potiče njegovu transkripciju vezanjem za ARE (Guerrero-Ochoa i sur., 2024).

Androgeni mogu potaknuti nakupljanje kolesterola u tumorskim stanicama prostate aktiviranjem transkripcijskog faktora SREBP2 koji se u jezgri veže na regulatorne elemente sterola (Krycer i Brown, 2011). Povećavajući ekspresiju proteina SCAP, androgeni mijenjaju izoformu INSIG-a što

direktno aktivira SREBP2. Na taj način dolazi do promijene signalnih puteva uključenih u sintezu masnih kiselina i kolesterola (Guerrero-Ochoa i sur., 2024).

### 1.5. Statini kao potencijalna terapija za rak prostate

Statini pripadaju skupini inhibitora HMG-CoA reduktaze koji potiskujući aktivnost ovog enzima u jetri inhibiraju sintezu kolestrola. Zbog svojeg inhibirajućeg učinka na kolesterol, statini su jedni od najčešće korištenih lijekova za prevenciju kardiovaskularnih bolesti (Sun i sur., 2022). Procjenjuje se da je 2018. godine oko 173 milijuna ljudi diljem svijeta svakodnevno koristilo lijekove za snižavanje kolesterola, a statini su bili jedni od najprodavanijih lijekova iz te skupine (Blais i sur., 2021). Iako je važnost statina u prevenciji kardiovaskularnih bolesti nesumnjiva, posljednjih se godina sve više istražuje njihov antineoplastični učinak te uloga u liječenju erektilne disfunkcije i nekih uznapredovalih tumora (kolorektalni karcinom, karcinom gušterače i PCa) (Sun i sur., 2022).

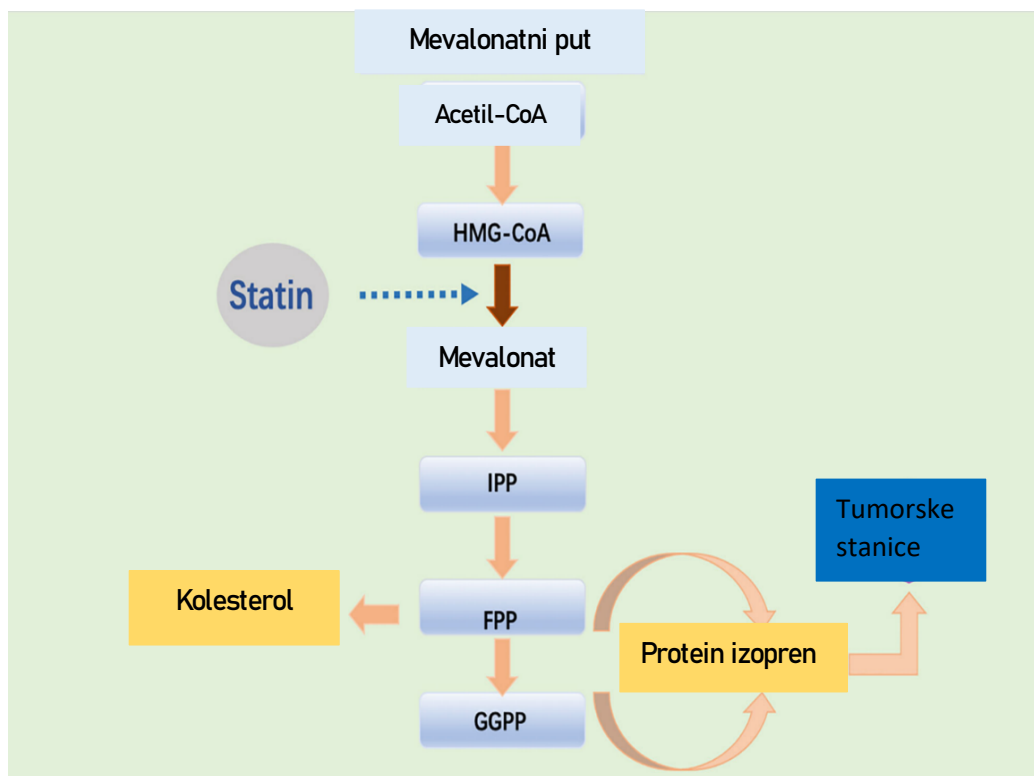
Antineoplastičnost statina uvelike ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, to jest o lipofilnosti. Lipofilnost je jedno od najvažnijih svojstva statina koje im omogućuje pristup svim tkivima uključujući i ona tumorska. Statini se transportiraju u stanice putem organskih anionskih transportnih polipeptida (OATP1B1) koji su većinom eksprimirani na hepatocitima (Barbalata i sur., 2020). Kao rezultat toga hidrofilni statini poput parvastatina i rosuvastatina akumuliraju se u jetrenom tkivu dok lipofilni statini (lovastatin, simvastatin) pasivnom difuzijom ulaze u ekstrahepatička tkiva (Duarte i sur., 2021). Neka istraživanja *in vitro* provedena na staničnim linijama različitih vrsta tumora dokazala su niži antikancerogeni potencijal hidrofilnih statina u usporedbi s onim lipofilnim. Sukladno tome, nedavno provedeno istraživanje (Beckwitt i sur., 2018) procijenilo je utjecaj simvastatina, parvastatina, atorvastatina i rosuvastatina na četiri različite vrste tumorskih stanica. Rezultati su pokazali kako atorvastatin ima najveći antitumorski učinak od svih navedenih statina, dok se parvastatin dokazao najmanje učinkovitim u suzbijanju rasta stanica (Barbalata i sur., 2020).

Statini izrazito utječu na razine lipida u serumu reducirajući LDL za 30-60%, kolesterol za 23-28% i trigliceride za 25-45%. Akumulacija lipida i disregulacija mevalonatnog puta glavna su obilježja PCa (Craig i sur., 2022). Nekoliko mehanizama uključeno je u deregulaciju homeostaze kolesterola

u tumorskim stanicama prostate. Prethodno spomenuta hipermetilacija promotora *ABCA1* dovodi do smanjene ekspresije proteina za efluks kolesterola što će rezultirati smanjenim izbacivanjem kolesterola i njegovim nakupljanjem u stanicama. Osim toga aktivacija signalnog puta PI3K/AKT/mTOR također je povezana s razvojem PCa kod ljudi. Svi signalni putevi koji su uključeni u rasti i razvoj PCa pokrenuti su nakupljanjem kapljica kolesterola u lipidnim splavima. Uslijed svojeg reducirajućeg učinka na kolesterol, statini sprječavaju nakupljanje lipidnih kapljica u staničnoj membrani čime inhibiraju AR, EGFR, AKT/mTOR i ostale signalne puteve uključene u rast tumorskih stanica. S obzirom da je kolesterol prekursor androgenih hormona, njegovim smanjenjem moguće je utjecati na sintezu unutarstaničnih androgena te tako inhibirati razvoj kancerogenih stanica (Sun i sur., 2022).

Kao što je već rečeno, statini inhibiraju enzim HMGCR što dovodi do redukcije mevalonata i ostalih molekula koje su bitni posrednici regulacije staničnog ciklusa. Geranilgeranil fosfat važan je medijator mevalonatnog puta koji je u tumorskim stanicama odgovoran za inhibiciju apoptoze.. Statini su sposobni smanjiti njegove razine u stanici te na taj način aktiviranjem kaspaza pokrenuti apoptozu ciljnih stanica (Duarte i sur., 2021). Uz to, statini mogu inhibirati proliferaciju stanica iscrpljivanjem mevalonata i ostalih izoprenoidea uključenih u postranslacijske modifikacije (prenilaciju) proteina. Prenilacija proteina bitna je za lokalizaciju i funkciju većine signalnih proteina poput GTPaza Rho i Ras koje reguliraju aktivnost kinaza uključenih u brojne fiziološke procese u stanici (Sun i sur., 2022). Inhibicija rasta tumorskih stanica jedan je od bitnih učinaka statina kada je riječ o PCa. Redukcijom kinaze ovisne o ciklinima 4 i 6 (CDK4/6, engl. *cyclin dependent kinase 4/6*) te ciklina D1, statini zaustavljaju stanični ciklus u G1 fazi što negativno utječe na rast tumorskih stanica. Slično tome, inhibiranjem matriks metaloproteinaze-9 u endotelnim stanicama, spriječena je angiogeneza, a time i invazijska sposobnost stanica PCa (Slika 6) (Duarte i sur., 2021).





**Slika 6:** Mevalonatni put i njegov utjecaj na tumorske stanice (Preuzeto i prilagođeno prema Zhu i sur., 2021).

Statini sprječavaju pretvorbu HMG-CoA u mevalonat inhibicijom HMG-CoA reduktaze. Inhibicija dovodi do smanjene produkcije izoprenoidnih intermedijera te u konačnici kolesterola. Redukcija u sintezi kolesterola prouzrokovat će smanjenu proizvodnju sterola i poremećaj lipidnih splavi. Smanjenje razine izoprenoida poremetit će brojne stanične procese uključujući staničnu diferencijaciju, migraciju, proliferaciju itd.

Kratice: HMG-CoA - 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA, IPP – izopentil pirofosfat, FPP – farenzil pirofosfat, GGPP – geranilgeranil pirofosfat

Statini također mogu izravno djelovati na tkivo prostate, mehanizmima koji nisu povezani sa sustavnim snižavanjem razina kolesterola u stanici. Jedan od takvih mehanizama jest i smanjenje sistemske i lokalne upale. Nedavno provedena istraživanja dokazala su da statini smanjuju lokalnu upalu kod krvožilnih i upalnih bolesti poput reumatoidnog artritisa. Slična istraživanja provedena su i na tkivu prostate, a dobiveni rezultati bili su podjednaki. Naime, muškarci koji su neposredno prije radikalne prostatektomije bili podvrgnuti terapiji statinima, imali su značajno smanjeni rizik od razvoja histološke upale. Nadalje, dva ispitivanja provedena na muškarcima podvrgnutima biopsiji prostate neovisnoj o PSA, istražila su povezanost upotrebe statina s pojavom benigne upale

prostate. Prvo istraživanje (Longo i sur., 2020) koje je obuhvaćalo muškarce s povišenim PSA i negativnim nalazima biopsije dokazalo je manji rizik od kronične upale kod ispitanika koji su uzimali statine u odnosu na one koji nisu. Suprotno tome, drugo je istraživanje (Knuutila i sur., 2019) provedeno na pacijentima s nalazima biopsije pozitivnima na rak, a dobiveni rezultati nisu dokazali nikakvu povezanost između uporabe statina i razvoja histološke upale (Craig i sur., 2022).

## 1.6. Primjena dvodimenzionalnih (2D) i trodimenzionalnih (3D) staničnih kultura u istraživanju PCa

Rak prostate najčešći je dijagnosticirani te peti po redu najsmrtonosniji rak u muškaraca diljem svijeta. Stanični modeli raka dobiveni od pacijenata bitni su za proučavanje etiologije i napredovanja bolesti. Razumijevanje osnovnih značajki PCa bitno je za otkrivanje molekularnih mehanizama koji dovode do njegove progresije te razvoja novih metoda liječenja i dijagnostike. LNCaP, PC3 i DU145 neke su od najčešće korištenih staničnih linija za istraživanje PCa (Moya i sur., 2023). Stanična linija LNCaP osjetljiva na androgene eksprimira AR i PSA, a dobivena je iz metastaza u limfnim čvorovima (Basak i sur., 2022). Iako je tumorigenost ovih stanica prilično slaba, neke podlinije izvedene iz ovih stanica moguće je uzgajati *in vivo* nakon supkutane ili ortotopne inokulacije. Nedavno razvijena podlinija LNCaP C4-2 neovisna je o androgenu te pokazuje malu sposobnost metastaziranja u kosti. Suprotno od LNCaP, stanične linije DU145 i PC3 ne ekspimiraju AR (Wu i sur., 2013). Budući da navedene PCa linije ne odražavaju heterogenost koja se opaža u ljudskim tumorima, modeli raka dobiveni od pacijenata bolja su alternativa za istraživanje bolesti. Ksenografti dobiveni od pacijenata vjerodostojnije simuliraju kliničke odgovore na lijekove te su zbog toga primjereniji u razvoju novih tretmana protiv PCa (Basak i sur., 2022).

Kao što je već spomenuto, AR je neophodan za normalan razvoj i funkcioniranje prostate te igra ključnu ulogu u razvoju PCa. Korištenjem novih metoda uspješno se proširiti znanje o učinku gena reguliranih androgenima na progresiju PCa, a identificiran je i čitav niz poremećenih signalnih puteva u tumorskim stanicama prostate. Unatoč tome, još se uvijek malo zna o učinku androgena na ekspresiju gena u stromalnim stanicama prostate. Razlog tomu je nedostatak staničnih modela PCa koji prekomjerno ekspimiraju AR i reagiraju na prisutnost androgena. Kako bi se riješio ovaj problem, razvijen je novi model stromalnih stanica prostate koji prekomjerno eksprimira AR te

pokazuje visoku razinu osjetljivosti na androgene (Tanner i sur., 2011). Riječ je o fibroblastima prostate, najzastupljenijoj vrsti stromalnih stanica sa ključnom ulogom u agresivnosti i razvoju PCa. Brojna istraživanja dokazala su kako fibroblasti potiču progresiju nisko tumorogenih stanica adenokarcinoma prostate potičući tako metastaziranje u kosti. Upotreba fibroblasta kao modela proučavanja PCa olakšat će razumijevanje staničnih procesa uključenih u razvoj bolesti te pružiti uvide u nove terapijske i dijagnostičke pristupe (Bonollo i sur., 2020).

Testiranje antitumorskih lijekova uglavnom se provodi na 2D staničnim kulturama, gdje se stanice uzgajaju u jednom sloju u za to posebno predviđenim posudama. S obzirom na njegovu jednostavnost i lakoću održavanja, ovaj se model i dalje upotrebljava u mnogim svjetskim laboratorijima. Međutim 2D kultura ne predočuje strukturu i složenost tumora pronađenog *in vivo* (Petrić i Sabol, 2023). Stanice uzgojene u 2D kulturi ne posjeduju 3D strukturu tkiva te interakcije stanica-stanica ili stanica-izvanstanični matriks (ECM) koje postoje u organizmu. Stoga ovi modeli ne mogu u potpunosti predočiti fiziologiju tumorskih stanica niti njihov odgovor na ispitivane lijekove i zračenja. Trodimenzionalni modeli u zaobilaze ovaj problem oponašajući fiziološka svojstva tumora *in vivo*. S obzirom da 3D kultura vjerno predočava prostornu strukturu stanice, ovaj model pokazao se idealnim u istraživanju tumora i antitumorskih lijekova. U posljednjih nekoliko desetljeća razvoj 3D staničnih kultura značajno je napredovao, a 3D modeli tumora postali su glavni alat u brojnim onkološkim ispitivanjima (Lv i sur., 2017).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja je da statini simvastatin i lovastatin pokazuju inhibitorni učinak na rast staničnih linije karcinoma i fibroblasta prostate u 2D i 3D uvjetima rasta.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati učinak dva različita statina na vijabilnost i proliferaciju staničnih linija tumora prostate i fibroblasta prostate u 2D i 3D uvjetima rasta te njihov učinak na ekspresiju *AR* i njegovih ciljnih gena *KLK2* i *KLK3*.

Specifični ciljevi ovog rada su:

1. Uzgojiti stanice tumora prostate i fibroblasta prostate u 2D i 3D kulturi
2. Testom MTT na 2D kulturi odrediti doze terapeutika koje će biti korištene u istraživanju
3. Iste doze primijeniti na 3D kulturama i pratiti vijabilnost bojanjem živih i mrtvih stanica
4. Tretirati stanice u 2D i 3D uvjetima prethodno određenim dozama terapeutika
5. Izolirati RNA iz tretiranih stanica i provesti reverznu transkripciju
6. Metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR) odrediti ekspresiju gena *AR*, *KLK2* i *KLK3* tretiranih stanica u odnosu na netretiranu kontrolnu skupinu.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

Ovo istraživanje je provedeno na dvije stanične linije ljudskog karcinoma prostate LNCaP (RRID:CVCL\_0395) i PC3 (RRID:CVCL\_0035) te staničnoj liniji fibroblasta prostate WPMY-1 (RRID:CVCL\_3814). Radi se o komercijalnim staničnim linijama koje se uzgajaju u obliku adherentne kulture u Petrijevim zdjelicama za kultivaciju humanih stanica. Sve stanične linije održavala sam u preporučenim medijima: RPMI 1640 (*Roswell Park Memorium Institute 1640*), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) i DMEM/Ham's F-12 (mješavina DMEM-a i Hamovog F12 medija (Hamova hranjiva smjesa F-12)). Stanice sam uzgajala u inkubatoru pri 37°C te 5% CO<sub>2</sub> u vlažnoj atmosferi.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Rad s 2D staničnim kulturama

##### 3.2.1.1. Odmrzavanje stanica

Stanice su bile zamrznute u krio-ampulama na -80 °C u mediju za zamrzavanje (50% serum, 40% odgovarajući medij te 10% DMSO (dimetil-sulfoksid)). Odmah nakon vađenja iz zamrzivača stanice sam premjestila na hladni stalak kako bi se odmrznule. Za to vrijeme sam u staklenu epruvetu pomoću pipete dodala 5 mL svježeg medija. Odmah nakon odmrzavanja, stanice sam prebacila u epruvetu s medijem te ih centrifugirala u centrifugi (5084R Eppendorf) 5 min na 4 °C pri 1200 x g. Nakon centrifugiranja supernatant sam pažljivo odlila u kanticu za otpad, a talog stanica resuspendirala u 10 mL novog medija i prebacila u čistu Petrijevu zdjelicu. Petrijeva zdjelica stavljena je u inkubator (Kambič) na inkubaciju pri kontroliranim uvjetima (37 °C i 5% CO<sub>2</sub> uz vlagu).

Odmrzavanje stanica kao i ostali rad sa staničnim kulturama obavljala sam u laminarnom kabinetu za sterilni rad koristeći sterilne pufere i medije. Sav radni pribor sam prije unošenja u laminar dezinficirala etanolom. Nakon završetka rada, radnu površinu sam također očistila etanolom te potom sterilizirala UV svjetlom.

### 3.2.1.2. Održavanje staničnih linija i presađivanje

Nakon uspostavljanja adherentne kulture, stanicama sam mijenjala medij svaka 2 do 3 dana. To sam radila tako da sam prvo pipetom izvukla sav medij iz Petrijeve zdjelice te potom u istu dodala 10 mL svježeg medija. Kada su stanice prekrile cijelu površinu Petrijeve zdjelice presađivala sam ih. Prvo sam pipetom izvukla sav medij iz zdjelice te potom dodala 5 mL PBS-a (engl. *Phosphate-Buffered Saline*: 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) kako bih uklonila ostatak medija. Istom pipetom sam izvukla PBS iz Petrijeve zdjelice te mikropipetom dodala 1 mL tripsina sa dodatkom 1 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Stanice sam inkubirala 5 min te potom pod mikroskopom (Boeco) pogledala jesu li se odvojile od podloge (stanice postaju zaokružene). Plutajuće stanice resuspendirala sam s 5 mL novog medija, prenijela 1 mL stanične otopine u novu Petrijevu zdjelicu te dodala 10 mL novog medija. Prije inkubacije, na sve Petrijeve zdjelice sam napisala naziv stanične linije i medija te pasažu.

### 3.2.1.3 Test MTT

U svrhu izrade krivulja preživljavanja za statine lovastatin i simvastatin koristila sam test MTT. Krivulje preživljavanja sam izradila kako bih mogla odrediti optimalne doze statina kojima ću tretirati stanične linije LNCaP, PC3 i WPMY-1 u daljnjem eksperimentu. Test MTT je kolorimetrijski test koji se koristi za mjerenje stanične metaboličke aktivnosti, a temelji se na redukciji tetrazolijevе soli MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid) u ljubičaste kristale formazana pomoću enzima oksidoreduktaze ovisne o NAD(P)H. Dodatkom otopine za otapanje (DMSO), kristali formazana se otope, a nastala obojena otopina kvantificira se mjerenjem apsorbancija na spektrofotometru.

Adherentnim stanicama sam prvo uklonila sav medij, isprala ih u 5 mL PBS-a te tripsinizirala. Nakon odvajanja od podloge, stanice sam resuspendirala u 4 mL medija i sadržaj prenijela u staklenu epruvetu. Zatim sam 20 µL stanične otopine resuspendirala u 80 µL metilenskog modrila te potom 20 µL suspenzije nanijela na komoricu za brojanje stanica. Izbrojala sam stanice u sva četiri kvadranta i pomoću formule broj stanica/0,4 x 5x10<sup>3</sup> izračunala ukupan broj stanica u mililitru suspenzije. Dobiveni broj preračunala sam u volumen stanične suspenzije koji sam nasadila na mikrotitarsku pločicu sa 96 bunarića tako da u svakom bunariću bude 2x10<sup>3</sup> stanica u ukupnom volumenu 100 µL. Idući dan, stanice sam tretirala s četiri različite doze simvastatina

(SIM) i lovastatina (LOV) koncentracija 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  na način da sam na postojeći volumen od 100  $\mu\text{L}$  dodala još 100  $\mu\text{L}$  otopine spoja prema Tablici 1. Stanice koje pripadaju kontrolnoj skupini tretirala sam otapalom (DMSO u slučaju simvastatina i voda u slučaju lovastatina) otopljenim u 500  $\mu\text{L}$  medija. U bunariće označene NT (negativna kontrola) dodala sam čisti medij bez terapeutika (Slika 7). Svaku dozu i kontrolu napravila sam na pločici u tetraplikatu (tehnički replikati), a sam pokus tri puta (biološke replike). Nakon 72 h inkubacije stanice sam tretirala s 40  $\mu\text{L}$  MTT-a. Prije nego što sam dodala MTT, iz svakog bunarića sam sisaljkom isisala sav medij. Mikrotitarsku pločicu omotala sam aluminijskom folijom te je stavila 4 h na inkubaciju (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Zatim sam u digestoru u svaki bunarić dodala 160  $\mu\text{L}$  DMSO-a kako bi se otopio sav formazan. Mikrotitarske pločice sam nekoliko minuta stavila na trešnju na tresilicu (ASAL), a rezultate sam očitala pomoću spektrofotometra (Labsystem Multiskan MS) pri apsorbanciji od 570 nm.

**Tablica 1:** Tablični prikaz dodanih volumena u testu MTT.

	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	otapalo
SIM	25 $\mu\text{L}$ spoja u 475 $\mu\text{L}$ medija	125 $\mu\text{L}$ spoja u 325 $\mu\text{L}$ medija	250 $\mu\text{L}$ spoja u 250 $\mu\text{L}$ medija	4 $\mu\text{L}$ spoja u 1 mL medija	2 $\mu\text{L}$ otapala u 500 $\mu\text{L}$ medija
LOV	25 $\mu\text{L}$ spoja u 475 $\mu\text{L}$ medija	125 $\mu\text{L}$ spoja u 450 $\mu\text{L}$ medija	250 $\mu\text{L}$ spoja u 300 $\mu\text{L}$ medija	4 $\mu\text{L}$ spoja u 1 mL medija	10 $\mu\text{L}$ otapala u 500 $\mu\text{L}$ medija

NT	MOCK	LOV1	LOV5	LOV 10	LOV 20	MOCK	SIM1	SIM5	SIM 10	SIM 20
NT	MOCK	LOV1	LOV5	LOV 10	LOV 20	MOCK	SIM1	SIM5	SIM 10	SIM 20
NT	MOCK	LOV1	LOV5	LOV 10	LOV 20	MOCK	SIM1	SIM5	SIM 10	SIM 20
NT	MOCK	LOV1	LOV5	LOV 10	LOV 20	MOCK	SIM1	SIM5	SIM 10	SIM 20

**Slika 7:** Shematski prikaz mikrotitarske pločice za test MTT.

Kratice: NT- negativna kontrola, MOCK- kontrolna skupina stanica (stanice tretirane otapalom otopljenim u 500  $\mu\text{L}$  medija), LOV i SIM- stanice tretirane sa 1 $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  simvastatina ili lovastatina

#### 3.2.1.4. Tretiranje stanica statinima

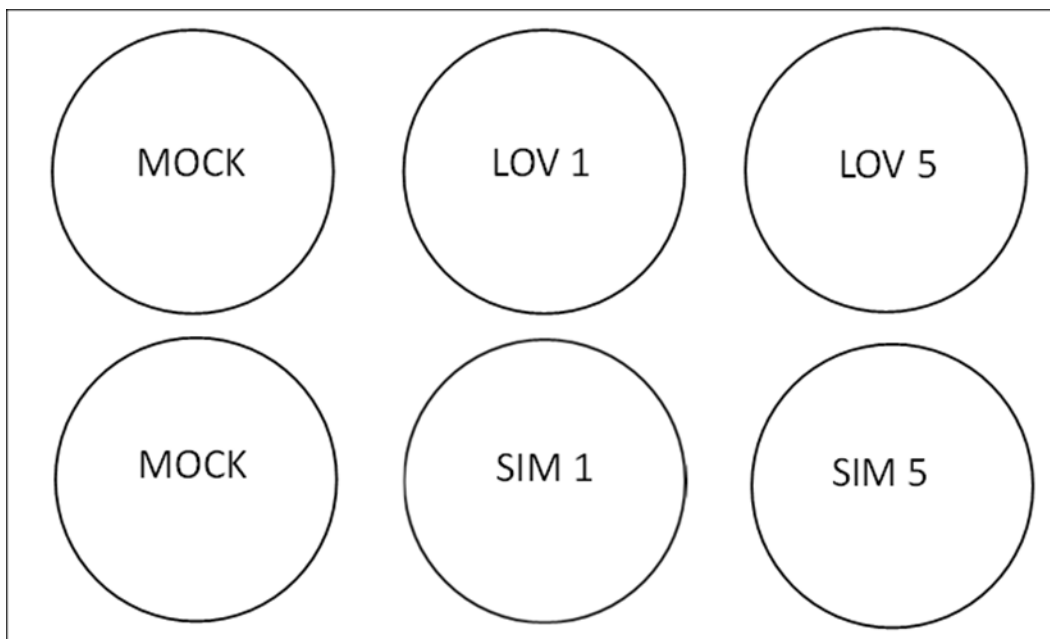
Krivulje preživljavanja dobivene testom MTT koristila sam kako bih odredila doze simvastatina i lovastatina kojima ću tretirati stanične linije LNCaP, PC3 i WPMY-1. Za svaki terapeutik odredila sam dvije različite doze: letalna doza koja ubije 50% stanica (LD50 doza) te koncentracija kod koje 80% stanica preživi (subletalna doza). Navedene doze izračunala sam pomoću mrežnog alata (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

Dan prije tretmana, stanice sam nasadila na pločice za uzgoj stanica sa 6 bunarića tako da u svakom bunariću koncentracija stanica bude  $2 \times 10^5$  st/mL (opisano u poglavlju 3.2.1.3). Nakon 24 h, stanice sam tretirala s dvije različite koncentracije simvastatina i lovastatina koncentracija  $1 \mu\text{M}$  (subletalna doza) i  $5 \mu\text{M}$  (LD50 doza) (Tablica 2). Prije tretiranja sam u 6 epruveta (Eppendorf) dodala po 3 mL medija te potom u svaku određeni volumen terapeutika. U epruvete sa kontrolnim stanicama sam umjesto terapeutika dodala otapalo (DMSO ili voda). Zatim sam sisaljkom uklonila medij iz svih 6 bunarića te po 3 mL sadržaja iz svake epruvete prebacila u odgovarajući bunarić. U bunarić označen sa MOCK (kontrolna skupina) dodan je sadržaj iz istoimene epruvete, dok je u ostale bunariće dodan terapeutik otopljen u 3 mL medija (Slika 8). Nakon tretmana, stanice sam stavila 48 h na inkubaciju kako bi ih mogla sakupiti za analizu RNA.

**Tablica 2:** Tablični prikaz dodanih volumena terapeutika i otapala prilikom tretiranja stanica.

	MOCK	DOZA 1	DOZA 2
LOV	15 $\mu\text{L}$ otapala u 3 mL medija	3 $\mu\text{L}$ spoja u 3 mL medija	15 $\mu\text{L}$ spoja u 3 mL medija
SIM	15 $\mu\text{L}$ otapala u 3 mL medija	3 $\mu\text{L}$ spoja u 3 mL medija	15 $\mu\text{L}$ spoja u 3 mL medija





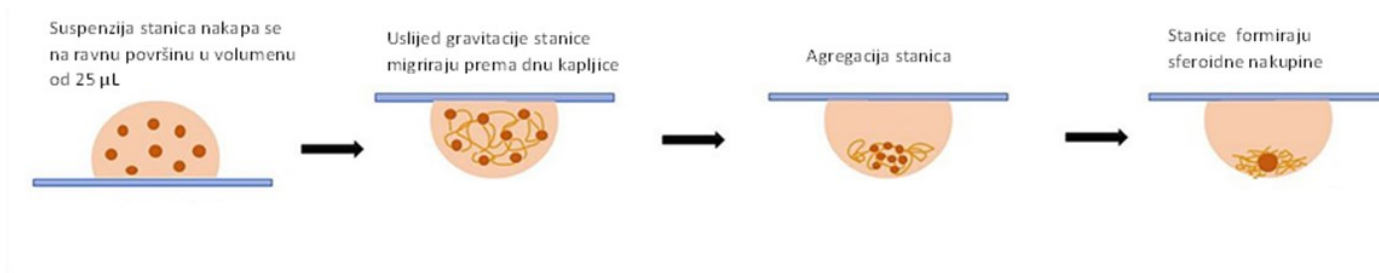
**Slika 8:** Shematski prikaz pločice sa 6 bunarića za tretiranje stanica.

Kratice: MOCK – kontrolna skupina (stanice tretirane otapalom otopljenim u 3 mL medija), LOV i SIM- stanice tretirane sa 1  $\mu$ M i 5  $\mu$ M simvastatinom i lovastatinom.

### 3.2.2. Rad s 3D staničnom kulturom

#### 3.2.2.1. Izrada sferoida metodom viseće kapljice

Sve tri stanične linije nasadila sam i u trodimenzionalnom (3D) obliku služeći se metodom viseće kapljice. U tu svrhu koristila sam po jednu Petrijevu zdjelicu za svaku staničnu liniju. Stanice sam prethodno odvojila od podloge pomoću tripsina te ih izbrojala koristeći se protokolom opisanim u poglavlju 3.2.1.3. Na dno Petrijeve zdjelice dodala sam 10 mL pufera PBS kako bih spriječila isušivanje kapljica. Zatim sam na poklopac pipetom nanosila staničnu suspenziju koncentracije 8000 st/mL u obliku kapljica volumena 25  $\mu$ L. Na taj način se u svakoj kapljici nalazi otprilike 2000 stanica, a od 1 mL suspenzije napravi se po 40 kapljica po petrijevki. Poklopac sam potom preokrenula na način da kapljice sa stanicama vise s poklopca (Slika 9.) Stanice sam stavila na inkubaciju te ih pustila da formiraju sferoide maksimalno pet dana.



**Slika 9:** Shematski prikaz formiranja sfera metodom viseće kapljice (Preuzeto i prilagođeno prema: Biju i sur., 2023).

### 3.2.2.2. Uzgoj sferoida u komoricama s neprijanjajućom podlogom

Sferoidne kulture u obliku viseće kapljice nije moguće tretirati spojevima nakon formiranja. Zbog toga sam za potrebe tretmana stanica simvastatinom i lovastatinom sferoide uzgojila u pločicama s 96 bunarića zaobljenog dna i s neprijanjajućom podlogom. Na pločicu formata 96 bunarića nasadila sam 5000 stanica po bunariću za svaku staničnu liniju u volumenu od 50 µL. Idući dan, sferoide sam tretirala sa simvastatinom i lovastatinom u istim koncentracijama kao i 2D kulture (1 µM (subletalna doza)) i 5 µM (LD50 doza)) (Slika 10).

Nakon 48 h, po 7 bunarića sa stanicama tretiranim istom koncentracijom određenog statina sakupila sam u epruvetu, centrifugirala 5 min pri 1200 x g, te taloge sačuvala za izolaciju RNA, dok sam zadnji bunarić svakog tretmana obojala komercijalnim setom za ispitivanje vijabilnosti živih i mrtvih stanica.

mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5	mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5
mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5	mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5
mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5	mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5
mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5	mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5
mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5	mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5
mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5	mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5
mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5	mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5
mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5	mock	lov1	lov5	mock	sim1	sim5

**Slika 10:** Shematski prikaz pločice za tretiranje sferoida.

Kratice: MOCK – kontrolna skupina, LOV i SIM – stanice tretirane sa 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom.

### 3.2.3. Analiza vijabilnosti stanica

Kako bih provjerila vijabilnost sferoida nakon tretmana, koristila sam se komercijalnim setom za ispitivanje vijabilnosti stanica (Live-Dead Cell Viability Assay Kit, Sigma-Aldrich). Riječ je o jednostavnom kolorimetrijskom testu za određivanje stanične vijabilnosti na temelju cjelovitosti stanične membrane te aktivnosti enzima esteraze. Set se sastoji od 3 fluorescentne boje koje su različito propusne za žive i mrtve stanice: Calcein AM (boji žive stanice), Propidij jodid (boji mrtve stanice) i Hoechst 33342 (boji sve stanice). Calcein zbog svojih lipofilnih svojstava prodire u žive stanice te nakon cijepanja unutarstaničnom esterazom daje zeleni signal. Mrtve stanice apsorbirat će propidijev jodid koji interkalira u molekulu DNA emitirajući pritom fluorescenciju u crvenom dijelu spektra. Hoechst 33342 prodire pak u sve stanice bojeći njihove jezgre u plavo. Dobivene signale možemo detektirati pomoću fluorescencijskog mikroskopa ili protočne citometrije.

Prije samog bojanja, u epruveti sam pomiješala 1 mL kompletnog medija DMEM i 1 mL pufera PBS. Toj smjesi sam dodala fluorescentne boje: 0,8  $\mu$ L Calceina AM, 3  $\mu$ L Propidijevog jodida i 0,5  $\mu$ L Hoechst 33342. Cijelu smjesu sam kratko protresla (vorteks LLG Labware) kako bi se sve komponente izmiješale. Na postojećih 50  $\mu$ L medija u bunariću dodala sam po 50  $\mu$ L pripremljene mješavine boja. Pločicu sam stavila na inkubaciju 60 min zaštićenu od svjetla te zatim slikala sferoide na fluorescencijskom mikroskopu EVOS Fluid Imaging system (Thermo Fischer Scientific). Slike sferoida na sva tri kanala (crveni, zeleni i plavi) preklopila sam u kombiniranu sliku pomoću programa FIJI (ImageJ v.1.54). Kvantifikaciju mrtvih stanica napravila sam analizom slika u crvenom kanalu, na način da sam sa svake slike izmjerila intenzitet crvenog obojenja na četiri nasumična vidna polja unutar sferoida, podatke prenijela u Excel i izračunala prosječni intenzitet crvenog signala tretiranih sferoida u odnosu na tretman otapalom.

#### 3.2.4. Izolacija RNA

Prije izolacije RNA, sakupila sam stanice iz svih bunarića držeći za to vrijeme pločice na ledu. Sam postupak sakupljanja provela sam 48 h nakon tretmana tako da sam pomoću mikropipete uklonila medij iz svih bunarića. Zatim sam u svaki dodala po 1 mL PBS pufera te pomoću plastične strugalice odvojila stanice od podloge. Dobivenu suspenziju stanica sam sakupila, pažljivo ju mikropipetom prenijela u prethodno označene epruvete te centrifugirala 5 min na 1200 x g (centrifuga 5415 D Eppendorf). Nakon centrifugiranja, supernatant sam pažljivo odlila u kanticu za otpad, a talog stanica zamrzнула u zamrzivaču do izolacije. Sferoide sam sakupila tako da sam mikropipetom izvukla cijeli volumen medija zajedno sa sferoidom iz bunarića. Cijeli sadržaj sam zatim prebacila u epruvetu od 15 mL, centrifugirala, odlila supernatant, a talog zamrzнула.

Prilikom vađenja iz zamrzivača, talog nisam odmrzavala već sam ga odmah resuspendirala u 500  $\mu$ L Nucleozola (Thermo Fisher Scientific) kako ne bi došlo do degradacije RNA. U svaku epruvetu sam potom dodala 200  $\mu$ L vode bez RNA-za, a sadržaj dobro protresla kako bi se sve komponente sjedinile. Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi, uzorke sam centrifugirala 15 min na 10000 x g. 700  $\mu$ L supernatanta u kojem se nalazi RNA sam pažljivo pipetom prenijela u čistu tubicu te zatim dodala 700  $\mu$ L izopropanola. Uzorke sam inkubirala 5 min na sobnoj temperaturi, a nakon centrifugiranja 10 min na 10000 x g, supernatant sam uklonila. Na talog RNA sam dodala 500  $\mu$ L 75% etanola i centrifugirala 3 min na 8000 x g. Postupak ispiranja u etanolu ponovila sam

2 puta, te konačno talog otopila u 20 ili 50  $\mu\text{L}$  vode. Cijeli postupak izolacije RNA, obavljala sam u digestoru. Koncentraciju i čistoću RNA izmjerila sam na spektrofotometru NanoPhotometer N50/N60 (Implen). Prije mjerenja, uređaj sam kalibrirala nanošenjem 1  $\mu\text{L}$  vode na površinu za nanošenje uzoraka.

### 3.2.5. Reverzna transkripcija

Za provedbu reakcije reverzne transkripcije, odnosno sinteze cDNA koristila sam komercijalni set *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Termo Fisher Scientific). Služeći se protokolom iz seta, napravila sam tako zvanu matičnu otopinu koja se sastoji od pufera za reverznu transkripciju (10x *RT Buffer*), smjese dNTP-a, smjese nasumičnih početnica (10x *RT Random Primers*) i enzima reverzne transkriptaze (*MultiScribe*). Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 25  $\mu\text{L}$  (Tablica 3) Prethodno sam u 6 epruveta od 0,2  $\mu\text{L}$  dodala određene volumene RNA mase 500 ng i vode (qH<sub>2</sub>O). Volumen RNA izračunala sam iz izmjerenih koncentracija, a volumene vode sam dobila oduzimanjem ukupnog volumena reakcijske smjese od volumena RNA. Na kraju sam u svaku od 6 epruveta dodala po 7,25  $\mu\text{L}$  pripremljene matične otopine. Epruvete sam postavila u uređaj za PCR (Applied Biosystems) koristeći program prikazan u Tablici 4.

**Tablica 3:** Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

KOMPONENTA	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )/ x 9
10X RT Buffer	2,5	22,5
25X dNTP Mix	1	9
10X Randome Primers	2,5	22,5
Reverzna Transkriptaza (MultiScribe)	1,25	11,25
Ukupni volumen= 17,75 $\mu\text{L}$ + 7,25 $\mu\text{L}$		

**Tablica 4:** Tablični prikaz programa po kojem je provedena reakcija reverzne transkripcije.

	Temperatura (°C)	Trajanje ciklusa (min)
Sparivanje početnica	25	10
Sinteza cDNA	37	120
Deaktivacija enzima	85	5

### 3.2.6. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

U svrhu analize relativne genske ekspresije gena *AR*, *KLK2* i *KLK3* (*PSA*) koristila sam metodu kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu qPCR. Reakcijska smjesa volumena 9  $\mu\text{L}$  sastojala se od 5  $\mu\text{L}$  boje SYBR Green (Biorad), uzvodne i nizvodne početnice (0,3  $\mu\text{L}$ ) te 3,4  $\mu\text{L}$  vode (qH<sub>2</sub>O). Kako bi u svakom uzorku omjer komponenti reakcijske smjese ostao jednak napravila sam matičnu otopinu za svaki ispitivani gen te pozitivnu (*RPLP0*) i negativnu kontrolu. Potom sam u svaku jažicu pločice za qPCR postavljene na hladni stalak dodala po 9  $\mu\text{L}$  matične otopine i 1  $\mu\text{L}$  svakog uzorka cDNA. Uzorke sam dodavala u duplikatima. Kao negativnu kontrolu koristila sam reakcijsku smjesu bez cDNA (Slika 11). Po završetku pipetiranja, na pločicu sam zalijepila prozirnu foliju kako uzorci ne bi isparili te je kratko centrifugirala u centrifugi za qPCR pločice (PlateFuge, Benchmark). Reakciju sam provela na uređaju Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad) koristeći program prikazan u Tablici 5. Radi jednostavnosti u prikazu rezultata i kasnijoj raspravi, svi rezultati za ekspresiju gena *KLK3* bit će izraženi kao *PSA*.

	MOCK1	LOV1	LOV5	MOCK2	SIM1						
<i>RPLP0</i>											
<i>AR</i>											
<i>PSA</i>											
<i>KLK2</i>											
								<i>ARP</i>	<i>AR</i>	<i>PSA</i>	<i>KLK2</i>
								NK	NK	NK	NK

**Slika 11:** Shematski prikaz pločice za qPCR.

Kratice: *RPLP0* – negativna kontrola, *AR*, *PSA* i *KLK2* – ispitivani geni, MOCK, LOV, SIM – uzorci, NK – negativna kontrola.

**Tablica 5:** Tablični prikaz programa po kojem je provedena qPCR reakcija.

	temperatura (°C)	trajanje ciklusa (s)	Broj ciklusa
početna denaturacija	95	30	1
denaturacija	95	10	40
sparivanje početnica i elongacija	61	30	
krivulja mekšanja	60-95		70 (0,5 °C/očitanju)

### 3.2.7. Statistička obrada podataka

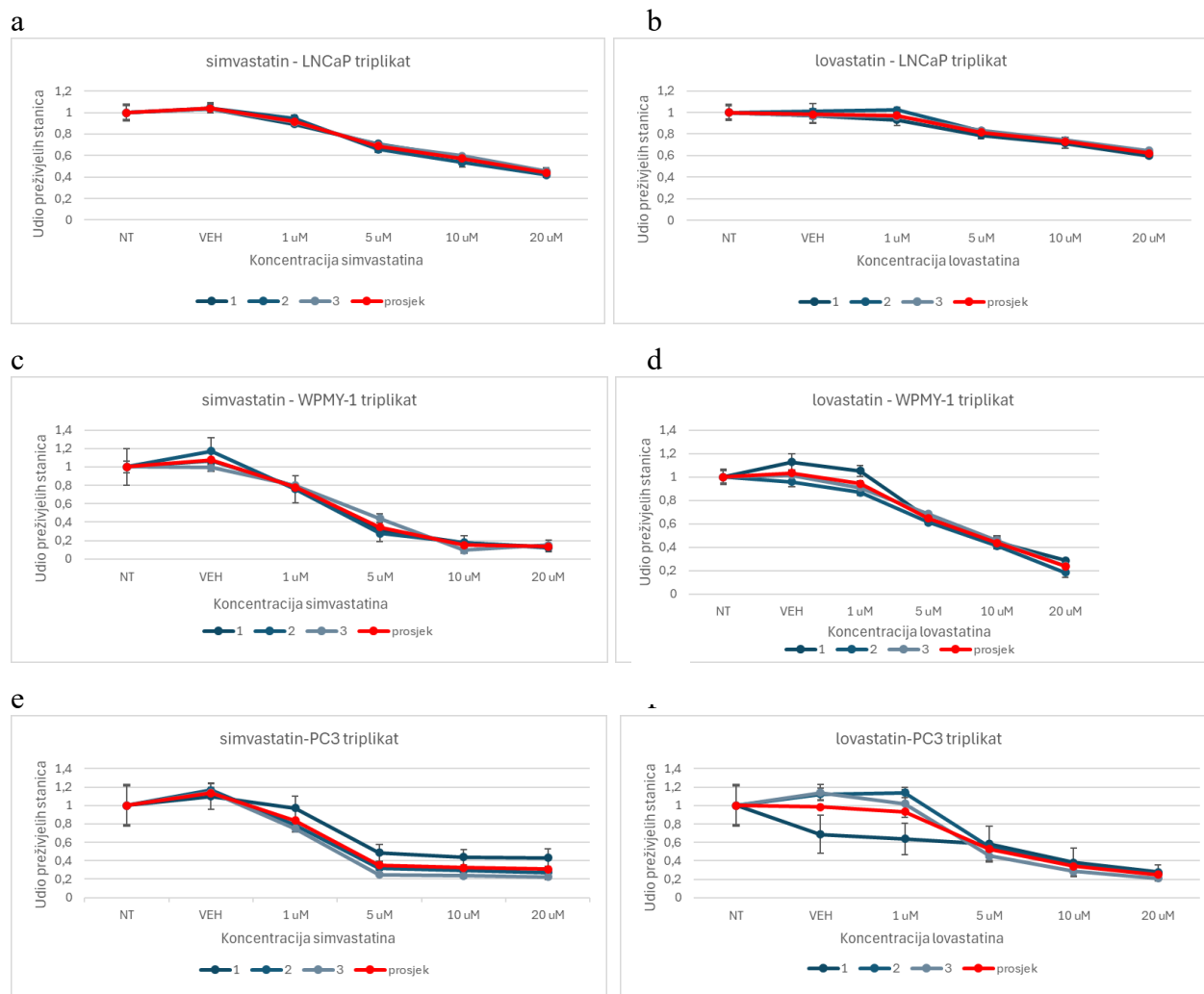
Kako bih odredila relativnu ekspresiju gena *PSA*, *AR* i *KLK2* koristila sam Studentov *t*-test, za ispitivanje razlika između dvije skupine uzoraka, a kako bih ispitala razliku između više skupina služila sam se ANOVA testom. Analizu sam napravila u programu MedCalc for Windows, v.22.021. Za određivanje osjetljivosti svake pojedine stanične linije koristila sam hi-kvadrat test. Sve *P*-vrijednosti manje od 0,05 smatrala sam statistički značajnima.



## 4. REZULTATI

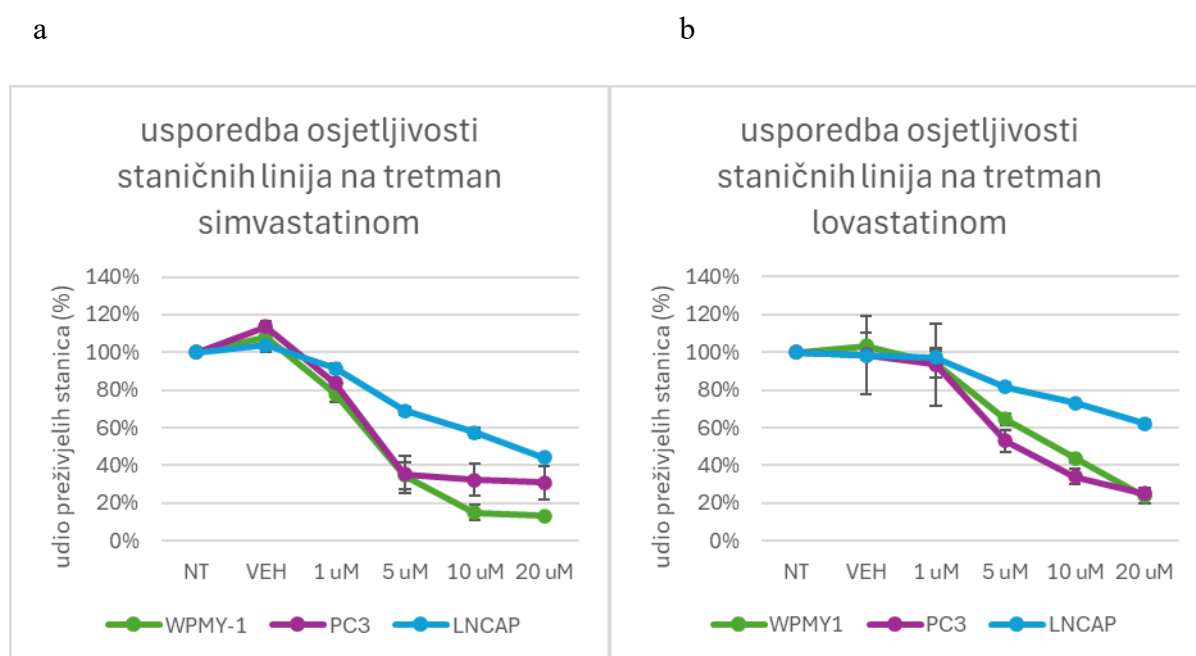
### 4.1. Analiza citotoksičnosti statina u staničnim linijama LNCaP, PC3 i WPMY-1

U svrhu određivanja citotoksičnosti simvastatina i lovastatina koristila sam se testom MTT. Stanične linije LNCaP, PC3 i WPMY-1 nasadene na mikrotitarske položice sa 96 bunarića tretirala sam sa 4 različite koncentracije simvastatina i lovastatina: 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M i 20  $\mu$ M. Eksperiment sam ponovila tri puta, a sve navedene doze terapeutika i kontrole napravljene su u tetriplikatima. Dobiveni rezultati su pokazali kako oba spoja smanjuju vijabilnost stanica u ovisnosti o koncentraciji te da se povećanjem koncentracije udio živih stanica smanjuje (Slika 12a-12f).



**Slika 12:** Krivulje preživljavanja za LNCaP, PC3 i WPMY-1 stanične linije tretirane 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M i 20  $\mu$ M simvastatinom i lovastatinom. Uzorci su inkubirani 24 h pri kontroliranim uvjetima. Crvenom krivuljom prikazana je prosječna vrijednost sva tri eksperimenta, a plavim udio preživjelih stanica nakon svakog pojedinog eksperimenta. Stanice koje pripadaju kontrolnoj skupini označene su sa VEH (od engl. *vehicle*). Točke prikazuju srednje vrijednosti +/- standardnu devijaciju tehničkog četriplikata.

Kako bih odredila optimalne doze kojima ću se koristiti u daljnjem eksperimentu izradila sam krivulje preživljavanja prikazane na Slici 13a i 13b. Iz priloženih grafova može se vidjeti kako je LNCaP najotpornija od ove tri korištene stanične linije. Pri 1  $\mu\text{M}$  koncentraciji simvastatina i lovastatina preživljava 80% stanica, dok se pri 5  $\mu\text{M}$  koncentraciji udio živih stanica smanjuje (Slika 13a i 13b). Koncentracija od 5  $\mu\text{M}$  određena je kao doza kod koje 50% stanica umre (LD50 doza), dok je 1  $\mu\text{M}$  koncentracija određena kao subletalna doza (doza kod koje 80% stanica preživi). Obje doze korištene su daljnjim tretmanima stanica.

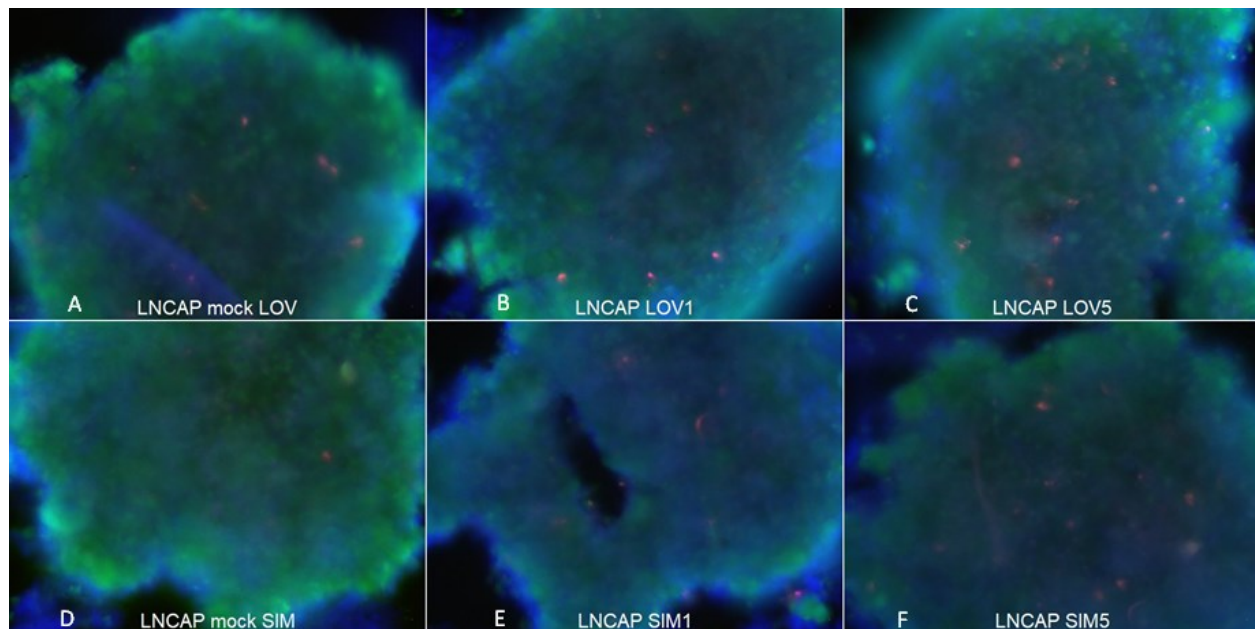


**Slika 13:** Usporedba osjetljivosti staničnih linija LNCaP, PC3 i WPMY-1 tretiranih 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom. Uzorci su inkubirani 24 h pri kontroliranim uvjetima. Plavom bojom je označena krivulja preživljavanja za LNCaP stanice, zelenom za WPMY-1, a ljubičastom za PC3 stanice. Stanice koje pripadaju kontrolnoj skupini označene su sa VEH. Točke prikazuju srednje vrijednosti +/- standardnu devijaciju bioloških triplikata.

## 4.2. Analiza vijabilnosti sferoida

Vijabilnost sferoida nakon tretmana provjerila sam pomoću komercijalnog seta za ispitivanje vijabilnosti živih i mrtvih stanica (Live-Dead Cell Viability Assay Kit). Kako bih odredila točan broj mrtvih stanica, izmjerila sam intenzitet crvenog fluorescentnog signala u četiri nasumična vidna polja unutar sferoida. Iz dobivenih sam podataka naposljetku izračunala intenzitet crvenog signala tretiranih sferoida u odnosu na netretirane.

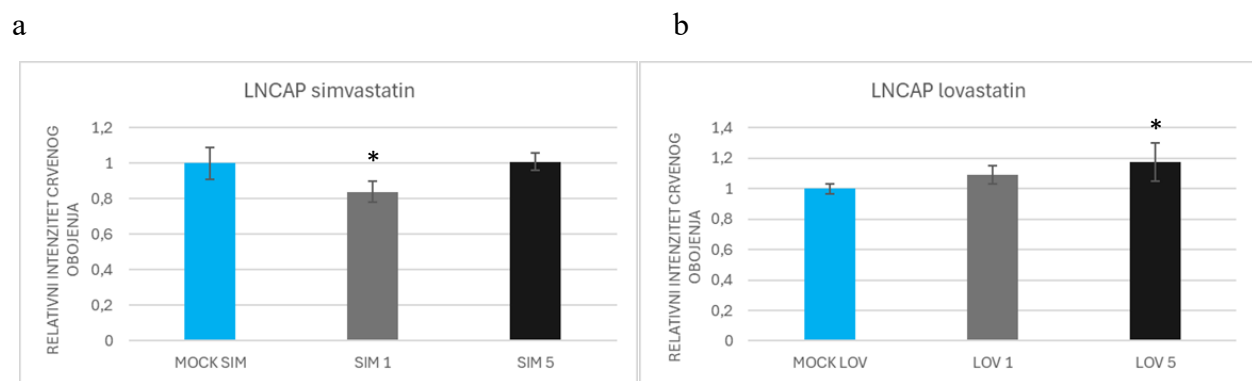
Nakon tretiranja 1  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom, stanice LNCaP preživljavaju, jer su vidljivi uglavnom zeleni signali živih stanica (Slika 14b i 14e). Povećanjem koncentracije, još uvijek prevladavaju zeleni signali, pa se tako može zaključiti kako stanice LNCaP uzgojene u 3D kulturi pokazuju rezistenciju na oba terapeutika (Slika 14c i 14f), što je u skladu s rezultatima u 2D uvjetima gdje se ova stanična linija pokazala najotpornijom.



**Slika 14:** Prikaz vijabilnosti stanica LNCaP uzgojenih u obliku sferoida nakon tretmana s 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom. Mrtve stanice obilježene su crvenim signalom, žive zelenim, a plavim sve stanice.

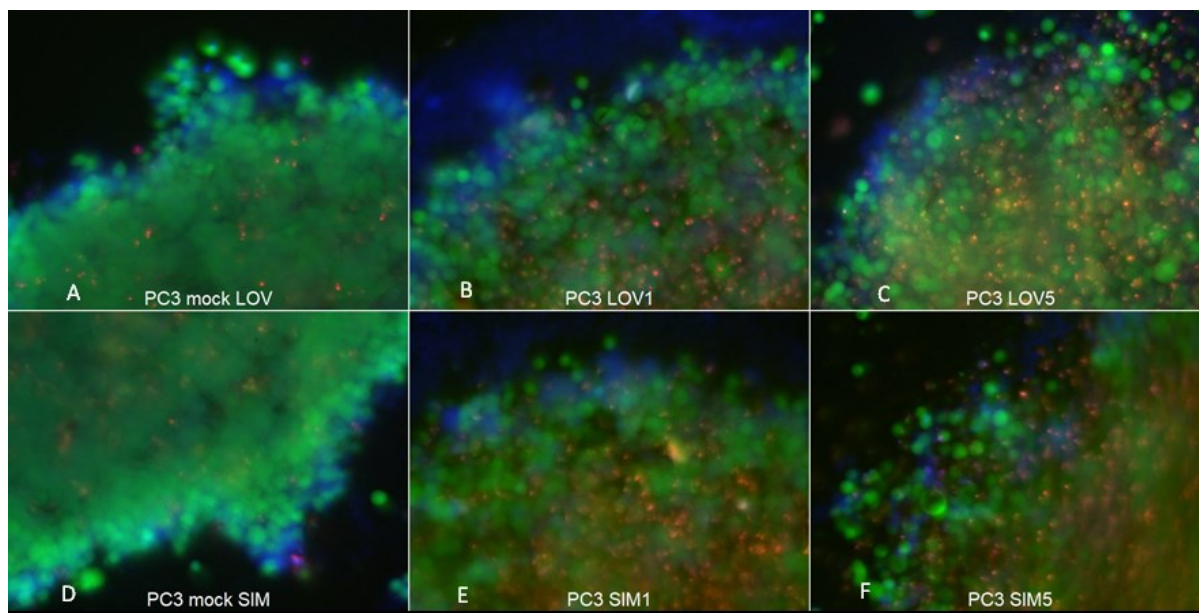
Kratice: MOCK- kontrolna skupina stanica, LOV i SIM- stanice tretirane 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom.

Na grafikonu prikazanom na Slici 15a jasno se može vidjeti kako stanice LNCaP tretirane 1  $\mu\text{M}$  simvastatinom pokazuju manji intenzitet crvenog signala u odnosu na netretirane stanice i one tretirane 5  $\mu\text{M}$  koncentracijom. Stanice tretirane 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom pokazuju pak isti intenzitet kao i netretirane stanice, pa se tako za ovu skupinu ne može dati jasan zaključak. Suprotno tome, broj mrtvih stanica nakon tretmana lovastatinom povećava se s povećanejm doze što znači da ovaj terapeutik pokazuje veću citotoksičnost od simvastatina. (Slika 15b).



**Slika 15:** Grafički prikaz relativnog intenziteta crvenog signala u staničnoj liniji LNCaP nakon tretmana a) simvastatinom i b) lovastatinom. Stupići predstavljaju srednju vrijednost +/- standardnu devijaciju. Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike, test ANOVA  $p=0,011$  za tretman simvastatinom i  $p=0,048$  za tretman lovastatinom.

Oba statina pokazala su se toksičnima za stanice PC3 tretirane 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom. Na Slici 16 (b i c) vidljivo je da se nakon tretmana s obje doze lovastatina udio mrtvih stanica povećava (crveni signali), a sličan rezultat dobiven je i nakon tretmana simvastatinom (Slika 16e i 16f).

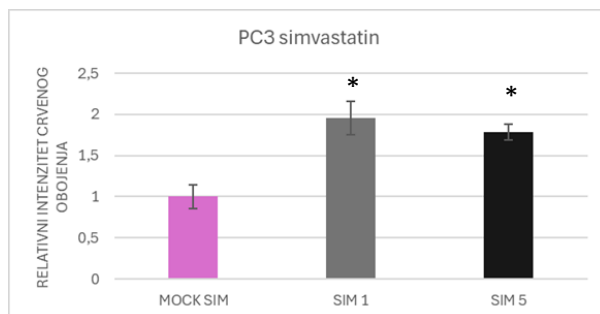


**Slika 16:** Prikaz vijabilnosti stanica PC3 uzgojenih u obliku sferoida nakon tretmana s 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom. Mrtve stanice obilježene su crvenim signalom, žive zelenim, a plavim sve stanice.

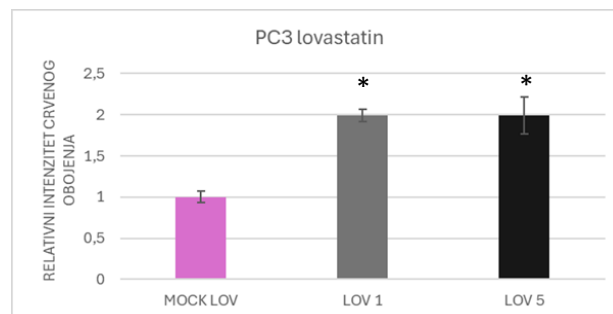
Kratice: MOCK- kontrolna skupina stanica, SIM i LOV – stanice tretirane 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom.

Ovaj zaključak dodatno potvrđuju grafikoni prikazani na Slikama 17a i 17b. Za PC3 stanice su oba statina pokazivala sličan učinak s obje korištene doze, sa značajnim povećanjem udjela mrtvih stanica unutar sferoida (Slika 17a i 17b).

a

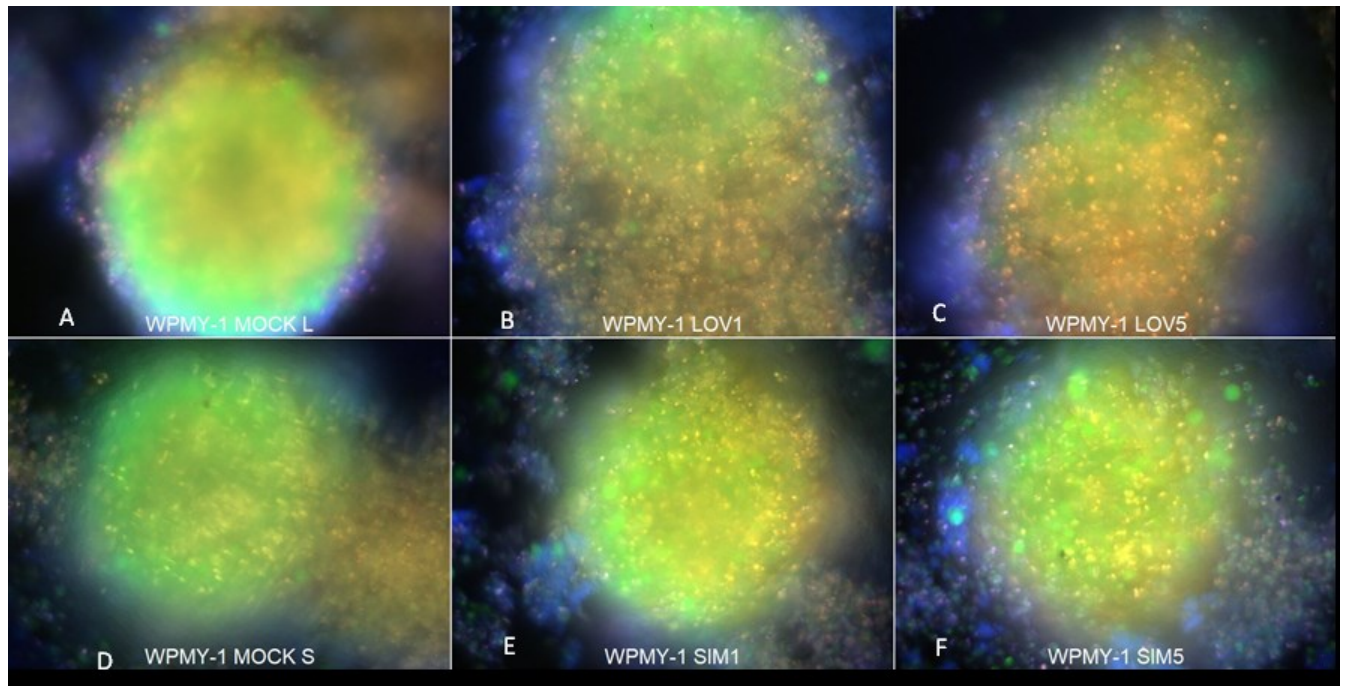


b



**Slika 17:** Grafički prikaz relativnog intenziteta crvenog signala u staničnoj liniji PC3 nakon tretmana a) simvastatinom i b) lovastatinom. Stupići predstavljaju srednju vrijednost +/- standardnu devijaciju. Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike, test ANOVA  $p < 0,001$  za tretman simvastatinom i  $p = 0,439$  za tretman lovastatinom.

Lovastatin je toksičan za stanice WPMY-1, međutim kod stanica tretiranih simvastatinom se broj mrtvih stanica ne razlikuje značajno između tretirane i netretirane skupine. Gledajući fluorescentne slike, to je vjerojatno posljedica prevelikog broja mrtvih stanica u kontrolnom tretmanu, jer je u njemu zabilježen neočekivano veliki broj crvenih točaka u odnosu na kontrolni tretman za lovastatin (Slika 18).



**Slika 18:** Prikaz vijabilnosti stanica WPMY-1 uzgojenih u obliku sferoida nakon tretmana s 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom. Mrtve stanice obilježene su crvenim signalom, žive zelenim, a plavim sve stanice.

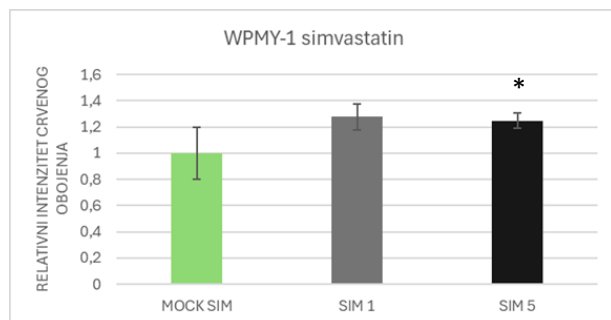
Kratice: MOCK- kontrolna skupina stanica, SIM i LOV – stanice tretirane 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  simvastatinom i lovastatinom.

Iz priloženih grafičkih prikaza mogu se donijeti slični zaključci. Stanice WPMY-1 nakon tretmana simvastatinom pokazuju veći intenzitet obojenja od kontrolnih stanica, ali ta razlika je značajna samo za višu dozu. U slučaju lovastatina nije moguće donijeti zaključke na temelju mjerenja intenziteta crvenog obojenja jer mjerenja pokazuju prevelike devijacije da bi bila značajna (Slika 19a i 19b). Zato će biti potrebno u budućim eksperimentima ponoviti bojanja i mjerenja sferoida stanične linije WPMY-1 na većem broju sferoida.

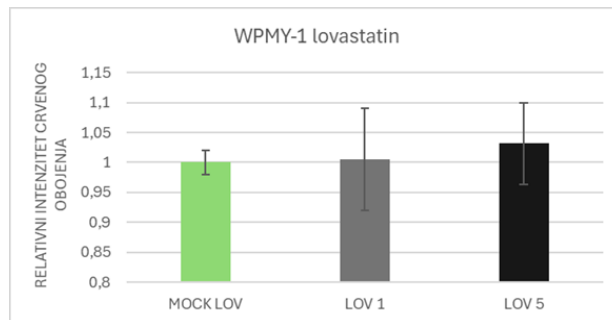
Uzimajući u obzir sve rezultate fluorescentnog bojanja sferoidnih kultura, možemo zaključiti da najveću osjetljivost pokazuje stanična linija PC3. Također možemo zaključiti da simvastatin i

lovastatin međusobno pokazuju slične rezultate na vijabilnost sferoidnih kultura, te da je odgovor na tretman u većini slučajeva ovisan o dozi, uz manja odstupanja.

a



b

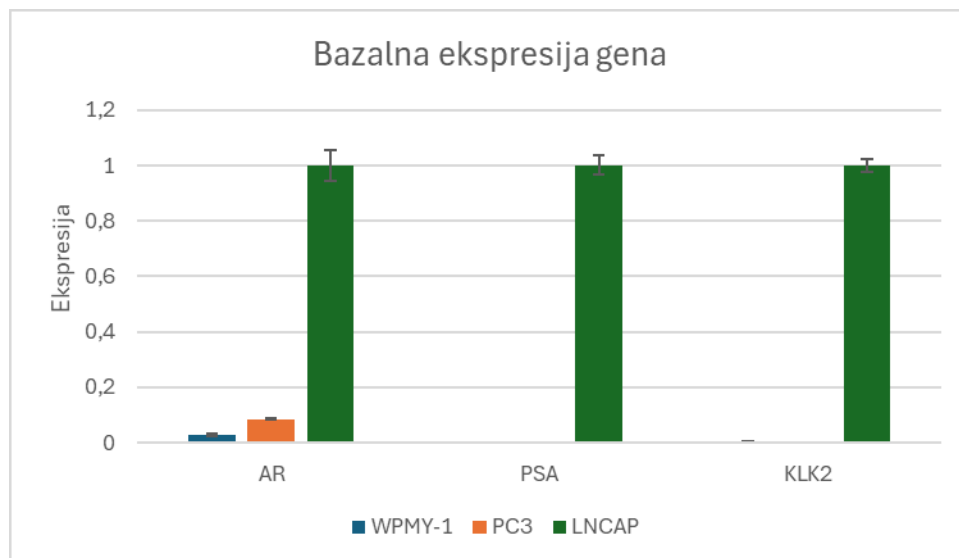


**Slika 19:** Grafički prikaz relativnog intenziteta crvenog signala u staničnoj liniji PC3 nakon tretmana a) simvastatinom i b) lovastatinom. Stupići predstavljaju srednju vrijednost +/- standardnu devijaciju. Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike, test ANOVA  $p=0,029$  za tretman simvastatinom i  $p=0,767$  za tretman lovastatinom.

### 4.3. Analiza ekspresije ciljnih gena

U svrhu određivanja relativne ekspresije gena *AR*, *PSA* i *KLK2*, izračunala sam relativnu ekspresiju pomoću formule  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , gdje sam kao referentni gen koristila ekspresija *RPLP0* a kao referentni uzorak stanice tretirane otapalom. Za statističku analizu dobivenih podataka koristila sam Studentov-*t* test, a cjelokupnu analizu rezultata napravila sam u programu MedCalc for Windows, v.22.021.

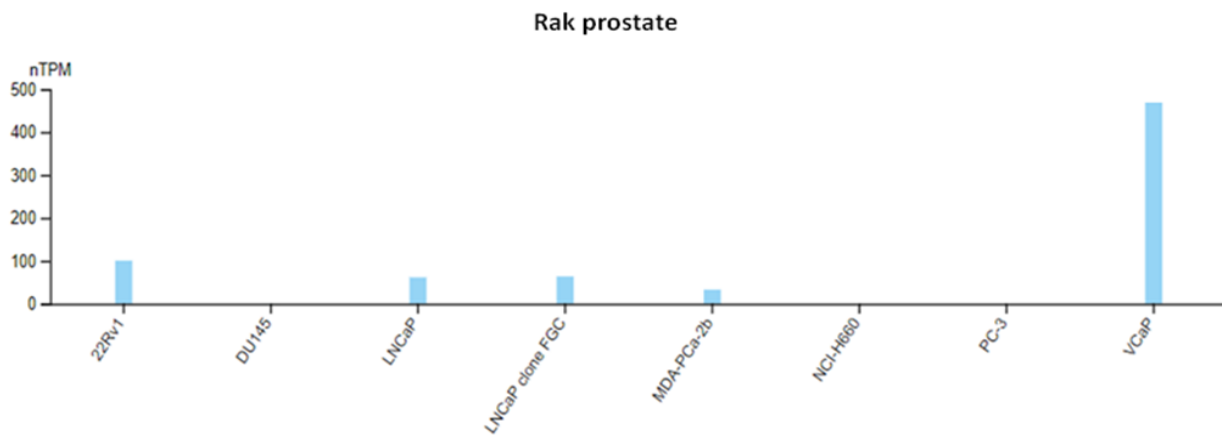
Prvo sam usporedila bazalnu ekspresiju gena *AR*, *PSA* i *KLK2* u sve tri stanične linije u 2D uvjetima rasta, i ustanovila da jedino stanična linija LNCaP pokazuje značajnu ekspresiju sva tri analizirana gena (Slika 20).



**Slika 20:** Bazalne ekspresije gena *AR* (androgeni receptor) *PSA* (antigen specifičan za prostatu) i *KLK2* (kalikrein 2) u adherentnim stanicama. Stupići predstavljaju srednju vrijednost +/- standardnu devijaciju.

Slika 21 prikazuje analizu ekspresije gena *AR* u nekoliko staničnih linija PCa dostupnu u bazi podataka The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), koja potvrđuje činjenicu da stanična linija PC3 ne eksprimira *AR*. Zbog toga se ostatak eksperimenata provodio na preostale dvije stanične linije, s naglaskom na staničnu liniju s najsnažnijom ekspresijom ciljnih gena, LNCaP.

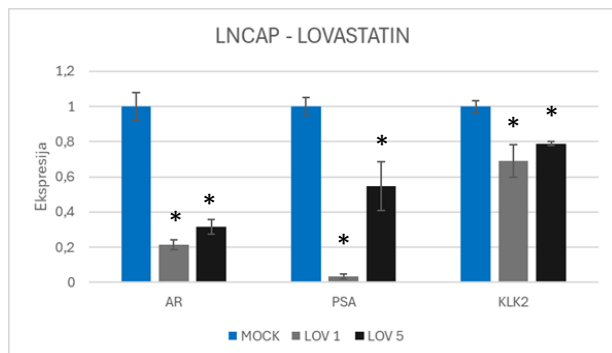




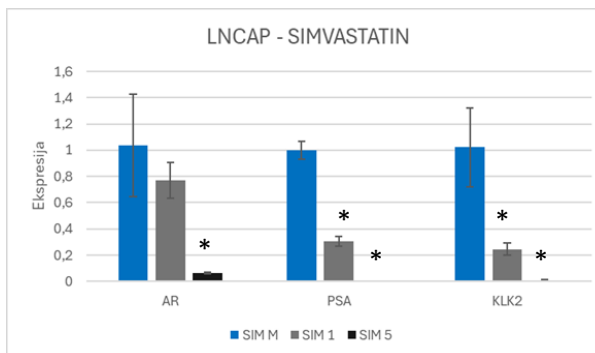
**Slika 21:** Grafički prikaz relativne ekspresije gena AR u različitim staničnim linijama ljudskog karcinoma prostate (Preuzeto i prilagođeno prema: The human protein atlas, 2023).

Iz rezultata analize ekspresije RNA može se vidjeti kako stanična linija LNCaP pokazuje značajno sniženu ekspresiju sva tri gena nakon tretmana statinima, s time da je učinak simvastatina jači na sva tri ispitivana gena od učinka lovastatina (Slika 22a i 22b). Stanična linija WPMY-1 ima promjenjenu ekspresiju gena nakon tretmana lovastatinom. Na Slici 23a se može vidjeti da 1  $\mu$ M lovastatin povećava ekspresiju gena AR, dok se ekspresija ostala 2 gena značajno smanjuje. Pri višoj dozi učinak je značajan na sva tri testirana gena, s tim da se gen PSA ne može detektirati nakon tretmana LD50 dozom lovastatina (Slika 23a). Tretman simvastatinom na staničnoj liniji WPMY-1 pokazuje neočekivani rezultat povećanja ekspresije AR i KLK2 pri višoj dozi spoja. Ovaj rezultat bi se trebao potvrditi s dodatnim dozama spoja i dodatnim ponavljanjima eksperimenta kako bi bio vjerodostojan, osobito jer se radi o slabo eksprimiranim genima u ovoj staničnoj liniji.

a

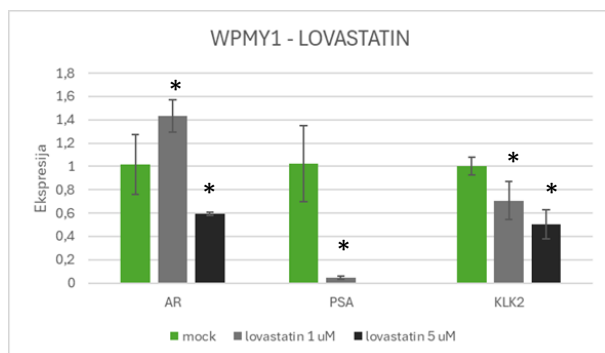


b

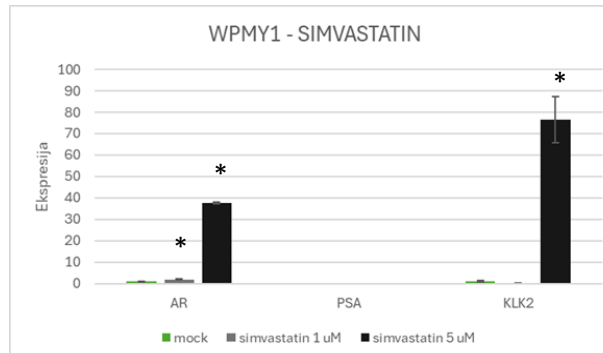


**Slika 22:** Relativne ekspresije AR (androgeni receptor) i njegovih ciljnih gena u staničnoj liniji LNCaP nakon tretmana lovastatinom i simvastatinom. Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike, test ANOVA  $p < 0,001$  (sva tri gena) za oba tretmana.

a



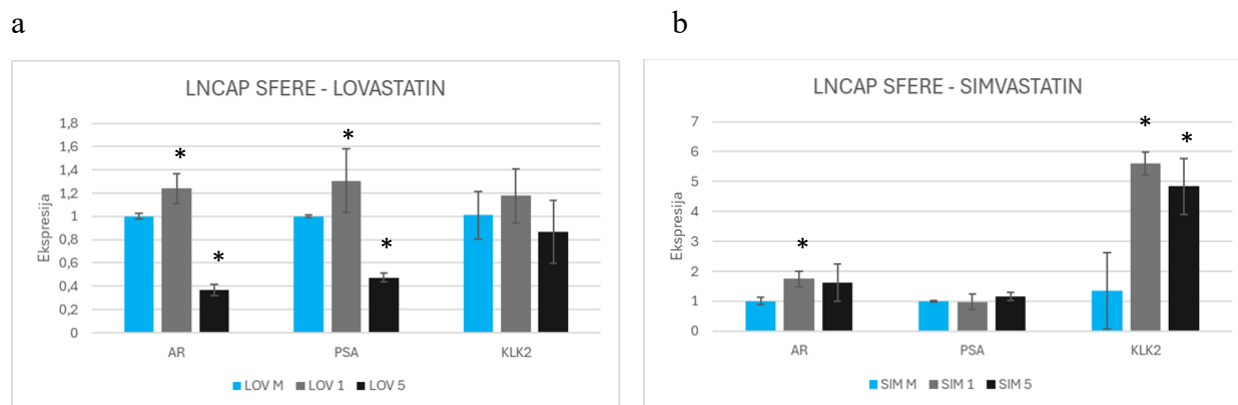
b



**Slika 23:** Relativne ekspresije AR (androgeni receptor) i njegovih ciljnih gena u staničnoj liniji WPMY-1 nakon tretmana lovastatinom i simvastatinom. Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike, test ANOVA  $p < 0,001$  (geni AR i PSA (antigen specifičan za prostatu)),  $p = 0,001$  (gen KLK2 (kalikrein 2)) za tretman lovastatinom i  $P < 0,001$  (geni AR i KLK2) za tretman simvastatinom.

Iz prethodno priloženih grafičkih prikaza može se uočiti kako oba statina smanjuju ekspresiju ciljnih gena u adherentnim stanicama. Ipak, isti rezultati nisu dobiveni i za 3D stanične kulture. U sferoidima LNCaP, ekspresija gena se povećava nakon tretmana nižim dozama lovastatina, a opada nakon tretmana višim dozama (Slika 24a). Trend je isti za sva tri testirana gena, s tim da su rezultati statistički značajni za *AR* i *PSA*.

S druge strane, nakon tretmana simvastatinom ekspresija *AR* i *PSA* uglavnom ostaje nepromijenjena ili se blago povećava (u slučaju *AR*), dok se izrazito povećava ekspresija *KLK2* s obje doze (Slika 24b). Za stanične linije WPMY-1 i PC3 nije bilo moguće očitati i izračunati ekspresiju ciljnih gena u 3D uvjetima, tako da ti rezultati nisu prikazani.



**Slika 24:** Relativne ekspresije gena u LNCaP sferoidima nakon tretmana lovastatinom i simvastatinom. Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike test ANOVA  $p < 0,001$  (geni *AR* (androgeni receptor) i *PSA* (antigen specifičan za prostatu)),  $p = 0,153$  (gen *KLK2* (kalikrein 2)) za tretman lovastatinom te  $p = 0,036$  (gen *AR*),  $p = 0,190$  (gen *PSA*),  $p = 0,001$  (gen *KLK2*) za tretman simvastatinom.

## 5. RASPRAVA

Statini se već desetljećima prepisuju za smanjenje razina kolesterola u serumu i rizika od kardiovaskularnih bolesti. Dulji niz godina statinima je posvećena posebna pažnja u istraživanjima zbog potencijalnih antitumorskih svojstava (Hou i Shao, 2022). Nedavno provedena pretklinička istraživanja dokazala su antineoplastični učinak statina na neke vrste tumora poput kolorektalnog karcinoma ili PCa (Katz, 2005). Epidemiološka istraživanja provedena na muškarcima s rakom prostate potvrdila su smanjenu progresiju i poboljšanje preživljavanja kod pacijenata koji su prethodno uzimali statine (Yokomizo i sur., 2022). Osim toga još je prije dokazano kako ovi lijekovi značajno smanjuju razine PSA u serumu, a pokazali su se i učinkovitima u postizanju osjetljivosti na ostale tumorske terapije (Yokomizo i sur., 2022; Zhu i sur., 2021). Iako su brojna istraživanja potvrdila uspjeh liječenja karcinoma statinima, njihova je uporaba u kliničkoj praksi još uvijek upitna. Kako bi se utvrdila njihova učinkovitost u onkološkoj primjeni, potrebno je provesti dodatna istraživanja s posebnim naglaskom na dozu i vrstu statina (Rimac i Zorc, 2015).

Prethodno je navedeno kako kolesterol povećava proliferacijsku sposobnost PCa stanica. Zahvaljujući svojoj sposobnosti da inhibiraju HMGCR, statini blokiraju sintezu kolesterola djelujući tako antiproliferativno na tumorske stanice. Rezultati testa MTT (Slika 13) dokazali su antiproliferativni utjecaj statina na sve tri stanične linije. Brojnost stanica WPMY-1 i PC3 značajno je pala nakon tretmana statinima, s time da je preživljenje od 50% postignuto već pri 2,5  $\mu\text{M}$  dozi simvastatina, dok se isti učinak na stanicama LNCaP uočava tek pri 15  $\mu\text{M}$  koncentraciji simvastiatina (Slika 13). Rezultati za tretman lovastatinom su slični, s time da su u slučaju lovastatina potrebne više doze (7,5  $\mu\text{M}$  i >20  $\mu\text{M}$ ) za isti učinak. Furuya i sur. (2016) procijenili su antiproliferativni učinak statina na stanične linije PCa pomoću testa MTS te izmjerili unutarstanične razine kolesterola nakon tretmana. Broj PC3 stanica značajno se smanjio u ovisnosti o dozi što potvrđuje smanjenje razina kolesterola nakon tretmana. S druge strane, stanice LNCaP nakon tretmana su ostale vijabilne što znači da se odupiru promjenama u unutarstaničnim razinama kolesterola (Furuya i sur., 2016). Doze koje su Furuya i sur. koristili u svom istraživanju više su od doza korištenih u ovom diplomskom radu, u rasponu između 10  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ , međutim moguće je da nisu direktno usporedive zbog razlike u korištenim testovima vijabilnosti (MTT u odnosu na

MTS). Dodatno, Kafka i sur. (2022.) su ispitali niz statina na staničnim linijama prostate LNCaP i PC3, te pokazali smanjenje vijabilnosti pri dozama od 5  $\mu$ M, i to na 80% u slučaju LNCaP i 40% u slučaju PC3, što je usporedivo s našim rezultatima.

Današnja istraživanja u velikoj mjeri koriste 3D stanične kulture za ispitivanje učinka različitih spojeva. Testiranje lijekova u 3D uvjetima omogućuje realističniji uvid u odgovor na lijek te bolje oponaša mikrookruženje tumora te njegovu fenotipsku heterogenost. Iako u literaturi za sada nema podataka o različitom utjecaju statina na 3D kulture tumora prostate, takva istraživanja provedena su za tumore dojke i gušterače (Paškevičiute i Petrikaite, 2017; Bytautaite i Petrikaite, 2020). U oba istraživanja autori su utvrdili slabiju aktivnost statina u 3D nego u 2D kulturama, a sličan rezultat dala su i druga istraživanja. (Manda i sur., 2020). Za potrebe ovog rada stanice tumora i fibroblasta prostate uzgajane su u 3D obliku kao višestanični sferoidi te su tretirane letalnim i subletalnim dozama statina. Stanična linija LNCaP najotpornija je na oba terapeutika i u ovim uvjetima rasta te tako tretirani sferoidi pokazuju gotovo jednak broj mrtvih stanica kao i oni netretirani što upućuje na slab antiproliferativni učinak statina u ovoj staničnoj liniji (Slika 15). S druge strane, stanična linija PC3 pokazuje dobar odgovor i u 3D uvjetima rasta, pa se tako može zaključiti da u oba uvjeta rasta tretman statinima potiče staničnu smrt (Slika 17). Ovakav učinak statina na staničnu liniju PC3 može se protumačiti činjenicom da su CRPC stanice (engl. *Castration-Resistant Prostate Cancer*) osjetljivije na tretman statinima od linija ovisnih o androgenu (Kim 2014; Kafka 2022). U skladu s ovim rezultatima također su rezultati Deezagi i Safari (2020), koji su uočili da statin rosuvastatin također inhibira formiranje sferoida stanične linije PC3. Osim toga, bitno je napomenuti kako postoji više načina praćenja učinka spojeva na stanice u 3D sferoidima, ali bojanje živih i mrtvih stanica daje najpreciznije rezultate (Mittler, 2017).

Hiperaktivacija AR pronađena je u mnogim staničnim linijama PCa, a sam receptor ima vrlo bitnu ulogu u patogenezi i napredovanju bolesti. Nakon vezanja hormona i kaskadne aktivacije signalnih puteva u citoplazmi, AR se translocira u jezgru gdje potiče ekspresiju gena (npr. *PSA*) koji reguliraju preživljavanje stanica. U lipidnim splavima, AR ulazi u interakciju s brojnim signalnim putevima uključenima u proliferaciju i preživljavanje stanica (Yang i sur., 2010). Osim toga, već je spomenuto kako AR može mijenjati ekspresiju nekih molekula uključenih u regulaciju homeostaze kolesterola čime dolazi do promjene u signalnim putevima ključnima za biosintezu

ove molekule (Guerrero-Ochoa i sur., 2024). Bazalna ekspresija *AR* i njegovih ciljnih gena određena je metodom qPCR-a. Samo stanična linija LNCaP pokazuje snažnu ekspresiju *AR*, dok je u staničnim linijama WPMY-1 i PC3 vrlo slaba, a često i ispod praga detekcije (u slučaju PC3). To je u skladu s poznatim podacima iz literature, te baze podataka The Human Protein Atlas, iz koje je vidljivo da stanična linija PC3 ne ekspresira *AR*. Stoga nije bilo moguće odrediti ekspresiju *AR* u stanicama PC3 nakon tretmana statinima, kao niti njegovih transkripcijskih meta *PSA* i *KLK2*. Za staničnu liniju fibroblasta prostate WPMY-1 nema puno literaturnih podataka, ali ne iznenađuje činjenica da je ekspresija *AR* u njima slaba, jer se radi o fibroblastima a ne stanicama epitelnog podrijetla. Zbog toga se ostatak rada temeljio na staničnoj liniji s dobrom ekspresijom *AR*, LNCaP. Stanična linija LNCaP pokazuje sniženu ekspresiju svih gena nakon tretmana statinima, s time da i na ovoj razini simvastatin pokazuje jači učinak od lovastatina (Slika 22). U slučaju fibroblastne linije WPMY-1, lovastatin također u većini slučajeva pokazuje smanjenje ekspresije ciljnih gena u ovisnosti o dozi, s izuzetkom povećanja ekspresije *AR* pri nižoj dozi lovastatina. Rezultati za tretman simvastatinom pokazuju neočekivano povećanje ekspresije *AR* i *KLK2* pri višim dozama (Slika 23b), te bi se trebali dodatno istražiti primjenom drugih doza i/ili statina. Yokomizo i sur. (2022) izvjestili su o djelovanju statina na ekspresiju gena *AR* i *PSA* nakon tretmana simvastatinom i mevastatinom. Analizom rezultata utvrđeno je kako oba statina smanjuju ekspresiju *PSA*, dok je ekspresija *AR* bila podjednaka u tretiranim i netretiranim stanicama. Ovakav rezultat upućuje na slabu transkripcijsku regulaciju *AR* ekspresije u tretiranim stanicama, dok se smanjena ekspresija *PSA* može objasniti činjenicom da je on reguliran transkripcijski i drugim faktorima, a ne samo *AR*-om. Suprotno ovim nalazima, istraživanje koje su proveli Yang i sur. (2010) dalo je drugačije rezultate. Naime, dokazano je kako lovastatin smanjuje ekspresiju *PSA* u LNCaP stanicama kao rezultat smanjene aktivnosti *AR*. Naši rezultati (Slika 22a) u skladu su sa studijom Yang i sur. jer se i u našem slučaju radi o smanjenju ekspresije *AR* i njegovih ciljnih meta *PSA* i *KLK2* u androgen-ovisnoj staničnoj liniji LNCaP. Za sve ove eksperimente bilo bi poželjno napraviti potvrdu rezultata i na razini proteinske ekspresije, međutim te analize nisu bile dio ovog diplomskog rada. S obzirom da je učinak statina u ovom diplomskom radu jači u staničnim linijama koje slabo ekspresiraju *AR*, možemo pretpostaviti da statini svoj učinak ne ostvaruju samo kroz regulaciju *AR* već i nekim drugim mehanizmom, što je u skladu s gore spomenutim rezultatima Yokomizo i sur. (2022).

Iako su statini uspješno smanjili ekspresiju gena *AR*, *PSA* i *KLK2* u adherentnim kulturama, stanice uzgojene u 3D uvjetima pokazuju slabiji ili čak suprotan odgovor na tretmane. Rezultati

eksperimenta provedenog na LNCaP sferoidima pokazali su povećanu ili nepromijenjenu ekspresiju gena nakon tretmana simvastatinom što ukazuje na rezistenciju (Slika 24). Tretman lovastatinom djelomično je u skladu s rezultatima na 2D kulturi, ali tek pri većoj dozi lovastatina, dok niža doza djeluje blago stimulatивно na ekspresiju *AR* i *PSA*. Sukladno ovim rezultatima, Bytautaite i sur. (2020) dokazali su veću aktivnost statina u adherentnim stanicama karcinoma dojke nego u istovrsnim 3D staničnim kulturama. Slično istraživanje provedeno je i na stanicama karcinoma gušterače, a rezultati su bili slični (Paškevičiute i Petrikaite, 2017). Pravilno doziranje statina je od velike važnosti, jer su i Caro-Maldonado i sur. (2018.) pokazali na mišjem ksenograft modelu tumora prostate da niske doze statina mogu povećati agresivnost tumora. Unatoč tome, sistematska meta-analiza literature pokazala je da je primjena statina u kombinaciji s terapijom ablacije androgena dovela do smanjenja rizika od smrtnosti od 27% te smanjenja rizika od smrtnosti od raka prostate od 35% kod muškaraca koji su primali navedenu terapiju (Jayalath i sur., 2022) Zanimljivo je da je u slučaju 3D kultura jači učinak na smanjenje ekspresije *AR* i njegovih ciljnih gena imao lovastatin, a ne simvastatin, i to pri višim dozama spojeva. Potreba za višim dozama u 3D kulturama ne iznenađuje, te bi se u budućim pokusima trebalo primijeniti više doze kako bi se potvrdili dobiveni rezultati. Međutim, bolji učinak lovastatina nad simvastatinom, koji je u 2D uvjetima pokazao slabiji učinak, ukazuje da bi se 3D modeli trebali intenzivnije koristiti prilikom pretkliničkih ispitivanja djelovanja lijekova. Mnogi lijekovi, koji su prethodno bili odbačeni u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima, mogli bi pokazati nove učinke prilikom testiranja na 3D in vitro modelima, te se u novije vrijeme sve više ispitivanja usmjerava prema korištenju starih lijekove za nove primjene (tzv. „*drug repurposing*“) (Pushpakom i sur., 2018).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju ovog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Sve tri stanične linije uspješno su uzgojene i tretirane u 2D i 3D uvjetima rasta.
2. Oba statina djeluju antiproliferativno na sve tri testirane stanične linije, s time da je učinak simvastatina nešto jači od lovastatina.
3. Stanična linija LNCaP pokazuje otpornost na simvastatin i lovastatin u 2D i 3D uvjetima rasta, dok je stanična linija PC3 najosjetljivija u oba uvjeta.
4. Stanična linija LNCaP pokazuje snažnu ekspresiju AR i njegovih ciljnih gena PSA i KLK2, dok je njihova ekspresija u WPMY-1 i PC3 slaba ili ispod razine detekcije.
5. Oba statina smanjuju ekspresiju gena AR, PSA i KLK2 u adherentnim stanicama LNCaP, s time da je učinak simvastatina jači od lovastatina.
6. U sferoidnoj kulturi LNCaP učinak statina na ekspresiju gena je općenito slabiji, ali u ovim uvjetima lovastatin pokazuje bolji učinak od simvastatina.



## 7. LITERATURA

American Cancer Society (2023) <https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/tests.html> (pristupljeno 8.9.2024).

Banerjee P. P., Banerjee S., Brown T. R., Zirkin B. R. (2018): Androgen action in prostate function and disease. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* 6(2): 62-77.

Barbalata C. I., Tefas L. R., Achim M., Tomuta I., Porfire A. S. (2020): Statins in risk-reduction and treatment of cancer. *World J. Clin. Oncol.* 11(8): 573-588.

Basak D., Gregori L., Johora F., Deb S. (2022): Preclinical and Clinical Research Models of Prostate Cancer: A Brief Overview. *Life.* 12(10): 1607.

Batth R., Nicolle C., Cuciurean I. S., Simonsen H. T. (2020): Biosynthesis and industrial production of androsteroids. *Plants.* 9(9): 1-12.

Beckwitt C. H., Brufsky A., Oltvai Z. N., Wells A. (2018): Statin drugs to reduce breast cancer recurrence and mortality. *Breast Cancer Res.* 20:144.

Beier A-M. K., Puhr M., Stope M. B., Thomas C., Erb H. H. H. (2023): Metabolic changes during prostate cancer development and progression. *J. Cancer Res. Clin.* 149(5): 2259-2270.

Biju T. S., Priya V. V., Francis A. P. (2023): Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostic: an update review. *Drug Deliv. Transl. Res.* 13(9): 2239-2253.

Blais J. E., Wei Y., Yap K. K. W., Alwafi H., Ma T.-T., Brauer R., Lau W. C. Y., Man K. K. C., Siu C. W., Tan K. C. B., Wong I. C. K., Wei L., Chan E. W. (2021): Trends in lipid-modifying agent use in 83 countries. *Atherosclerosis.* 328: 44-51.

Bonollo F., Thalmann G. N., Kruithof-de Julio M., Karkampouna S. (2020): The role of cancer-associated fibroblasts in prostate cancer tumorigenesis. *Cancers.* 12(7): 1-28.

Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., Jemal A. (2024): Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers and 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 74: 229-263.

Bytautaite M. i Petrikaite V. (2020): Comparative Study of Lipophilic Statin Activity in 2D and 3D in vitro Models of Human Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-231 and MCF-7. *Onco. Targets Ther.* 13: 13201-13209.

Cao Z., Yao J., He Y., Lou D., Huang J., Zhang Y., Chen M., Zhou Z., Zhou X. (2023): Association Between Statin Exposure and Incidence and Prognosis of Prostate Cancer: A Meta-analysis Based on Observational Studies. *Am. J. Clin. Oncol.-Canc.* 46(7): 323-334.

Caro-Maldonado A., Camacho L., Zabala-Letona A., Torrano V., Fernandez-Ruiz S., Zamacola-Bascaran K., Arreal L., Valcarcel-Jimenez L., Martin-Martin N., Flores J.M., Cortazar A.R., Zuniga-Garcia P., Arrubarrena-Aristorena A., Guillaumond F., Cabrera D., Faclon-Perez J.M., Aransay A.M., Gomez-Munoz A., Oliván M., Morote J., Carracedo A. (2017) Low-dose statin treatment increases prostate cancer aggressiveness. *Oncotarget.* 9(2):1494-1504.

Craig E.L., Stopsack K.H., Evergren E., Penn L.Z., Freedland S.J., Hamilton R.J., Allot E.H. (2022): Statins and prostate cancer- hype or hope? The epidemiological perspective. *Prostate cancer Prostatic Dis.* 25(4): 641-649.

Deezagi A. i Safari N. (2020): Rosuvastatin inhibit spheroid formation and epithelial–mesenchymal transition (EMT) in prostate cancer PC 3 cell line. *Mol. Biol. Rep.* 47: 8727-8737.

Duarte J.A., de Barros A.L.B., Leite E.A. (2021): The potential use of simvastatin for cancer treatment: A review. *Biomed. Pharmacother.* 6627: 3120-901.

Eidelman E., Twum-Ampofo J., Ansari J., Siddiqui M.M. (2017): The metabolic phenotype of prostate cancer. *Front. Oncol.* 7:131.

Fujita K., Nonomura N. (2019): Role of androgen receptor in prostate cancer. *World J. Men, Hlth.* 37(3): 288-295.

Furuya Y., Sekine Y., Kato H., Miyazawa Y., Koike H., Suzuki K. (2016): Low-density lipoprotein receptors play an important role in the inhibition of prostate cancer cell proliferation by statins. *Prostate Int.* 4(2):56-60.

Gann P. H. (2002): Risk Factors for Prostate Cancer. *Rev. Urol.* 4(5): 3-10.

Grolez G. P., Gordiendko D. V., Clarisse M., Hammadi M., Dersuelles E., Formont G., Prevarskaya N., Slomianny C., Gikka D. (2019): TRPM8-androgen receptor association within lipid rafts promotes prostate cancer cell migration. *Cell Death Dis.* 10(9):652.

Gurrero-Ochoa P., Rodriguez-Zapater S., Anel A., Esteban L.M., Camón- Fernández A., Espilez-Ortiz R., Gil-Sansz M.J., Borque-Fernando Á. (2024): Prostate Cancer and the Mevalonate Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 25(4): 2-21.

Haenszel W., Kurihara M. (1968): Studies of Japanese migrants I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 40: 43-68.

Hou Y. C. i Shao Y. H. (2022): The Effects of Statins on Prostate Cancer Patients Receiving Androgen Deprivation Therapy or Definitive Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pharmaceuticals (Basel).* 15(2):131.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2024) <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2021-godini/> (pristupljeno 8.8.2024.)

Jayalath V.H., Clark R., Lajkosz K., Fazelzad R., Fleshner N.E., Klotz L.H., Hamilton R.J. (2022) Statin use and survival among men receiving androgen-ablative therapies for advanced prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw. Open.* 5(11):e2242676

Kafka M., Gruber R., Neuwirt H., Ladurner M., Eder I.E. (2023): Long-Term Treatment with Simvastatin Leads to Reduced Migration Capacity of Prostate Cancer Cells. *Biomedicines.* 11(1): 2-18.

Katz M.S. (2005): Therapy Insight: potential of statins for cancer chemoprevention and therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2(2): 82-89.

Kim J.H., Cox M.E., Wasan K.M. (2014): Effect of simvastatin on castration-resistant prostate cancer cells. *Lipids Health Dis.* 13(1): 2-12.

Knuutila E., Riikonen J., Syvälä H., Auriola S., Murtola T. J. (2019): Access and concentrations of atorvastatin in the prostate in men with prostate cancer. *Prostate.* 79(12): 1412-1419.

Krycer J.R., Brown A.J. (2011): Cross-talk between the androgen receptor and the liver X receptor: Implications for cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 286(3): 20637-20647.

Lee S.H., Lee J.-H., Im S.-S. (2020): The cellular function of SCAP in metabolic signaling. *Exp. Mol. Med.* 52(5): 724-729. doi: 10.1038/s12276-020-0430-0

Litwin M.S., Tan H.-J. (2017): The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. *JAMA.* 317(24): 2532-2542.

Longo J., Hamilton R. J., Masoomian M., Khurram N., Branchard E., Mullen P. J. i sur. (2020): A pilot window-of-opportunity study of preoperative fluvastatin in localized prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 23:630-637.

Lv D., Hu Z., Lu L., Lu H., Xu, X. (2017): Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol. Lett.* 14(6): 6999-7010.

Lyu J., Yang E.J., Shim J.S. (2019): Cholesterol trafficking: An emerging therapeutic target for angiogenesis and cancer. *Cells.* 8(5): 2-11. doi: Lyu J., Yang E., Shim J. (2019): Cholesterol trafficking: An emerging therapeutic target for angiogenesis and cancer

Manda K., Juerß D. Fischer P., Schröder A., Koenen A., Hildebrandt A. (2020): Simvastatin treatment varies the radiation response of human breast cells in 2D or 3D culture. *Preclin. Stud.* 39:658-669.

McHugh J., Saunders E.J., Dadaev T., McGrowder E., Bancroft E., Kote-Jarai Z., Eeles R. (2022): Prostate cancer risk in men of differing genetic ancestry and approaches to disease screening and management in these groups. *Brit. J. Canc.* 126(10): 1366-1373.

Messner E.A., Steele T.M., Tsamouri M.M., Hejazi N., Gao A.C., Mudryj M., Ghosh P.M. (2020): The androgen receptor in prostate cancer: Effect of structure, ligands and spliced variants on therapy. *Biomedicines.* 8(10): 1-19.

Mittler F., Obeid P., Rulina A.V., Haguet V., Gidrol X., Balakirev M.Y. (2017): High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. *Front. Oncol.* 7:293.

Moya L., Walpole C., Rae F., Srinivasan S., Seim I., Lai J., Nicol D., Williams E.D., Clements J.A., Batra J. (2023): Characterisation of cell lines derived from prostate cancer patients with localised disease. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 26(3): 614-624.

Murray R. (2003): Harper's illustrated biochemistry. U: Mayes P. A., Botham K. M. (ur.) Cholesterol Synthesis, Transport and Excretion. Large Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publishing Division, str. 219-230.

Paškevičiūtė M. i Petrikaite V. (2017): Differences of statin activity in 2D and 3D pancreatic cancer cell cultures. *Drug Des. Devel. Ther.* 11: 3273-3280.

Paukner K., Lesná I.K., Poledne R. (2022): Cholesterol in the Cell Membrane- An Emerging Player in Atherogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 22(1): 533.

Petrić T., Sabol M. (2023): Let's Go 3D! New Generation of Models for Evaluating Drug Response and Resistance in Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 24(6): 5293.

Pushpakom S., Iorio F., Eyers P.A., Escott K.J., Hopper S., Wells A., Doig A., Guilliams T., Latimer J., McNamee C., Norris S., Sanseau P., Cavalla D., Pirmohamed M. (2018) Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discovery* 18:41-58.

Rawla P. (2019): Epidemiology of Prostate Cancer. *World J. Oncol.* 10(2): 63-89.

Rimac H. i Zorc B. (2015): Statini u prevenciji i liječenju zloćudnih bolesti. *Farm. Glas.* 71:151-158.

Shi Q., Chen J., Zou X., Tang X. (2022): Intracellular Cholesterol Synthesis and Transport. *Front. Cell Dev. Biol.* 10:819281.

Shimizu H., Ross R. K., Bernstein L., Yatani R., Henderson B. E., Mack T. M. (1991): Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los angeles County. *Br. J. Cancer* 63: 963-966.

Sun J.-X., Liu C.-Q., Zhong X.-Y., Xu J.-Z., An Y., Xu M.-Y., Hu J., Zhang Z.-B., Xia Q.-D., Wang S.-G. (2022): Statin Use and the Risk of Prostate Cancer Biochemical Recurrence Following Definitive Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Front. Oncol.* 12:887854.

Škara L., Huđek-Turković A., Pezelj I., Vrtarić A., Sinčić N., Krušlin B., Ulamec M. (2021): Prostate cancer- focus on cholesterol. *Cancers.* 13(18).

Tan M.H.E., Li J., Xu H.E., Melcher K., Yong E.-I. (2015): Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 3-23, 36(1).

Tanner M.J., Welliver Jr. R.C., Chen M., Shtutman M., Godoy A., Smith G., Mian B.M., Buttyan R. (2011): Effects of Androgen Receptor and Androgen on Gene Expression in Prostate Stromal Fibroblasts and Paracrine Signaling to Prostate Cancer Cells. *PloS One.* 6(1): e16027.

The Human Protein Atlas (2023) <https://www.proteinatlas.org/> (Pristupljeno: 18.9.2024).

van Bokhoven A., Varella-Garcia M., Korch C., Johannes W. U., Smith E.E., Miller H. L., Nordeen S. K., Miller G. J., Scott Lucia M. (2003): Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate.* 57(3): 205-25.

Wu X., Gong S., Roy-Burman P., Lee P., Čulig Z. (2013): Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocr. Relat. Cancer.* 20(4).

Xiao M., Xu J., Wang W., Zhang B., Liu J., Li J., Xu H., Zhao Y., Yu X., Shi S. (2023): Functional significance of cholesterol metabolism in cancer: from threat to treatment. *Exp. Mol. Med.* 55(9): 1982-1995.

Xu M., An Y., Liu C.-Q., Xu J.-Z., Zhong X.-Y., Zeng N., Sun J.-X., Xia Q.-D., Wang S.-G. (2022): Association of Statin Use with the Risk of Incident Prostate Cancer: A Meta-Analysis and systematic Review. *J. Oncol.*

Yang L., Egger M., Plattner R., Klocker H., Eder I.E. (2010): Lovastatin Causes Diminished PSA Secretion by Inhibiting AR Expression and Function in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Urol.* 77: 1508e1.-1508e7.

Yokomizo A., Shiota M., Kashiwagi E., Kuroiwa K., Tatsugami K., Inokuchi J., Takeuchi A., Naito S. (2011): Statins Reduce the Androgen Sensitivity and Cell Proliferation by Decreasing the Androgen Receptor Protein in Prostate Cancer Cells. *Prostate.* 71:298-304.

Zhang Z., Wang W., Kong P., Feng K., Liu C., Sun T., Sang Y., Duan X., Tao Z., Liu W. (2023): New insights into lipid metabolism and prostate cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 62(6).

Zhu P., Wang M., Chen Z., Yang L. (2021): Targeting the Tumor Microenvironment: A Literature Review of the Novel Anti-Tumor Mechanism of Statins. *Front. Oncol.* 11:761107.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14.6.2000. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila sam u Ogulinu gdje sam nastavila srednjoškolsko obrazovanje te sam 2019. godine završila opću gimnaziju. Iste godine upisala sam prediplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu gdje sam stekla akademski naziv sveučilišnog prvostupnika znanosti o okolišu. Nakon uspješne obrane završnog rada, upisala sam 2022. godine diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Tijekom studiranja bila sam aktivni član Udruge studenata biologije BIUS te sam dvije godine zaredom sudjelovala na Simpoziju studenata biologije u organizaciji udruge BIUS. Odradila sam dvije laboratorijske i stručne prakse, jednu na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, a drugu na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković gdje sam također nastavila i sa izradom diplomskog rada. Tijekom diplomskog studija volontirala sam na dvije popularno-znanstvene manifestacije „Tjedan mozga“ i „Noć biologije“. Godine 2024. imala sam priliku predstaviti temu svog diplomskog rada u obliku istraživačkog postera na 10. Slovenskom genetskom kongresu u Portorožu. Iste godine odradila sam i dvomjesečnu Erasmus plus stručnu praksu na Onkološkom inštitutu u Ljubljani gdje sam proučavala utjecaj radioterapije na aktivaciju tumorske vaskulature i infiltraciju imunoloških stanica.