

# Intraperitonealna hipertermalna kemoterapija s cisplatinom i kvercetinom u obradi Ehrlichovog ascitesnog tumora

---

Jurčić, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2010

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:217:973434>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno – matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

Željka Jurčić

**Intraperitonealna hipertermalna kemoterapija s  
cisplatinom i kvercetinom u obradi Ehrlichovog ascitesnog  
tumora**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, 2010.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF - a pod vodstvom Prof. dr. sc. Nade Oršolić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

*Najljepše zahvaljujem mentorici, Prof. dr. sc. Nadi Oršolić na predloženoj temi, stručnoj pomoći, savjetima i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svim članovima Zavoda za Animalnu fiziologiju koji su doprinijeli i pomogli izvođenju ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju i potpori koju su mi davali tijekom studija, te svojim prijateljima na moralnoj podršci.*

*I na kraju, hvala Josipu što je uvijek uz mene.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### INTRAPERITONEALNA HIPERTERMALNA KEMOTERAPIJA S CISPLATINOM I KVERCETINOM U OBRADI EHRLICHOVOG ASCITESNOG TUMORA

Željka Jurčić

Zavod za Animalnu Fiziologiju, Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,  
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Cilj istraživanja je bio procijeniti učinkovitost citostatika cisplatine i / ili imunomodulatora kvercetina sa i bez primjene hipertermije na miševe nositelje Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT - a) metodom preživljavanja životinja, određivanjem vijabilnosti tumorskih stanica, te diferencijalnom analizom stanica trbušne šupljine. Tumor smo prouzročili injiciranjem  $2 \times 10^6$  tumorskih stanica u trbušnu šupljinu miševa soja Swiss albino. U preventivnoj obradi miševima smo sedam i tri dana prije unosa tumorskih stanica *i.p.* injicirali pripravak kvercetina ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) te neposredno nakon unosa tumorskih stanica u trbušnu šupljinu  $2 \times 2 \text{ ml}$  fiziološke otopine zagrijane na  $37^\circ\text{C}$  ili  $43^\circ\text{C}$  te citostatik cisplatinu u dozi od  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  ili  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Rezultati ukazuju na sinergistički protutumorski učinak hipertermije, kemoterapije te imunoterapije s kvercetinom na miševe - nositelje EAT - a. Imunomodulacija kvercetinom te povećana toksičnost citostatika hipertermijom vjerojatno je mogući mehanizam protutumorske učinkovitosti. Kvercetin inhibira rast tumora, smanjuje toksičnost citostatika na zdrave stanice ne umanjujući njegovu toksičnost na tumorske stanice.

(60 stranica, 11 slika, 3 tablice, 37 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj Biološkoj knjižnici Prirodoslovno - matematičkog fakulteta, Marulićev trg 20 / II, 10 000 Zagreb

Ključne riječi: cisplatina, kvercetin, hipertermija, EAT, kemoterapija

Voditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Nenad Judaš

Doc. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Doc. dr. sc. Jasna Lajtner

Zamjena: Doc. dr. sc. Domagoj Đikić

Rad prihvaćen: 15.09.2010.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### **EFFECTS OF HYPERTHERMIA, CITOSTATIC CISPLATIN AND QUERCETIN ON EHRlich ASCITES TUMOUR**

Željka Jurčić

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

Roosevelt Square 6, 10 000 Zagreb

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of chemotherapeutic agents cisplatin and / or immunomodulators quercetin with / without hyperthermia in Ehrlich ascites tumour (EAT). We observed survey of animals, number of viable and dead tumour cells and differential analysis of immune and tumour cells in the peritoneal cavity. Tumours were induced by inoculation of  $2 \times 10^6$  tumour cells in the abdominal cavity of Swiss albino mice. Mice were treated *i.p.* with solution of quercetin ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 7 or 3 days before implantation of EAT cells. Immediately after implantation of EAT cells in the abdominal cavity, mice were treated two times with 2 ml of saline heated at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  or  $43 \text{ }^\circ\text{C}$  (hyperthermal treatment) and cytostatic cisplatin at doses of  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  or  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Final result analysis determined that hyperthermia, chemotherapy and immunotherapy with quercetin demonstrate synergistic antitumour effect on mice bearing EAT. Immunomodulation with quercetin increases toxicity of chemotherapeutic agents with hyperthermia, which is probable possible mechanism of antitumour efficacy. It appears that quercetin inhibits tumor growth, reduces the toxicity of chemotherapeutical agents on healthy cells without diminishing its toxicity on tumor cells.

(60 pages, 11 figures, 3 tables, 37 references, original in Croatian)

The thesis is deposited in the Central biological library, Marulić Square 20/II, Zagreb

Keywords: cisplatin, quercetin, hyperthermia, EAT, chemotherapy

Supervisor: dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Rewiewers: dr. sc. Nenad Judaš, Asst. Prof.

dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Asst. Prof.

dr. sc. Jasna Lajtner, Asst. Prof.

Substitute: dr. sc. Domagoj Đikić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 15.09.2010.

## POPIS KRATICA

**ATP** (engl. *adenosine 5' - triphosphate*) - adenzin - trifosfat

**CAT** (engl. *catalase*) - katalaza

**DDD** - diklorodifenildikloretan

**DDT** - diklorodifeniltrikloretan

**DNA** (engl. *deoxyribonucleic acid*) - deoksiribonukleinska kiselina

**EAT** (engl. *Ehrlich ascites tumour*) - Erlichov ascitesni tumor

**G - CSF** (engl. *granulocyte colony - stimulating factor*) - čimbenik poticanja granulocitnih kolonija

**GM - CSF** (engl. *granulocyte - macrophage colony - stimulating factor*) - čimbenik poticanja granulocitnih - makrofagnih kolonija

**GPX** (engl. *glutathione peroxidase*) - glutation peroksidaza

**GR** (engl. *glutathione reductase*) - glutation reduktaza

**GSH** (engl. *glutathione*) - glutation

**HPV** (engl. *human papiloma virus*) - humani papiloma virus

**Hsp** (engl. *Heat shock protein*) - protein temperaturnog stresa

**IL - 2** - Interleukin - 2

*i.p.* - intraperitonealno

**LDL** (engl. *low - density lipoprotein*) - lipoproteini male gustoće

**MHC** (engl. *major histocompatibility complex*) - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti

**Mca** - mamarni karcinom

**NF - κB** (engl. *nuclear factor - κB*) - jezgreni faktor - κB

**NK** (engl. *natural killer*) - stanice prirodni ubojice

**RNA** (engl. *ribonucleic acid*) - ribonukleinska kiselina

**SOD** (engl. *superoxide dismutase*) - superoksid dismutaza

**TAA** (engl. *tumour associated antigens*) - tumoru pridruženi antigeni

**TATA** (engl. *tumour associated transplantation antigens*) - tumoru pridruženi transplantacijski antigeni

**TGF** (engl. *transforming growth factor*) – transformirajući čimbenik rasta

**TNF** (engl. *tumour necrosis factor*) - faktor tumorske nekroze

**TSA** (engl. *tumour specific antigens*) - tumorski specifični antigeni

**TSTA** (engl. *tumour specific transplantation antigens*) - tumorski specifični transplantacijski antigeni

**VEGF** (engl. *vascular endothelial growth factor*) - vaskularni endotelni faktor rasta

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	8
<b>1.1. Tumor</b> .....	9
1.1.1. Nastanak i značajke tumora.....	9
1.1.2. Tumorska imunologija.....	12
<b>1.2. Kemoterapija</b> .....	15
1.2.1. Cisplatina.....	18
<b>1.3. Imunoterapija</b> .....	21
<b>1.4. Flavonoidi</b> .....	22
1.4.1. Kvercetin.....	26
<b>1.5. Hipertermija</b> .....	28
1.5.1. Kemoterapija i hipertermija.....	30
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	31
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	33
<b>3.1. Materijali korišteni u istraživanju</b> .....	34
3.1.1. Pokusne životinje.....	34
3.1.2. Ehrlichov ascitesni tumor.....	34
3.1.3. Citostatik cisplatina.....	34
3.1.4. Kvercetin.....	34
<b>3.2. Metode korištene u istraživanju</b> .....	35
3.2.1. Izlaganje miševa nositelja EAT - a kvercetinu, hipertermiji i cisplatini.....	35
3.2.2. Preživljavanje pokusnih životinja.....	36
3.2.3. Određivanje broja živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini.....	36
3.2.4. Diferencijalno određivanje broja stanica u peritonejskoj tekućini.....	36
<b>4. REZULTATI</b> .....	37
<b>4.1. Rezultati preživljavanja životinja</b> .....	38
<b>4.2. Rezultati određivanja broja živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini</b> .....	44
<b>4.3. Rezultati diferencijalnog određivanja broja stanica u peritonejskoj tekućini</b> .....	50
<b>5. RASPRAVA</b> .....	56
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	62
<b>7. LITERATURA</b> .....	64



## **1. UVOD**

## **1.1. TUMOR**

### **1.1.1. Nastanak i značajke tumora**

Tumor, neoplazma ili novotvorina označava skup promijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast. Riječ "tumor" na latinskom jeziku označava oteklinu uzrokovanu povećanjem tkiva ili organa zbog bujanja stanica ili otoka (edema) tkiva nastalog zadržavanjem tekućine ili krvarenja unutar tkiva. Danas se taj pojam u medicini uvriježio najviše kao oznaka za novotvorinu odnosno neoplaziju koja označava promjene na tkivu nastale abnormalnom proliferacijom stanica kao posljedica različitih unutarnjih i vanjskih čimbenika koji djeluju na organizam, čak i nakon prestanka njihova djelovanja.

Tumor nastaje na ograničenom mjestu u organizmu kao lokalno bujanje, poput kvрге, koja kad postane veća može prožimati tkivo ili organ. Novonastale stanice se od polaznih stanica razlikuju strukturno i funkcionalno, ali se u većini slučajeva može prepoznati od koje vrste stanica ili tkiva je nastao tumor. U osnovi, novotvorine nastaju kad se izgubi normalna regulacija kontrolnih mehanizama rasta stanice. Stanice većine tumora a pogotovo stanice zloćudnih tumora su veće od stanica zdravog tkiva, imaju veće jezgre s jače izraženim kromatinom te pokazuju veći broj mitozu i patološke mitotske figure. Ovo atipično bujanje tumorskih stanica ima širok spektar morfološkog izgleda od stanica koje su vrlo slične normalnim stanicama (mogu zadržati čak i primarnu funkciju) do onih koje uopće nisu slične stanicama tkiva iz kojeg su nastale. Tumor nastao u organizmu živi i razvija se kao samostalna tvorevina a s organizmom je povezan krvožilnim i limfnim sustavom, te živi kao parazit. Tumor raste neprestano do svoje smrti ili smrti domaćina. Tumorsko bujanje nema svrhu s gledišta organizma u kojem je nastao za razliku od regenerativnog bujanja tkiva.

Tumorska stanica je promijenjena stanica koja je prestala reagirati na normalne mehanizme regulacije rasta i koja se nastavlja neobuzdano i autonomno dijeliti tvoreći nakupinu tumorskih stanica klinički zamjetljivu kao tumor ili neoplazmu. Iako tumor potječe od jedne jedine stanice, njegov je nastanak obično dugotrajan proces nagomilavanja genskih promjena. Molekularni nedostatci koji pretvaraju normalnu stanicu u zloćudnu jesu nagomilane mutacije dijelova genoma koji su odgovorni za reprodukciju ili rast stanice. Promijenjeni su količina ili svojstva proteina čime se remeti nadzor nad staničnim dijeljenjem. Radi se o promjenama tri skupine gena. To su protoonkogeni, tumor supresor geni i geni koji provjeravaju i održavaju ispravnost DNA. Onkogeni su mutirani oblici normalnih gena

protoonkogeni čiji proizvodi potiču stanični rast. Mnogi protoonkogeni kodiraju proteine koji su karike u lancu reakcija kojima se prenose signali rasta od površine do jezgre stanice. Mutacije protoonkogeni mogu dovesti do stvaranja pretjeranih količina tih proteina, koji zatim potiču rast. Proizvodi tumor supresor gena uključuju se u lanac reakcija koji potiskuje diobu te sudjeluju u nadzoru popravka oštećenja DNA. Gubitak ili smanjenje funkcije tih gena dovodi do jače proliferacije stanica (Šamija i sur., 2004). Mnogi su tumori posljedica nedostatka ili pogrešne funkcije regulacijskih proteina kodiranih tim genima. Treća vrsta gena koji mogu biti odgovorni za zloćudnost jesu geni koji provjeravaju i održavaju ispravnost DNA, koja se tijekom udvostručavanja često narušava.

Uzroci nastanka tumora su mnogobrojni, a možemo ih svrstati u nekoliko skupina. To su izlaganje mutagenim i kancerogenim čimbenicima kao što su razne organske i anorganske tvari, UV i X zračenje; zatim infekcije virusima (HPV virus, virus hepatitisa B) ili bakterijama (*Helicobacter pylori*); te spontane mutacije čija se učestalost povećava sa starenjem. Navedeni uzroci ne djeluju uvijek sami u procesu nastanka tumora, već mogu djelovati međusobno sinergistički i u kombinaciji sa psihološkim i dobnim čimbenicima, te poremećajima imunološkog sustava.

Iako sve tumorske stanice imaju zajedničko porijeklo, one su ipak genski nestabilne i vrlo heterogene po svojim svojstvima. Uzrokom heterogenosti stanica tumora je različita dostupnost nutrijenata i kisika, količina otpadnih tvari, diferencijacija, te genetička nestabilnost uslijed smanjene vjernosti replikacije i popravka nesparenih i krivo sparenih baza, zatim smanjene učinkovitosti popravka oštećenja u DNA, te povećane učestalosti genskih mutacija i kromosomskih aberacija (translokacije, inverzije) i aneuploidija.

Da bi nakupina tumorskih stanica u tkivu, u obliku kuglice promjera 1 - 2 mm, mogla dalje rasti, nužno je da organizira vlastitu prokrvljenost radi dovođenja kisika i hranjivih tvari (Hausmann i Cooper, 2004). Stvaranje novih krvnih žila naziva se angiogeneza. Nove krvne žile u tumoru mogu nastati na dva načina. Jedan način nastanka krvnih žila je angiogeneza pomoću endotelnih prekursorskih stanica iz koštane srži. Drugi način je stvaranje krvnih žila iz već postojećih krvnih žila, a to su uvijek venule bez mišićnog sloja, nikad arteriole. Proces tumorske angiogeneze započinje hipoksijom, što je poticaj tumorskim stanicama i makrofagima za lučenje VEGF - a koji inducira sintezu proteaza i receptora važnih za širenje tumora u lokalna tkiva. Nakon toga slijedi razgradnja bazalne membrane venule koju potiču metaloproteinaze iz tumorskih stanica. Tada su stvoreni uvjeti za migriranje endotelnih

stanica i čimbenika angiogeneze prema tumoru, gdje stvaraju novu mrežu kapilara. Brzina rasta tumora ovisna je o brzini angiogeneze (Ban i sur.,2004).

Angiogeneza je važan čimbenik tumorskog rasta i u procesu metastaziranja (Folkman, 1990). Metastaziranje je proces prenošenja tumorskih stanica na drugo mjesto u organizmu putem krvi, limfe, šupljina organa i seroznih površina, kontaktom i implantacijom. Tumorske stanice prenesene na jedan od navedenih načina nastavljaju se dijeliti, te razviju sekundarni tumor, odnosno metastazu. Neki tumori skloni su stvaranju metastaza u određenim organima zbog povoljnog okoliša za rast ili cirkulatornih mogućnosti samog tumora. Stoga, adenokarcinom prostate redovito metastazira u kost, a melanom kože u mozak, crijevo i jetru.

Prema „ponašanju“ tumori se dijele na dobroćudne (benigne), granične (semimaligne) i zloćudne (maligne). Maligni tumori variraju u veličini, nisu oštro ograničeni, nepravilnog su oblika, rastu brzo i infiltrativno, meke su konzistencije i velike gustoće polimorfni stanica, pokazuju brojne mitoze i patološke mitotske oblike. Kod domaćina često stvaraju slabljenje organizma i gubitak na težini. Maligni tumori često recidiviraju što znači da se nakon liječenja ponovno pojavljuju na istom mjestu i vrlo često daju metastaze i šire se u okolinu, infiltrirajući se u okolno tkivo razarajući ga, dok benigni tumori ne daju metastaze u druge organe i ne infiltriraju se u okolno zdravo tkivo. Benigni tumori su u pravilu oštro ograničeni, kuglasti, učahureni i rastu ekspanzivno, što znači da se šire na sve strane jednolično te je sačuvan kuglast oblik tumora koji ravnomjerno potiskuje okolno tkivo. Mogu biti štetni za organizam zbog svoje veličine ili ako pritišću okolinu te ukoliko je njihova lokalizacija nezgodna (npr. tumori mozga i maternice). Semimaligni tumori ne metastaziraju, ali rastu infiltrativno zbog čega su slabo diferencirani od okolnog tkiva.

Naziv benignog tumora izvodi se iz vrste tkiva iz kojeg je nastao uz nastavak - oma, pa prema tome razlikujemo adenome (iz epitelnih stanica žlijezda), fibrome (iz vezivnog tkiva), lipome (iz masnih stanica), osteome (iz koštanog tkiva), leimiome (iz glatkih mišićnih stanica), itd.

Zloćudne novotvorine dijele se u dvije velike skupine. To su karcinomi i sarkomi. Karcinomi su zloćudne novotvorine epitelnog porijekla, a primjeri su adenokarcinom i hepatocelularni karcinom. Sarkomi su zloćudni tumori koji potječu iz mezenhima ili njegovih derivata, pa u toj skupini razlikujemo liposarkom, fibrosarkom, leimiosarkom. U maligne tumore se još ubrajaju zloćudne bolesti stanica krvotvornih organa, leukemije i limfomi.

Tumori mogu nastati iz više zametnih listića, te se nazivaju teratomi ako su benigni i teratokarcinomi ukoliko su maligni (Kumar i sur., 2000).

### **1.1.2. Tumorska imunologija**

Tumori na svojoj površini eksprimiraju razne antigene koji mogu izazvati imunosno odbacivanje tumora, a po svojim su svojstvima nalik na antigene tkivne podudarnosti. Oni su posebno važni jer mogu služiti kao teorijski cilj protutijelima ili senzibiliziranim limfocitima koji mogu izazvati lizu tumorske stanice. Tumorski antigeni mogu biti smješteni u jezgri, citoplazmi, na membrani, te mogu biti otpušteni u okoliš. Oni su odgovorni za proizvodnju blokadnih čimbenika koji uzrokuju imunološko pospješene rasta. Tumorski antigeni koji se pojavljuju u krvi mogu se iskoristiti pri postavljanju dijagnoze nekih tumora, kao i u procjeni tumorske mase tijekom praćenja bolesti.

Pod tumorskim antigenima pretpostavljaju se proizvodi mutiranih onkogeni i tumor supresor gena, proizvodi ostalih mutiranih gena, ali i pretjerano izražavanje proizvoda normalnih gena, te izražavanje proizvoda normalnih gena koji su inače potisnuti u većini normalnih tkiva.

Definirane su dvije vrste tumorskih antigena: tumorski specifični antigeni (TSA) i tumoru pridruženi antigeni (TAA). Oni mogu nastati zbog mutacije u tumorskim stanicama, koje zatim proizvode promijenjene stanične proteine. Tumorski antigeni (TSA ili TAA), koji mogu izazvati transplantacijsku reakciju odbacivanja tumora, nazivaju se transplantacijskim tumorskim antigenima (TSTA - tumorski specifični transplantacijski antigeni, odnosno TATA - tumoru pridruženi transplantacijski antigeni). Oni mogu služiti kao teorijski cilj protutijelima ili senzibiliziranim limfocitima koji mogu izazvati lizu tumorske stanice.

Tumorski specifični antigeni (TSA) se ne nalaze na normalnim stanicama, što znači da su isključivo vezani za tumorske stanice. To su antigeni tumora izazvanih kemijskim i fizičkim sredstvima, na primjer unošenjem u organizam ili utrljavanjem u kožu različitih karcinogenih sredstava (policiklički ugljikovodici, aromatski amini, azo - boje i nitrozospojevi) koja uzrokuju zloćudnu transformaciju mijenjajući strukturu i funkciju DNA i RNA. Tumori izazvani kemijskim sredstvima u pravilu eksprimiraju jake individualne tumorske antigene koji se uglavnom ponašaju kao transplantacijski, a specifičnost individualnih tumorskih antigena ne ovisi o kemijskom sredstvu kojim je tumor izazvan, kao ni o životinjskoj vrsti. Tumori izazvani fizičkim sredstvima pojavljuju se nakon djelovanja ionizirajućeg zračenja, ili nakon kroničnih mehaničkih ili toplinskih podražaja. Tumori te skupine nose individualne

tumorske antigene, ali su ti antigeni mnogo slabije imunogenični. U tumor specifične antigene svrstavaju se i antigeni tumora izazvani virusima koji se pojavljuju u tumora nakon infekcije virusom. Tumori izazvani virusima izražavaju tumorske antigene karakteristične za određeni virus.

Tumoru pridruženi antigeni (TAA) nisu novi domaćinu, nego se nalaze na nekim stanicama embrijskoga tkiva, na stanicama za vrijeme virusne infekcije, ili u normalnim stanicama ali u krajnje niskoj koncentraciji. Stoga razlikujemo:

- Onkofetalni tumorski antigeni koji se kao makromolekule normalno nalaze samo u embriju u ranoj fazi njegova života. Njihova je ponovna pojava često povezana s tumorom, što daje povod za razmišljanje da je dediferencijacija uzrokom neoplastične transformacije. Ti su antigeni vrlo slabo imunogenični.
- Onkogenični proteini su tumorski antigeni kodirani staničnim onkogenima, a pojavljuju se u brojnim tumorima. Vrlo su slični proteinima koji se nalaze u normalnim stanicama, ali u daleko manjim koncentracijama, a kodirani su protoonkogenima. Njihova pojava u većoj koncentraciji može potaknuti imunoreakciju.
- Tumorski antigeni karakteristični za histološku vrstu tumora su zajednički za većinu tumora koji imaju isto histološko podrijetlo (organospecifični tumorski antigeni). Ta je vrsta antigena značajka ljudskih tumora.

U obrani od tumora sudjeluju citotoksični T limfociti, NK stanice i makrofagi.

Citotoksični T limfociti uništavaju tumorsku stanicu tijekom izravnog dodira, a mehanizam ubijanja jednak je drugim oblicima stanične imunosti. Limfociti T CD8+ prepoznaju tumorske antigene predočene u sklopu molekula MHC - I. Brojni tumori slabo izražavaju MHC - I, što ograničava ulogu citotoksičnih limfocita. Senzibilizirani limfociti T u dodiru s antigenom otpuštaju niz tvari (citokini) koje imaju različite važne biološke učinke. Tumori ne izazivaju pojavu protuupalnih citokina i kemokina koji su potrebni za suradnju predočnih stanica i limfocita T specifičnih za antigen.

Stanice NK ubijaju tumorske stanice pri izravnom dodiru, ali bez prethodne senzibilizacije. Nakon što dođe u doticaj s tumorskom stanicom, stanica NK otpušta neke topljive čimbenike (perforine, lizolecitin, proteaze), koji uzrokuju lizu tumorske stanice. Stanica NK može se odvojiti od ubijene tumorske stanice i za nekoliko sati može uspješno

napasti novu tumorsku stanicu. Sve tumorske stanice nisu podjednako osjetljive na lizu posredovanu stanicama NK. Brojne su tvari koje potiču aktivnost stanica NK. Najvažniji je interferon koji ne povećava samo njihovo djelovanje, već djeluje i kao središnji regulator njihovih funkcija. IL - 2 također povećava njihovu aktivnost. Sve je raširenije mišljenje da je važna uloga stanica NK u sprječavanju nastanka i rasta primarnih tumora.

Protutumorska aktivnost makrofaga temelji se na litičkim enzimima i metabolitima reaktivnoga kisika i dušikova oksida. Makrofagi nose receptore za ulomak Fc protutijela, pa mogu posredovati u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima.

Dok su svi tumori uglavnom osjetljivi na efekte stanične imunosti, osjetljivost na protutijela slaba je i različita.

Unatoč postojanja protutumorske imunoreakcije tumori uspijevaju izbjeći imunosnoj obrani. Predloženo je nekoliko hipoteza koje objašnjavaju taj paradoks. To su slaba imunogeničnost tumorskih antigena ili nedostatno stvaranje molekula MHC - I, imunoselekcija, antigenska modulacija, nedostatak drugoga signala, otpuštanje antigena, "prošuljavanje" kroz imunosnu obranu te imunosna nereaktivnost tumorskih antigena (Andreis i sur., 2004).

## 1.2. KEMOTERAPIJA

Kemoterapija je naziv za sistemsko liječenje tumora različitim kemijskim tvarima prirodnog ili sintetskog podrijetla, koji se nazivaju citostatici. Citostatici, poznati još pod nazivima citotoksični lijekovi, antineoplastični i antitumorski lijekovi, su kemijski spojevi koji se koriste u terapiji tumora zbog svoje sposobnosti međudjelovanja s metabolizmom stanice, sprječavanjem rasta stanice inhibicijom enzimskih sustava, oštećivanjem stanične jezgre i kočenjem diobe stanice. U suvremenoj terapiji zloćudnih tumorskih bolesti danas se upotrebljava više od pedeset vrsta citotoksičnih lijekova koji su podijeljeni u nekoliko skupina. To su:

- **Alkilirajuća sredstva**

Alkilirajuća sredstva u kemijskoj strukturi imaju jednu ili više alkilnih skupina koje prenose na biološke sustave i oštećuju molekulu DNA stvarajući mostove između lanaca. To su vrlo reaktivni spojevi koji mogu stvarati kovalentne veze s nukleinskim kiselinama i proteinima, vežući se na DNA, najčešće na N - 7 gvanina ili rjeđe O - 6 gvanina te dovode do stvaranja mostova (adukata); ukriženog povezivanja lanaca i nastanka mutacija. Citotoksični učinci ovih lijekova temelje se na onemogućavanju transkripcije i replikacije DNA, ometanju metabolizma proteina i aktivnosti enzima. Oni imaju znatno veći učinak na brzo rastuće stanice koje zbog nastalih oštećenja i nemogućnosti popravka odlaze u smrt apoptozom. Predstavnici ove skupine su: dušikovi iperiti (ciklofosfamid, klorambucil, melfalan), alkilsulfonati (busulfan), derivati nitrozureje (karmustin, lomustin), etilenimini (trietilenmelamin, heksametilmelamin, tiofosforamid), metilmelamini, triazeni. Spojevi koji sadrže platinu po mehanizmu djelovanja slični su alkilirajućim spojevima. Najpoznatiji su cisplatina i karboplatina.

- **Antimetaboliti**

Antimetaboliti su sintetski lijekovi. Zbog svoje sličnosti s fiziološkim tvarima blokiraju stvaranje DNA, te na taj način sprečavaju rast tumorskih stanica i uzrokuju njihovo nepovratno oštećenje. Tumorske stanice su osjetljivije na djelovanje ovih lijekova zbog dokazanih metaboličkih razlika između normalnih i tumorskih stanica. Antimetaboliti su: analozi folne kiseline koji inhibiraju pretvaranje folne kiseline u tetrahidrofolnu kiselinu vežući se na aktivno mjesto enzima dihidrofolat reduktaze (metotreksat); analozi pirimidina (5 - flurouracil i citarabin); analozi purina (6 - merkaptopurin kao sumporni derivat



hipoksantina, tiogvanin, azatioprin - derivat 6 - merkaptopurina, fludarabin fosfat, pentostatin i kladribin). Ovi lijekovi djeluju specifično u S fazi staničnog ciklusa.

- **Protutumorski antibiotici**

Protutumorski antibiotici su inhibitori staničnog rasta. To su: antraciklini, aktinomicin, bleomicin, mitomicin, plikamicin.

- **Hormoni i srodni spojevi**

Tu pripadaju adrenokortikosteroidi, aminoglutetimidi, progestini, estrogeni i androgeni, antiestrogeni, analozi gonadotropnog hormona i nesteroidni antiestrogeni. Nemaju izravno citotoksično i citostatsko djelovanje, ali s obzirom da je za rast ovih tumora potrebna određena hormonalna aktivnost, korištenjem antagonističkih hormona može se inhibirati rast tih tumora. Najpoznatiji predstavnik antiestrogena je tamoksifen, a od nesteroidnih antiandrogena flutamid.

- **Sredstva biljnog porijekla**

Sredstva biljnog porijekla su biljni alkaloidi i njihovi derivati koji imaju različite učinke na stanične procese. Neki od njih narušavaju funkciju diobenog vretena, izazivajući depolimerizaciju tubulina ili njegovu pretjeranu stabilizaciju čime je spriječena mitozna. Radi toga se još nazivaju i metafaznim otrovima ili otrovima diobenog vretena. Neki od predstavnika ove skupine narušavaju funkciju kromatina, a drugi pak inhibiraju esencijalne enzime poput DNA topoizomeraze. Predstavnici ove skupine lijekova su vinblastin, vinkristin, vinorelbin i paklitaksel.

- **Modifikatori biološkog odgovora**

To su tvari koje djeluju na biološki odgovor bolesnika na bolest, a onda indirektno imaju antitumorsku aktivnost. Rekombinantna DNA tehnologija je učinila veliki napredak u prepoznavanju brojnih humanih proteina s jakim djelovanjem na funkciju i rast normalnih i tumorskih stanica. Tu pripadaju interferoni, interleukini, hematopoetski faktor rasta, eritropoetin, G - CSF (engl. Granulocyte colony-stimulating factor), GM - CSF (engl. Granulocyte - Macrophage Colony - Stimulating Factor), TNF (engl. Tumor necrosis factor) i različita monoklonska protutijela i tumorska cjepiva.

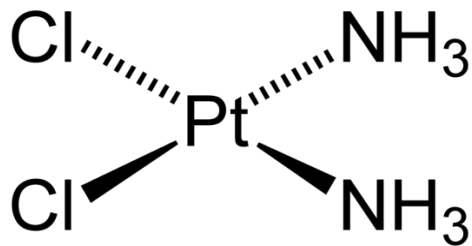
- **Miješani spojevi**

U skupini miješanih spojeva se nalaze spojevi s platinom, a predstavnici su cisplatina i karboplatina. Mehanizam djelovanja i spektar kliničke aktivnosti su jednaki kod oba, međutim postoji značajna razlika u kemijskoj strukturi, farmakokinetici i u toksičnom učinku. U miješane spojeve ubrajaju se još hidroksiureja, prokarbazin i mitotan. Hidroksiureja inhibira sintezu DNA, a da pritom ne remeti sintezu RNA niti bjelančevina. Ona specifično inhibira enzim ribonukleotid – difosfat - reduktazu koja katalizira pretvorbu ribonukleotid - difosfata u odgovarajući 2 - deoksiribonukleotid. Prokarbazin mora proći metaboličku aktivaciju da bi se stvorio citotoksični reaktant, koji metilira DNA. Metabolit prokarbazina može dovesti do kromosomskih oštećenja, uključujući kromatinske lomove i translokacije. Izlaganje prokarbazinu dovodi do inhibicije DNA, RNA i sinteze proteina *in vivo*. Mitotan se kemijski ponaša kao insekticidi DDT i DDD. Koristi se u liječenju neoplazmi kore nadbubrežne žlijezde.

Zbog sistemske primjene, citotoksičnost citostatika očituje se i na zdravim stanicama, što rezultira značajnim nuspojavama u bolesnika i u osoba koje su profesionalno izložene tim lijekovima. Oštećenje zdravih stanica, osobito onih koje se ubrzano dijele, rezultira supresijom koštane srži, mukozitisom, gubitkom kose. Zato je važno u terapiji citostaticima pronaći kompromis između koncentracija koje će uništiti stanice tumora a da se izbjegnu prevelika oštećenja zdravih stanica. Omjer između odgovora tumorskih stanica i normalnih stanica na dozu lijeka naziva se terapijski indeks. Smanjeni terapijski indeks ograničava upotrebljivost mnogih kemoterapijskih lijekova. Kako citostatici djeluju u pojedinim faza staničnog ciklusa, citotoksičnost ovisi u kojoj se fazi ciklusa nalazi stanica. Tkiva koja proliferiraju (koštane srži i sluznica probavnog sustava) najosjetljivija su na toksičnost citostatika (Brozović, 2007).

### 1.2.1. Cisplatina

Citostatik cisplatina, *cis* - diaminodikloroplatina(II), je žuta kristalinična krutina, slabo topiva u hladnoj vodi i netopiva u većini uobičajenih otapala, osim u N,N - dimetilformamidu. U vodenoj otopini polako prelazi u *trans* izomer, kod kojeg izostaje farmakološki učinak. Raspada se na 270 °C prilikom čega emitira vrlo toksične pare klora i dušikovog oksida.



Slika 1. Strukturna formula cisplatine

(Slika preuzeta sa Internet stranice: [www.cancergrace.org](http://www.cancergrace.org))

Cisplatinu je prvi put sintetizirao Michael Peyrone 1844. godine, a protutumorska svojstva cisplatine zabilježio je Barnett Rosenberg kao rezultat njegovih istraživanja o utjecaju električnog polja na rast bakterija. Danas je cisplatina jedan od najuspješnijih lijekova trenutno korištenih u kliničkoj terapiji tumora (Cepeda i sur., 2007). Koristi se za liječenje mnogih vrsta tumora, kao što su tumor testisa, vrata maternice, jajnika, urinarnog sustava, pluća, jednjaka, tumora vrata i glave, te melanoma (Fuentes i sur., 2002). Cisplatina selektivno inducira apoptozu u stanicama tumora vezanjem za DNA. Ipak, podliježe mnogim neselektivnim reakcijama s raznim biomolekulama kao što su proteini i fosfolipidi. Cisplatina se brzo distribuira tijelom reagirajući sa zdravim i kanceroznim tkivom. Ima antiproliferativni učinak.

Vežanje cisplatine na genomsku DNA u staničnoj jezgri je glavni događaj odgovoran za protutumorski učinak cisplatine. Oštećenja uzrokovana vezanjem cisplatine na DNA mogu inhibirati transkripciju i replikaciju. Navedene izmjene u obradi DNA okidaju citotoksične procese koji vode staničnoj smrti.

Kada se cisplatina primjeni intravenozno, brzo difundira u tkiva i veže se na proteine plazme, što je rezultat jake reaktivnosti platine i sumpora tiolnih skupina aminokiselina kao što je cistein. Čak 90 % cisplatine u krvi se veže na albumin i ostale proteine plazme što

dovodi do inaktivacije velikog broja molekula cisplatine. Da bi se cisplatina mogla vezati na DNA potreban je gubitak kloridnih liganada. U izvanstaničnom prostoru koncentracija kloridnih iona je oko 100 mM, a unutar stanice je između 2 - 30 mM pa tu dolazi do aktivacije cisplatine. Molekule vode zamijene oba kloridna liganda pri čemu nastaju  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$  i  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  kationi. Mono i diakvo vrste platine su vrlo reaktivne prema nukleofilnim centrima biomolekula jer je voda mnogo jača odlazna skupina od kloridnog iona. Biokemijski mehanizmi prelaska cisplatine u stanicu su još nerazjašnjeni. Pretpostavlja se da je pasivna difuzija glavni način ulaska cisplatine u stanicu, iako postoji mogućnost prijenosa putem proteina (Jamieson i Lippard, 1999).

Prilikom prelaska stanične membrane centar cisplatine može koordinirati neke supstituente lipidnog dvosloja, koji sadrže atome dušika i sumpora uključujući fosfolipide i fosfatidilserine. U citoplazmi mnoge stanične komponente koje imaju nukleofilna mjesta kao što su mikrofilamenti citoskeleta, peptidi koji sadrže tiole, proteini i RNA, mogu reagirati sa cisplatinom. Samo 5 - 10 % kovalentno vezane cisplatine u stanici vezano je na DNA, a ostalih 75 - 85 % vezano je na proteine i druge stanične komponente (Cepeda i sur., 2007; Fuertes i sur., 2002).

Genomska DNA je glavna meta cisplatine. Osim sa genomskom DNA cisplatina stvara velik broj adukata s mitohondrijskom DNA, te je čini potencijalno važnom farmakološkom metom cisplatine. N7 atom guanina i adenina su najdostupnija i najreaktivnija nukleofilna mjesta za vezanje cisplatine na DNA. Cisplatina može formirati s DNA razne strukturno različite adukate. Vezanje cisplatine na DNA počinje formacijom monofunkcionalnog *cis* -  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]:\text{DNA}$  adukta, ali reakcija većinom ide dalje stvarajući *cis* -  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]:\text{DNA}$  bifunkcionalne adukate, takozvane unutarlančane unakrsne veze, koje blokiraju replikaciju i/ili sprječavaju transkripciju (Cepeda i sur., 2007; Fuertes i sur., 2002). Na stvaranje adukata DNA je najosjetljivija tijekom diobe kada su lanci DNA nespreni i podložniji alkiliranju. Iz tog razloga citotoksičnost cisplatine je najizraženija na tumorskim stanicama koje su u fazi diobe mnogo češće nego zdrave stanice.

Kako je cisplatina citotoksična za sve stanice u diobi, tako je osim za tumore toksična i za sve zdrave stanice i tkiva koje se intenzivno dijele, a to su stanice koštane srži, sluznica i epitela. Radi toga su nuspojave kemoterapije cisplatinom anemija, oslabljen imunološki sustav, opadanje kose. Cisplatina uzrokuje ozbiljne nepovoljne učinke kao što su akutno otkazivanje bubrega jer se cisplatina uglavnom izlučuje urinom pa tkivo bubrega sadrži veću koncentraciju cisplatine nego ostala tkiva. Najvažnije područje morfološkog oštećenja je S3

segment proksimalnog tubula. Kako cisplatina stimulira proizvodnju reaktivnog kisika u epitelnim stanicama, oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi nefrotoksičnosti uzrokovanoj cisplatinom (Lau, 1999). Učestalo dijeljenje stanica jetre, a i prerađivanje cisplatine u jetri čini cisplatinu izuzetno toksičnom za jetru. Akumulacija cisplatine u središnjem živčanom sustavu uzrokuje citotoksična oštećenja, što rezultira perifernom neuropatijom, fokalnim cerebralnim poremećajem, kortikalnom sljepoćom i napadajima.

Navedene nuspojave, kemijska inkompatibilnost sa drugim lijekovima simultano korištenim u polikemoterapiji, stjecanje otpornosti, a i ograničeno otapanje u vodi čime je nezgodna za intravenozni tretman, ne čini cisplatinu idealnim i uvijek učinkovitim lijekom (Cepeda i sur., 2007).

Rezistencija na cisplatinu uzrokovana je smanjenom akumulacijom lijeka zbog vezanja na razne biomolekule, pojačan popravak oštećenja DNA uzrokovanih aduktima cisplatina - DNA izrezivanjem nukleotida. Neki tumori kao što su kolonorektalni i ne - mali stanični tumori pluća imaju unutarnju rezistenciju na cisplatinu, dok tumor jajnika i testisa i mali tumor pluća stječu otpornost nakon početnog tretmana (Cepeda i sur., 2007; Fuertes i sur., 2002; Jamieson i Lippard, 1999).

Promatrana je i citotoksična aktivnost trans izomera cisplatine koji pokazuje slabu citotoksičnu aktivnost u *in vitro* uvjetima, te izostanak iste u *in vivo* uvjetima. *Cis* - i *trans* - platina vežu se na DNA gotovo isključivo vezanjem na N7 dušikov atom purinske baze sa većim afinitetom za guanin nego za adenin. S biokemijskog gledišta nedostatak farmakološke aktivnosti *trans* - platine može biti povezano sa stvaranjem različitih tipova DNA adukata. Uslijed steričkih razloga *trans* - platina nije u mogućnosti formirati 1,2 - unutarlančane adukate između dva susjedna purina na istom DNA lancu. *Trans* - platina uglavnom formira 1,3 - unutarlančane adukate. Pretpostavlja se da 1,2 - unutarlančani DNA adukt, koji savija dvostruku uzvojniju prema glavnom utoru je odgovoran za citotoksičnost cisplatine, iako to nije potvrđena činjenica. Popravak izrezivanjem nukleotida popravljiva 1,3 - unutarlančane adukate s većom učinkovitošću od 1,2 - unutarlančanih adukata (Cepeda i sur., 2007).

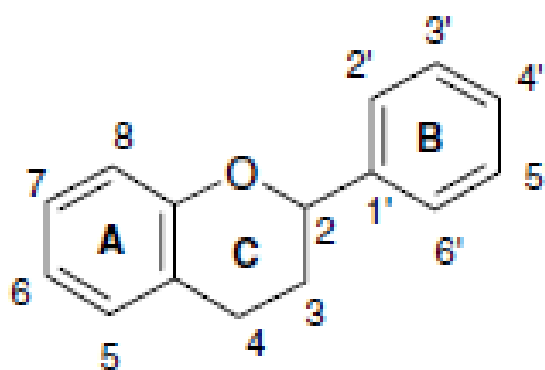
Većina molekula cisplatine ima veći afinitet za vezanje proteina od DNA što također ima ulogu okidanju putova programirane stanične smrti. Također su zabilježeni nekroza i slučajna stanična smrt kod zakazivanja ukupne stanične mašinerije.

### 1.3. IMUNOTERAPIJA

Imunoterapija je imunološka metoda kojom se nastoji potaknuti i pojačati imunoreakcija kako bi se uništile tumorske stanice koje su izvan dometa kirurškog liječenja, zračenja ili kemoterapije (Turić i sur., 1996). Iako je prirodna imunosna reakcija na tumor vrlo slaba, ipak mnoge tvari, koje nazivamo modifikatorima biološke reakcije (imunomodulatorima), mogu pojačati specifičnu i nespecifičnu reakciju organizma na tumor. Te tvari nisu izravno citotoksične za tumorske stanice, ali pojačavanjem i pospješivanjem protutumorske obrane ili povećanjem tolerancije organizma na klasične citostatike i zračenje, sprječavaju rast i uništavaju tumorske stanice. U širem smislu u modifikatore biološke reakcije ubrajamo bakterije ili njihove dijelove; stanične polipeptidne produkte koji nisu protutijela, a sudjeluju u regulaciji imunološke reakcije – citokine (limfokini, interferoni); citokine koji reguliraju hematopoezu – krvotvorne faktore rasta (G – CSF, GM – CSF, eritropetin, interleukini); ostale citokine, faktore rasta i regulatorne proteine (TGF, somatostatin); monoklonska protutijela; sintetičke produkte (Levamisol); spojeve koji pospješuju diferencijaciju stanica (Šamija i sur., 2004). Među imunomodulatore ubrajamo i flavonoide.

## 1.4. FLAVONOIDI

Flavonoidi su važna skupina biokativnih polifenola, a pripadaju vrlo raznolikoj skupini fenolnih spojeva. Fenoli su sekundarni biljni metaboliti, a predstavljaju veliku skupinu prirodnih spojeva vrlo raširenih u biljnom svijetu. Prisutni su u značajnim količinama u brojnim konzumnim biljkama kao što su voće, povrće, žitarice, te raznim napitcima (Nijveldt i sur., 2001). Preko 8000 fenolnih komponenti izolirano je iz različitih biljaka uključujući flavonoide, fenolne kiseline, kumarine, tanine. Svi flavonoidi imaju zajedničku planarnu, osnovnu kemijsku strukturu koja se sastoji od dva aromatska prstena (A i B) povezana sa lancem od tri atoma ugljika koji formira oksigenirani heterociklični prsten (C prsten).



Slika 2. Prikaz osnovne strukture flavonoida  
(Slika preuzeta iz: Balasundram i sur., 2006)

Razlike u strukturi, kao i oksidacijsko stanje i funkcionalne skupine heterocikličkog prstena C osnova su za svrstavanje flavonoida na flavonole, flavone, flavanone, flavan - 3 - ole (flavane), antocijane, izoflavoni, aurone i antocijane (Erdman i sur., 2009).

Najzastupljeniji flavonoidi u hrani (Erdman i sur., 2009) su:

- Flavonoli su najrašireniji flavonoidi u hrani, a najistaknutiji predstavnik je kvercetin. Općenito su prisutni u relativno malim koncentracijama u biljkama (15 - 30 mg/kg mase u svježem stanju). Najbogatiji izvori flavonola su luk, kelj, brokula, jabuke, borovnice.
- Flavoni su manje uobičajeni od flavonola u voću i povrću. Istaknuti flavoni su luteolin i apigenin. Izvori flavona su peršin i celer.
- Flavanoni su prisutni u visokim koncentracijama u citrusima. Glavni aglikoni u citrusima su naringenini i hesperetin.

- Izoflavoni su strukturno slični estrogenima. Soja i derivati su glavni izvori izoflavona kao što su genistein, daidzein, glicitein.
- Flavan - 3 - oli su prisutni u grožđu i proizvodima grožđa, čaju, kakaou i čokoladi. Dolaze kao monomeri (epikatehin i katehin) ili oligomeri (proantocijanidin).
- Antocijani su biljni pigmenti topljivi u vodi, odgovorni za crvenu, plavu i ljubičastu boju. Obilno su zastupljeni u grožđu i bobicama, vinu, nekim žitaricama, zelju, grahu i luku. Cijanidin je najčešći antocijanidin u hrani. Crno grožđe sadrži do 600 mg antocijana u 100 grama.

Flavonoidi se pojavljuju u većini biljaka u obliku glikozida, vezanjem na jednu ili više molekula šećera. Hidroksilna funkcionalna skupina na sva tri prstena je potencijalno mjesto za vezanje ugljikohidrata. Strukturna kompleksnost flavonoida povećava se vezanjem acetilne i amonilne skupine na šećerne konjugate. Kombinacija strukture flavonoida, šećera i acilacija doprinose velikom broju individualnih molekula. Biosintetski put flavonoida pripada većem fenilpropanoidnom biosintetskom putu (Lepiniec i sur., 2006) kojim se sintetizira širok spektar sekundarnih metabolita poput fenolnih kiselina, kumarina, lignina, lignana te stilbena.

Flavonoidi nemaju direktno djelovanje na rast, razvoj i reprodukciju biljnog organizma, a nedostatak ne rezultira trenutnim ugibanjem već dugoročno može utjecati na sposobnost preživljavanja, plodnost, fenotip ili uopće nema utjecaja. Flavonoidi su dugo vremena smatrani „biljnim otpadom“ koji se nalazi u vakuoli. Biljke ih proizvode kao bojila, kemoatraktante za oprašivanje i raspršivanje sjemenki, imaju ulogu u rastu peludne mješine, razvoju sjemenki leguminoza (nodulacija), zaštiti od patogenih mikroba, razvoju mikorize, djeluju kao signalne molekule zbog svoje strukturne sličnosti sa hormonima, imaju ulogu u regulaciji transporta auksina, te služe za privlačenje i/ili odbijanje različitih životinja (kukaca, sisavaca). Nalazimo ih kod nekih algi, mahovina, te kod svih vaskularnih biljaka. Flavonoidi su uobičajena sastavnica ljudske prehrane te se u različitim količinama nalaze u voću (plodovi citrusa, šipka, marelice, češnjaka, borovnice, jabuke, crnog ribiza, borovnice), povrću (luk, zeleni papar, brokula, rajčica, špinat), sjemenkama, vinu, maslinovom ulju, medu, voćnim sokovima, čaju i kavi (Kanakis i sur., 2005).

Uočena su pozitivna djelovanja flavonoida na organizam kao što su: antioksidativno, antiaterosklerotsko, protuupalno, antitrombogeno, antitumorsko, antiosteoporotsko i antiviralno djelovanje (Nijveldt i sur., 2001).



- Antioksidativno djelovanje

Najbolje istražena farmakološka svojstva flavonoida su njihova antioksidativna svojstva. Prisutnost karbonilnih i hidroksilnih skupina kao i dvostrukih veza na specifičnim mjestima čini flavonoide snažnim antioksidansima (Kanakis i sur., 2005). Utječu na brojna patofiziološka stanja u tijelu kao što su anoksija, upale, lipidna peroksidacija i promjene genetskoga materijala. Flavonoidi su dobri lovci reaktivnih kisikovih vrsta kao što su superoksidni anion, hidroksidni i peroksidni radikali. Suprimiraju njihovo nastajanje inhibicijom enzima i keliranjem elemenata u tragovima koji su uključeni u proces nastanka slobodnih radikala (Pietta, 2000). Zbog niskog redoks potencijala (0,23 – 0,75 V) flavonoidi imaju sposobnost doniranja atoma vodika, te reduciranja visoko oksidiranih slobodnih radikala s redoks potencijalom 1,0 - 2,13 V kao što su superoksidni, peroksidni, aloksilni i hidroksilni radikali. Osim hvatanja slobodnih radikala, flavonoidi ih također mogu stabilizirati ili kelirati. Reagiraju i sa dušikovim oksidom, te sprječavaju nastanak vrlo reaktivnog peroksinitrilnoga radikala. Uz to, dokazano je da kvercetin, silibin i luteolin inhibiraju ksantin - oksidazu koja je odgovorna za nastanak superoksidnih radikala.

- Protuupalno djelovanje

Protuupalno djelovanje flavonoida je posljedica njihova miješanja u metabolizam arahidonske kiseline. Flavonoidi kao što su hibifolin, hipoleatin, leukocianidiol i santin inhibiraju enzime ciklooksigenazu i 5 - lipoksigenazu, te sprječavaju nastajanje prostaglandina i leukotriena. Drugi mehanizam protuupalnoga djelovanja potječe iz inhibicije citosolnih i membranskih tirozin - kinaza, koje su odgovorne za regulaciju staničnog rasta i proliferacije, pa dolazi do smanjene degranulacije neutrofila. Na taj način se smanjuje njihova uloga u upalnoj reakciji.

- Djelovanje na krvožilni sustav

Jedna od najvažnijih svojstava nekih flavonoida je venoaktivnost, sposobnost da smanjuju krhkost i permeabilnost kapilara. To je posljedica inhibicije enzima katehol - O - metiltransferaza, zbog čega se poveća koncentracija kateholamina. Uz to inhibiraju, adheziju i agregaciju trombocita, što je povezano s inhibicijom Camp - fosfodiesteraze. Zbog antioksidativnih svojstava sprječavaju oksidaciju LDL - a (gosipetin, miricetin) i time smanjuju razvoj aterosklerotičnih promjena.

- Protutumorsko djelovanje

Protutumorskom djelovanju flavonoida pripisuju se njihova antioksidativna svojstva. Za flavonoide apigenin, nobiletin i viteksiperin dokazano je citotoksično djelovanje na stanice tumora. Flavonoidi utječu na proces tumorske angiogeneze pri čemu važnu ulogu vjerojatno ima inhibicija protein - kinaze i protein - tirozin - kinaze.

- Estrogensko djelovanje

Najvažnija skupina flavonoida sa estrogenskim učinkom su izoflavoni. To su spojevi koji djeluju agonistički na estrogenske receptore, neki u sličnim koncentracijama kao fiziološki hormoni. Količine flavonoida koje možemo dobiti hranom su premale da bi dosegle fiziološke učinke.

- Inhibicija enzima

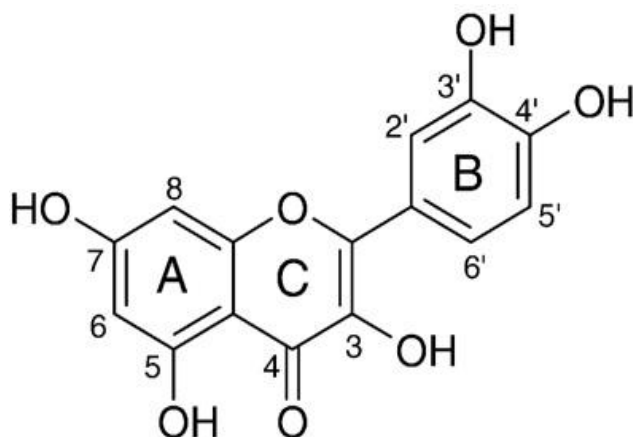
Kvercetin i naringenin inhibiraju histidin - dekarboksilazu, elagitanini elastazu, flavoni i proantocijanidin hijaluronidazu, kvercetin i metoksiflavoni aldoza - reduktazu. Sprječavaju aktivaciju komplementa čime smanjuju adheziju upaljenih stanica na endotel i oslabe upalni odgovor. Dokazana je inhibicija NADH - oksidaze s evpatorinom, robinetinom i ramnetinom.

Neki polifenoli mogu imati karcinogene i genotoksične učinke. Kafeinska kiselina, kvercetin i tanini induciraju oba efekta. Genotoksični učinci kvercetina promatrani u *in vitro* uvjetima povezni su sa činjenicom da vrlo visoke koncentracije polifenola mogu djelovati kao snažni prooksidansi. Prooksidativni učinak flavonoida, promatran u *in vitro* uvjetima, kataliziran je slobodnim bakrom, askorbatom i peroksidaznom aktivnošću. U uvjetima *in vivo* bakar ne dolazi u slobodnom obliku a peroksidaza je odijeljena, što znači da nije moguće da se uvjeti *in vitro* pojave u uvjetima *in vivo*. Osim toga, koncentracije najčešće korištene u *in vitro* uvjetima uvelike nadmašuju koncentracije koje se mogu pojaviti u *in vivo* uvjetima (Erdman i sur., 2009).

Procjenjuje se da se normalnom, zdravom prehranom u organizam svakodnevno unese do 2 grama različitih flavonoida. S obzirom na pozitivne učinke prehrane bogate flavonoidima na brojne patološke procese, flavonoidi su postali česti sastojak dodataka prehrani. To je važno naglasiti iz razloga što te tvari u većim koncentracijama imaju toksične učinke, a mnogi dodaci prehrani sadrže 10 - 20 puta veće koncentracije flavonoida nego što se normalno dobivaju iz hrane. Zato je kod dugotrajne upotrebe flavonoida potreban oprez (Kočevar i sur., 2007).

### 1.4.1. Kvercetin (3,3',4',5,7 - pentahidroksiflavon)

Kvercetin ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) je biljni pigment pronađen u luku, čaju, jabukama i bobičastom voću, te je vrlo važan prirodni sastojak koji dolazi u čistom obliku i u glikozidima, te pokazuje biološku aktivnost.



Slika 3. Prikaz strukturne formule kvercetina

(Slika preuzeta iz: Kroon i sur., 2004)

Kvercetin je jedan od najistraženijih flavonoida i mnogi eksperimenti zabilježili su da kvercetin ima biološka, farmakološka i medicinska svojstva (Son i sur., 2004). Kvercetin pokazuje selektivni citotoksični učinak na normalne i tumorske stanice. Većina tvari korištenih u terapiji tumora toksične su i za zdrave stanice, te im uzrokuju ozbiljna oštećenja. Indukcija selektivne apoptoze jedan je od najboljih načina borbe protiv tumorskih stanica. Prirodni spojevi koji su sposobni za selektivnu i preferencijalnu eliminaciju tumorskih stanica, inhibirajući progresiju staničnog ciklusa i uzrokujući apoptozu su obećavajući terapijski tvari. Istraživanja pokazuju da se kvercetin može koristiti kao kemopreventivna i terapijska tvar. Pozitivni učinci kvercetina rezultat su inhibicije enzima uključenih u stanični ciklus, te antioksidativna svojstva, čime poboljšava prirodnu antioksidativnu obranu (Son i sur., 2004). Kvercetin povećava aktivnost unutarstaničnih antioksidanata (SOD, CAT, GR, GSH, GPX) (Son i sur., 2004) i djeluje zaštitno na oksidativni stres sprječavanjem oštećenja zdravih stanica uzrokovanim slobodnim radikalima. Naprotiv, u tumorskih stanica kvercetin djeluje prooksidativno. Da li će kvercetin imati antioksidativnu ili prooksidativnu ulogu ovisi o redoks stanju stanice (Son i sur., 2004). Stanice izložene povećanoj količini oksidirajućih vrsta razvijaju specifičan antioksidativni odgovor, što ovisi o tipu stanice i količini prooksidansa (Son i sur., 2004). Pretpostavlja se da tretman kvercetinom inducira odgovore

posredovane različitim antioksidativnim obrambenim sustavom, a selektivna indukcija apoptoze usko je povezana sa prirodom tog odgovora.

Kvercetin kao i neki polifenoli pokazuje karcinogene i genotoksične učinke pri višim koncentracijama. Genotoksični učinci kvercetina promatrani *in vitro* pripisani su činjenici da vrlo visoke koncentracije polifenola djeluju prooksidativno (Erdman i sur., 2009). U eksperimentalnih životinja kafeinska kiselina, kvercetin i tanini mogu inducirati oba učinka (Erdman i sur., 2009). Povećanje lipidne peroksidacije može biti uključeno u selektivnu indukciju apoptoze uzrokovanoj kvercetinom. Malonaldehid je glavni proizvod lipidne peroksidacije, a pokazano je da ima mutagena svojstva te reagira s DNA stvarajući adukte koji uzrokuju oštećenja DNA (Son i sur., 2004). Radi toga je sprječavanje lipidne peroksidacije esencijalni proces u živim organizmima. Redukcija razine malonaldehida u stanicama upućuje na smanjen rizik od lipidne peroksidacije i citotoksičnih oštećenja. Istraživanja su pokazala da kvercetin značajno povećava razinu malonaldehida u tumorskim stanicama.

Iako su zabilježena antoksidativna i protutumorska aktivnost flavonoida malo je poznato o mehanizmu interakcije sa DNA i RNA. Niske koncentracije kvercetina stabiliziraju dvostruku uzvojnici DNA, dok visoke koncentracije kvercetina uzrokuju njegovu destabilizaciju. Pri visokim koncentracijama flavonoida dolazi do međudjelovanja između kvercetina i baze i kvercetina i fosfata (Kanakis i sur., 2005).

## 1.5. HIPERTERMIJA

Termin hipertermija potječe iz grčkog jezika (hiper - više, iznad i therme - toplina) a označava stanje tjelesne temperature povišene iznad normalnih vrijednosti. Hipertermija je poznata kao terapijska metoda još u starih Grka, Rimljana i Egipćana. Danas je hipertermija oblik terapije tumora u kojoj se temperatura tkiva povisuje na temperaturu od 41 °C do 45 °C, kako bi se oštetile i ubile stanice tumora ili učinile osjetljivijima na učinke radijacije i kemoterapije, te se stoga koristi kao dopunska terapija u svrhu povećanja učinkovitosti navedenih metoda, a nešto rjeđe i samostalno. Ovisno o veličini područja tijela na koji se primjenjuje, hipertermija može biti lokalna, regionalna ili sistemska.

- Lokalna hipertermija se najčešće koristi pri liječenju malih (do tri cm), površinskih ili duboko smještenih tumora.
- Regionalna hipertermija se primjenjuje kod pacijenata s regionalnim metastazama (tumor cerviksa, jajnika, prostate, mokraćnog mjehura, pluća) pri zagrijavanju veće površine tijela i u slučajevima kada uz primarni tumor postoje i regionalne metastaze.
- Sistemska ili opća hipertermija je hipertermija kod koje se zagrijava cijelo tijelo. Ona se najčešće primjenjuje pri liječenju leukemije i tumora sa općim metastazama kao što su melanomi i sarkomi. Sistemska hipertermija se obično izvodi na temperaturi nižoj za 1 - 2 °C u usporedbi sa lokalnom ili regionalnom hipertermijom.

Hipertermija se postiže na nekoliko načina; grijućim pokrivačima, implantantima, mikrovalovima, radiovalovima, ultrazvukom, IR zračenjem, infuzijom zagrijane tekućine, elektromagnetskom metodom i nanočesticama.

Biološki djelotvorna i svrsishodna hipertermija postiže se pri temperaturi od 41 °C do 45 °C iz razloga što temperature niže od 41°C brzo razvijaju termotoleranciju, a veće od 45 °C uzrokuju nepovratna oštećenja stanica pa se rijetko primjenjuju u *in vivo* uvjetima. Povišenje temperature već kod 43 °C dostiže svoju prirodnu granicu, jer se iznad te temperature razaraju stanice mozga a bjelančevine svih tkiva denaturiraju. Biološki učinak hipertermije ovisi o stupnju temperature te o vremenu izlaganja. Svaki stupanj porasta temperature može skratiti vrijeme trajanja terapije za polovicu. Tijekom izlaganja hipertermiji u stanicama dolazi do značajnih promjena. Sastav stanične membrane ima bitan utjecaj na

stupanj oštećenja od hipertermije (Hahn, 1982; Field i Hand, 1990), iz razloga što regulira ulazak i izlazak tvari iz stanice. Djelovanjem hipertermije, najprije dolazi do promjene napetosti i propusnosti stanične membrane što se očituje u promjeni sastava izvanstanične i unutarstanične tekućine. Promjene strukture i funkcije membranskih fosfolipida i proteina utječu na viskoznost (Roti Roti, Laszlo, 1988) i fluidnost same membrane čime je poremećena permeabilnost i pasivni transport koji se povećava, a dolazi i do poremećaja u ionskoj izmjeni iona kalcija i kalija (kalcij ulazi, a kalij izlazi iz stanice) (Bowler i sur., 1973). Stanice u mitozu su posebno osjetljive na hipertermiju zbog razaranja mikrotubula. Pod utjecajem temperature raspadaju se mikrotubularni mikrofilamenti zbog čega izostaje mitoz, a intermedijarni filamenti koji vežu mikrotubule za staničnu membranu gube strukturu i raspadaju se. Lizosomi i poliribosomi se prilikom hipertermije znatno oštećuju, zaustavlja se sinteza proteina, a mitohondriji bubre zbog visoke temperature, pucaju i postaju nefunkcionalni. Smatra se da lizosomi imaju ključnu ulogu u interfaznoj staničnoj smrti koju uzrokuje hipertermija. Važno je naglasiti da su tumorski lizosomi termolabilniji od lizosoma zdravih stanica radi čega dolazi do pucanja membrane i otpuštanja njihovog sadržaja. Sinteza proteina koja se događa na ribosomima je termolabilna a visoke temperature je koč. Na jezgri se također događaju strukturalne i funkcionalne promjene pod utjecajem hipertermije. Povišena temperatura oštećuje jezgricu, jezgrin matriks i enzimatski sustav polimeraza. Dolazi do poremećaja u sintezi postojećih proteina i do stvaranja novih proteina, tzv. „*heat shock protein*“ – Hsp kojima je zadaća zaštita DNA i RNA od jakog termičkog oštećenja a i omogućuju stanici popravak DNA oštećenja (Turić i sur., 1996). Protok krvi u grijanom i okolnom tkivu, također je promijenjen na mjestu primjene hipertermije, a nerijetko i u većoj regiji/organizmu (u cijelom tijelu), ovisno o vrsti i načinu primjene. Povećani protok krvi kroz zagrijano zdravo tkivo omogućuje hlađenje, što ima za posljedicu smanjenje toplinskog učinka. Tumorske krvne žile zbog brzog rasta imaju nepotpunu anatomsku građu, pa djelovanjem hipertermije brzo kolabiraju, čime se onemogućava protok krvi kroz tumor. U *in vivo* uvjetima posebno je naglašena temperaturna osjetljivost između zdravih i tumorskih stanica zbog razlike u mikrookolišu. U tumorskom tkivu je često prisutna acidoza, hipoksija, slaba opskrba hranjivim tvarima te slaba mikrocirkulacija što čini tumorske stanice osjetljivijima na temperaturu od zdravih stanica. Nedostatci primjene hipertermije na tumore smještene duboko u organima i tkivima su nedostatan dovodjenje topline i primjena neodgovarajućih i invazivnih tehničkih sredstava za mjerenje apsorbirane energije.

### **1.5.1. Kemoterapija i hipertermija**

Hipertermija uzrokuje bitne promjene u fiziologiji stanične membrane, oštećuje makromolekule i diobeno vreteno, zaustavlja sintezu DNA, RNA i enzima, razara membrane lizosoma, povećava količinu slobodnih radikala, te na te načine pospješuje učinak citostatika. Većina protutumorskih lijekova, osobito alkilirajuće tvari, pokazuju bolji učinak kada se primijenjuju u kombinaciji sa hipertermijom u *in vivo* i *in vitro* uvjetima. Glavni uzrok tog učinka je povećanje unosa tvari u stanicu, čime se dodatno oštećuje DNA, a kao posljedica povećanog protoka krvi zbog vazodilatacije povećana je i dostava tvari u tumorsko tkivo.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**



Cilj ovog diplomskog rada je istražiti citotoksični učinak kvercetina i cisplatine u kombinaciji s hipertermijom na stanice EAT - a, te ustvrditi njihovu međusobnu povezanost te mehanizme djelovanja.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. MATERIJALI KORIŠTENI U ISTRAŽIVANJU**

#### **3.1.1. Pokusne životinje**

U istraživanju smo koristili miševе muškog spola visokosrodnog soja Swiss albino, u dobi od oko 2 mjeseca, mase 20 – 25 g, iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Miševе smo držali u kavezima, po najviše 5 životinja u kavezu. Standardna hrana za glodavce (Standard Diet 4RF 21 GLP certificate, Mucedola, Italija) i voda bili su stalno dostupni životinjama *ad libitum*.

Istraživanje smo proveli u skladu s važećim etičkim načelima Republike Hrvatske (Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine broj 135/06, Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne novine broj 176/04) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) 86 - 23, 1985).

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

Stanice EAT dobivene su iz peritonealne šupljine miševa *Swiss albino* nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta u Zagrebu. Tumorske stanice smo održavali presađivanjem stanica intraperitonealno u trbušnu šupljinu miša u periodu od sedam do devet dana. Erlichov ascitesni tumor (EAT) je heterogeni, slabo diferencirani, brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti, a izvorno se javlja kao spontani karcinom mliječne žlijezde u miša. U jetri miševa, nositelja Erlichovog ascitesnog tumora, dolazi do znatnog povećanja lipidne peroksidacije te do smanjenja količine antioksidativnih enzima.

#### **3.1.3. Cisplatina**

U istraživanju smo koristili citostatik cisplatinu (Cisplatin, Pliva). Za potrebe pokusa, neposredno prije uporabe razrijeđen je u vodi za injekcije u dozi od 5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>.

#### **3.1.4. Kvercetin**

Kvercetin (Quercetin dihydrate 98 %, Fluka) pripremili smo otapanjem u 96 % etanolu te neposredno prije uporabe razrjeđivanjem u vodi za injekcije pripremili smo dozu kvercetina od 50 mg kg<sup>-1</sup> a postotak alkohola je bio manji od 1 %.

## 3.2. METODE KORIŠTENE I ISTRAŽIVANJU

### 3.2.1. Izlaganje miševa nositelja EAT - a kvercetinu, hipertermiji i cisplatinu

Za istraživanje preživljavanja pokusnih životinja, miševe smo slučajnim odabirom raspodijelili u pokusne skupine, od kojih svaka skupina sadrži 7 do 9 životinja. Za istraživanje citotoksičnog učinka miševe smo raspodijelili u pokusne skupine sa 13 do 15 životinja. Preventivna obrada miševa, 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica, provedena je *i.p.* injiciranjem pripravka kvercetina u dozi  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ . Kemoterapiju ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i kemoterapiju u uvjetima hipertermije ( $43 \text{ }^\circ\text{C}$ ) s cisplatinom u dozi 5 i  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , proveli smo 3 dana nakon unosa tumorskih stanica u peritonejsku šupljinu miševa.

Nakon žrtvovanja životinje trbušnu šupljinu smo isprali s 5 ml fiziološke otopine a trbušnu stjenku lagano masirali te napravili uzdužni rez i otvorili peritonejsku šupljinu miša. Pasteurovom pipetom uzeli smo peritonejsku tekućinu s tumorskim stanicama i razrijedili s fiziološkom otopinom (0,9 % otopina natrijeva klorida, Pliva) do ciljane koncentracije  $2 \times 10^6$  EAT stanica/0,5 mL. Broj živih stanica određen je brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker - Türkovoj komorici. Unos EAT stanica u peritonejsku šupljinu miša predstavlja 0. dan pokusa.

Intraperitonejsku hipertermiju prouzročili smo intraperitonealnim unosom fiziološke otopine u količini  $2 \times 2 \text{ mL}$ , prethodno zagrijane u vodenoj kupelji na  $43 \text{ }^\circ\text{C}$ , a provedena je neposredno prije primjene citostatika. Ovaj postupak je proveden na svim pokusnim skupinama neovisno o primjeni citostatika. Jednak postupak je proveden i za kemoterapiju pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  pri čemu je fiziološka otopina je prethodno zagrijana u vodenoj kupelji na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Uzorci peritonejske tekućine za određivanje broja živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini, diferencijalno određivanje broja stanica u peritonejskoj tekućini pri preventivnoj obradi miševa, uzeli smo 3. dana od unosa EAT stanica u peritonejsku šupljinu miša odnosno otprilike 1 sat nakon *i.p.* primjene citostatika cisplatine. Neposredno prije uzimanja uzoraka za analizu, životinje smo uspavali u eksikatoru s dietil eterom, a prema potrebi životinje smo ubili cervikalnom dislokacijom.

### **3.2.2. Preživljavanje pokusnih životinja**

Preživljavanje pokusnih životinja praćeno je nakon preventivne obrade miševa. Spontana uginuća miševa unutar pojedinih pokusnih skupina pratili smo svakodnevno tijekom 90 dana pokusa.

### **3.2.3. Određivanje broja živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini**

Za određivanje broja živih i mrtvih tumorskih stanica uzeli smo uzorke peritonejske tekućine od 4 miša iz svake pokusne skupine treći dan od unosa EAT - a u peritonejsku šupljinu miša, te smo od svakog pojedinog uzorka pripravili dva preparata. Nakon ispiranja peritoneuma s 5 ml fiziološke otopine i lagane masaže trbuha, napravili smo uzdužni rez, otvorili peritonejsku šupljinu miša te Pasteurovom pipetom uzeli peritonejsku tekućinu. Broj živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini odredili smo brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker - Türkovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus, Japan) pri povećanju 400×. Analizirali smo najmanje 100 tumorskih stanica po preparatu. Žive tumorske stanice su neobojene, a zbog gubitka sposobnosti izbacivanja boje, mrtve tumorske stanice su plavo obojene.

### **3.2.4. Diferencijalno određivanje broja stanica u peritonejskoj tekućini**

Za diferencijalno određivanje broja stanica u peritonejskoj tekućini uzeli smo uzorke peritonejske tekućine treći dan od unosa EAT - a u peritonejsku šupljinu miševa. U duplikatu smo na predmetnim stakalcima pripravili razmaze peritonejske tekućine; uzeli smo 4 miša iz svake pokusne skupine. Nakon sušenja, razmaze smo obojili May Grünwaldom i vodenom otopinom Giemse (1 dio Giemse : 2 dijela vode). Pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 400 × stanice smo pregledali te prema njihovim značajkama svrstali u tumorske stanice (Fecchio i sur., 1990), makrofage, neutrofilne leukocite i limfocite (Bergman i sur., 1995), brojanjem najmanje 800 stanica po svakom preparatu.

## **4. REZULTATI**

#### **4.1. Rezultati preživljenja životinja**

Učinak cisplatine u kombinaciji s kvercetinom na miševe nositelje EAT - a istražili smo praćenjem vremena preživljavanja nakon preventivne obrade miševa u uvjetima njihove fiziološke tjelesne temperature (37 °C) i u uvjetima hipertermije (43 °C). Spontana uginuća miševa unutar pojedinih pokusnih skupina pratili smo svakodnevno tijekom 90 dana pokusa. Rezultati preživljavanja miševa dani su Kaplan - Meierovim krivuljama preživljenja. Rezultati praćenja preživljenja preventivno obrađenih miševa pri 37 °C i 43 °C prikazani su u Tablici 1. i na Slikama 4. i 5.

Tablica 1. Preživljenje miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne imunoterapije kvercetinom te kemoterapije cisplatinom <sup>a</sup> pri 37 °C i 43 °C

Skupina	Temperatura 37 °C					Temperatura 43 °C				
	Raspon preživljavanja (dani)	Srednja vrijednost preživljavanja (dani)	T/C % <sup>b</sup>	ILS % <sup>c</sup>	Broj preživjelih životinja <sup>d</sup>	Raspon preživljavanja (dani)	Srednja vrijednost preživljavanja (dani)	T/C % <sup>b</sup>	ILS % <sup>c</sup>	Broj preživjelih životinja <sup>d</sup>
Kontrola	20 – 24	22,43	–	–	0	17 – 23	20,14	–	–	0
Kvercetin	24 – 90	43,57*	194,25	94,25	2	37 – 90	62,43*	309,98	209,98	3
Cispl. 5 mg kg <sup>-1</sup>	28 – 90	47,86*	213,37	113,37	2	27 – 90	57,71*	286,54	186,54	2
Cispl. 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin	50 – 90	84,29*♦	375,79	275,79	6	90	90,00*♦	446,87	346,87	7
Cispl. 10 mg kg <sup>-1</sup>	90	90,00*	401,25	301,25	7	90	90,00*	446,87	346,87	7
Cispl. 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin	30 – 90	81,43*	363,04	263,04	6	90	90,00*	446,87	346,87	7

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi od 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3 dana nakon unosa EAT stanica. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pojedine skupine životinja ( $n = 7$ ).

<sup>b</sup> T/C obrađena nasuprot kontrolna skupina.

<sup>c</sup> ILS % (eng. increased life span %) =  $(T-C)/C \times 100$ . T, srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; C, srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja.

<sup>d</sup> Broj živih životinja 90 dana nakon obrade.

\* Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (Log-Rank test).

♦ Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> (Log-Rank test).

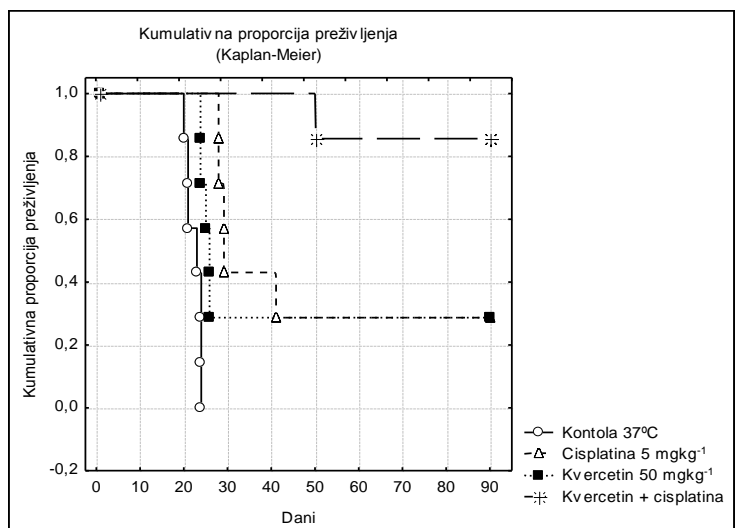


#### **4.1.1. Učinak preventivne intraperitonejske imunoterapije kvercetinom, te kemoterapije cisplatinom na preživljenje miševa nositelja EAT - a u fiziološkim uvjetima**

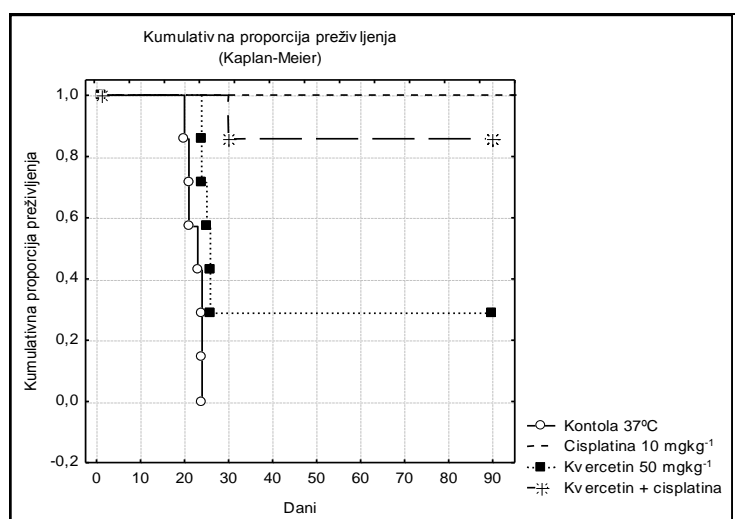
U kontrolnoj skupini pri 37 °C, raspon preživljavanja je bio od 20 - 24 dana. Sve skupine obrađenih miševa pokazuju produljenje preživljenja u odnosu na kontrolnu skupinu. Produljenje preživljenja uočili smo u skupini obrađenoj kombinacijom cisplatine u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom u odnosu na skupinu obrađenu samo cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>, dok u skupini obrađenoj kombinacijom cisplatine u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> nismo uočili produljenje preživljenja u odnosu na skupinu obrađenu samo cisplatinom u dozi od 10 mg kg<sup>-1</sup>.

Statistički značajno produljenje preživljenja miševa u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ; Log - Rank test) uočili smo u skupini životinja preventivno obrađenoj kvercetinom ( $p = 0,0102$ ) te u pokusnim skupinama obrađenim cisplatinom i kombinacijama cisplatine s kvercetinom (cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup>,  $p = 0,0004$ ; cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin,  $p = 0,0010$ ; cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin,  $p = 0,0010$ ; cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup>,  $p = 0,0052$ ). Također, statistički značajno produljenje preživljenja u odnosu na skupinu koja je obrađena samo cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ; Log - Rank test) uočili smo u skupinama životinja obrađenih kombinacijama cisplatine u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom (cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin,  $p = 0,0243$ ).

U skupinama životinja obrađenih kvercetinom i cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> preživjele su 2 životinje, u skupinama obrađenih kombinacijom cisplatine u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom te cisplatine u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom preživjelo je 6 životinja, dok u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> je preživjelo svih 7 životinja. U svim obrađenim skupinama prisutno je povećanje životnog vijeka (ILS) u rasponu 3,83 – 301,25 % u odnosu na kontrolnu skupinu.



a)



b)

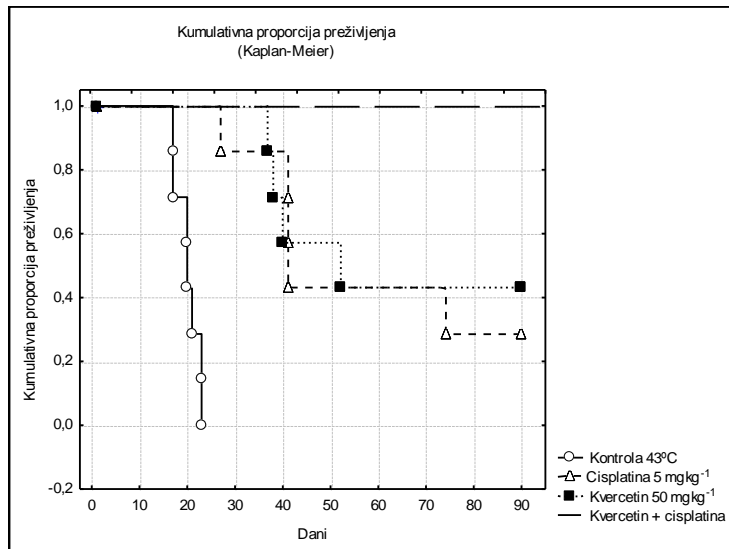
Slika 4. Kaplan - Meierova krivulja preživljenja miševa nositelja EAT - a nakon preventivne imunoterapije kvercetinom te kemoterapije cisplatinom koncentracije: a) 5 mg kg<sup>-1</sup> i b) 10 mg kg<sup>-1</sup> pri 37 °C

#### **4.1.2. Učinak preventivne intraperitonejske imunoterapije kvercetinom, te kemoterapije cisplatinom na preživljenje miševa nositelja EAT - a u uvjetima hipertermije**

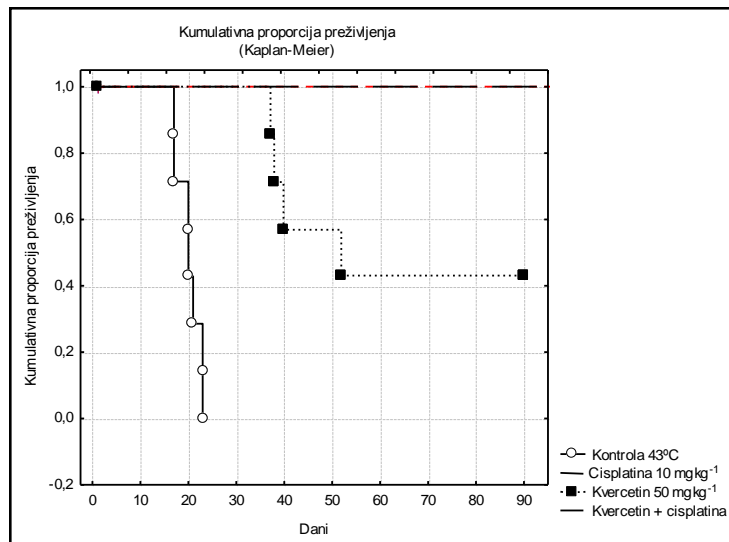
U kontrolnoj skupini koja se odnosi na provedenu kemoterapiju cisplatinom u uvjetima hipertermije pri 43 °C, raspon preživljenja je bio 17 – 23 dana. U svim pripadajućim obrađenim skupinama uočili smo produljenje preživljenja miševa u odnosu na kontrolnu skupinu. Produljenje preživljenja uočili smo u skupini obrađenoj kombinacijom cisplatine u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom u odnosu na skupinu obrađenu samo cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>.

Statistički značajno produljenje preživljenja miševa u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0.05$ ; Log - Rank test) uočili smo u svim skupinama životinja (cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup>,  $p = 0,0004$ ; cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin,  $p = 0,0004$ ; cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin,  $p = 0,0004$ ; cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup>,  $p = 0,0040$ ; kvercetin,  $p = 0,0045$ ). Također, statistički značajno produljenje preživljenja vidljivo je u skupini životinja obrađenoj kombinacijom cisplatine u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom (cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin,  $p = 0,0074$ ) u odnosu na skupinu koja je obrađena samo cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ; Log - Rank test).

U skupini životinja obrađenih cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> 2 životinje su preživjele, u skupini obrađenoj kvercetinom 3 životinje su preživjele, u skupinama obrađenih cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup>, kombinacijom cisplatine u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom te cisplatine u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom svih 7 životinja je preživjelo. U svim obrađenim skupinama prisutno je povećanje životnog vijeka (ILS) u rasponu 23,44 – 346,87 % u odnosu na kontrolnu skupinu.



a)



b)

Slika 5. Kaplan - Meierova krivulja preživljavanja miševa nositelja EAT - a nakon preventivne imunoterapije kvercetinom te kemoterapije cisplatinom koncentracije: a) 5 mg kg<sup>-1</sup> i b) 10 mg kg<sup>-1</sup> pri 43 °C

#### **4.2. Rezultati određivanja broja živih i mrtvih stanica u peritonejskoj tekućini**

Uzorci peritonejske tekućine za određivanje broja živih i mrtvih tumorskih stanica pri preventivnoj obradi miševa uzeti su 3. dan od unosa EAT stanica u peritonejsku šupljinu miša. Rezultati broja živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini preventivno obrađenih miševa 3. dan nakon unosa EAT stanica prikazani su u Tablici 2. i na Slikama 6., 7., 8. i 9.

Tablica 2. Broj živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne imunoterapije kvercetinom te kemoterapije cisplatinom<sup>a</sup> pri temperaturi 37 °C i 43 °C

Skupina	Temperatura 37 °C				Temperatura 43 °C			
	Broj živih stanica (N × 10 <sup>6</sup> )	Broj mrtvih stanica (N × 10 <sup>6</sup> )	Udio živih stanica (%)	Udio mrtvih stanica (%)	Broj živih stanica (N×10 <sup>6</sup> )	Broj mrtvih stanica (N×10 <sup>6</sup> )	Udio živih stanica (%)	Udio mrtvih stanica (%)
Kontrola	19,48 ± 9,02	0,92 ± 1,14	94,29 ± 8,91	5,71 ± 8,91	2,31 ± 1,42	0,20 ± 0,15	93,31 ± 5,75	6,69 ± 5,75
Kvercetin	1,95 ± 0,55*	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00				
Cispl. 5 mg kg <sup>-1</sup>	7,29 ± 4,77	2,34 ± 1,57	70,95 ± 20,18	29,05 ± 20,18	1,17 ± 0,97	0,04 ± 0,08	98,50 ± 3,01	1,50 ± 3,01
Cispl. 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin	15,63 ± 11,05	1,17 ± 0,55	92,34 ± 2,01	7,66 ± 2,01	0,35 ± 0,17	0,08 ± 0,00	79,82 ± 7,96*	20,18 ± 7,96*
Cispl. 10 mg kg <sup>-1</sup>	8,33 ± 5,48	2,34 ± 0,79	74,12 ± 14,66	25,88 ± 14,66	1,50 ± 1,36	0,18 ± 0,21	92,26 ± 5,46	7,74 ± 5,46
Cispl. 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin	9,64 ± 5,86	0,00 ± 0,00*	100,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00*	1,95 ± 2,26	0,24 ± 0,27	87,13 ± 6,85	12,87 ± 6,85

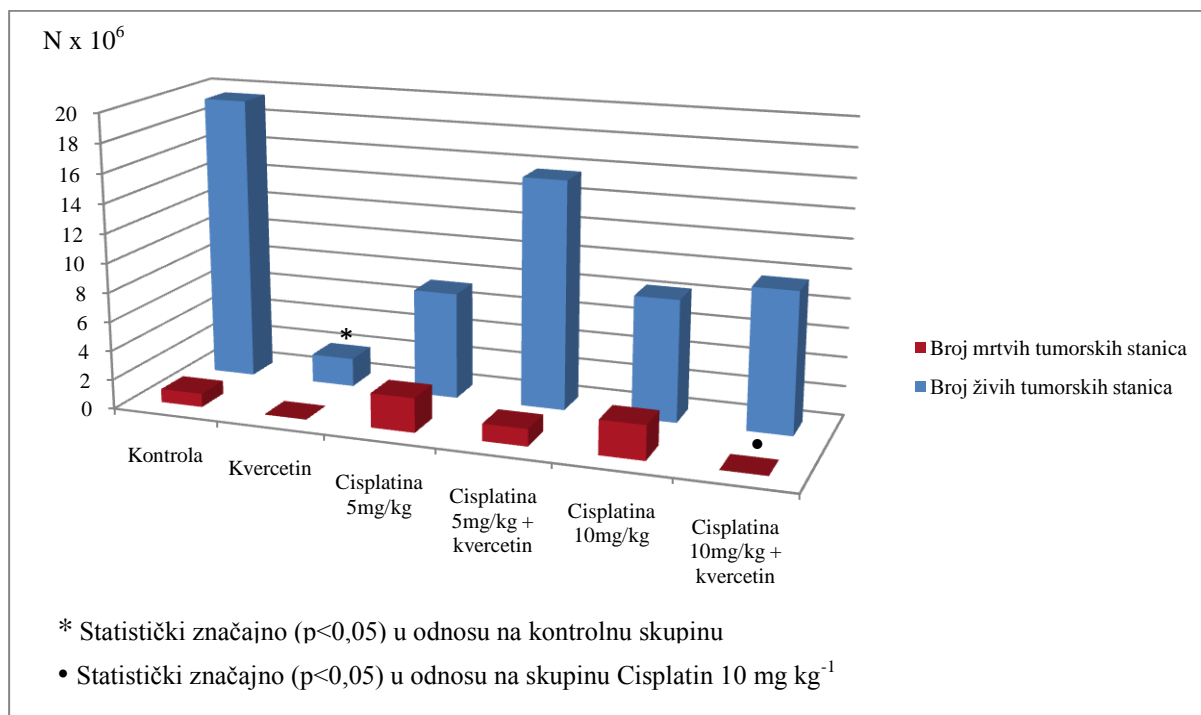
<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatin je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Broj živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini miševa određen je 3. dan nakon unosa EAT stanica. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja (*n* = 4).

\* Statistički značajno (*p*<0,05) u odnosu na kontrolnu skupinu (ANOVA).

♦ Statistički značajno (*p*<0,05) u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> (ANOVA).

• Statistički značajno (*p*<0,05) u odnosu na skupinu Cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup> (ANOVA).

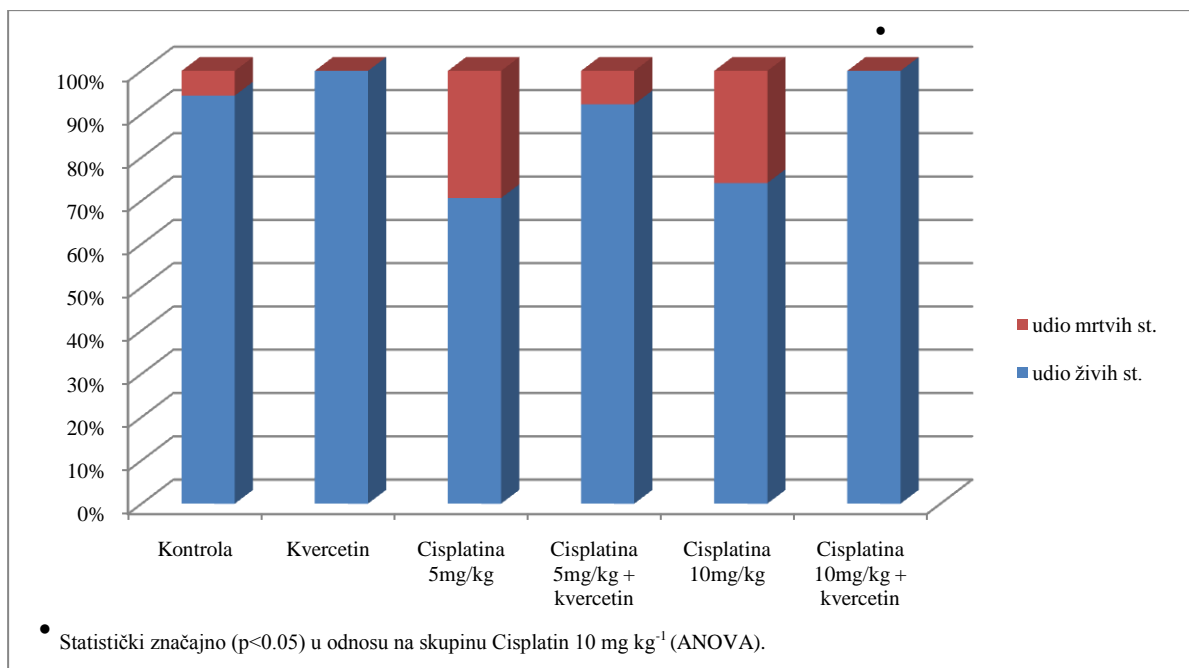
#### 4.2.1. Učinak preventivne intraperitonejske imunoterapije kvercetinom i kemoterapije cisplatinom na broj živih i mrtvih stanica u peritonejskoj tekućini u miševa nositelja EAT - a u fiziološkim uvjetima



Slika 6. Broj živih i mrtvih stanica u peritonejskoj tekućini miševa nositelja EAT - a nakon preventivne imunoterapije s kvercetinom i cisplatinom (37 °C)

U kontrolnoj skupini zabilježeno je  $19,48 \times 10^6$  živih tumorskih stanica i  $0,92 \times 10^6$  mrtvih tumorskih stanica. U svim obrađenim skupinama (cisplatin  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , cisplatin  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , cisplatin  $5 \text{ mg kg}^{-1} + \text{kvercetin}$ , cisplatin  $10 \text{ mg kg}^{-1} + \text{kvercetin}$ , kvercetin) uočili smo smanjenje broja živih tumorskih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu, iako je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjen broj živih tumorskih stanica u skupini obrađenoj kvercetinom.

Statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) broja mrtvih tumorskih stanica zabilježeno je u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom u dozi  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ .



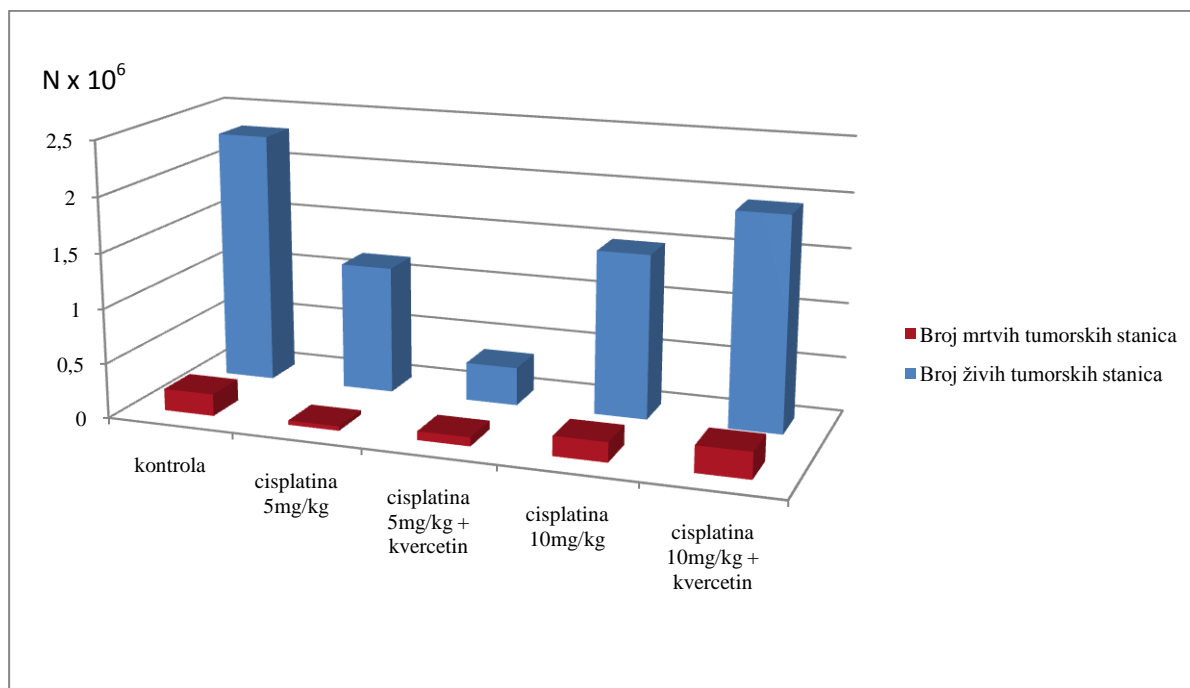
Slika 7. Udio živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini miševa nositelja EAT - a nakon preventivne imunoterapije s kvercetinom i cisplatinom ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ )

U kontrolnoj skupini zabilježeno je 94,29 % živih tumorskih stanica, odnosno 5,71 % mrtvih tumorskih stanica. U odnosu na kontrolnu skupinu, u skupinama preventivno obrađenim kvercetinom i kombinacijom cisplatine u dozi  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  s kvercetinom uočili smo da je udio živih tumorskih stanica 100 %, dok se u skupinama obrađenim cisplatinom  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , cisplatinom  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  i kombinacijom cisplatine  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  i kvercetinom povećava udio mrtvih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini miševa.

Statistički značajno povećanje udjela živih tumorskih stanica u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom u dozi  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  uočili smo u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ .

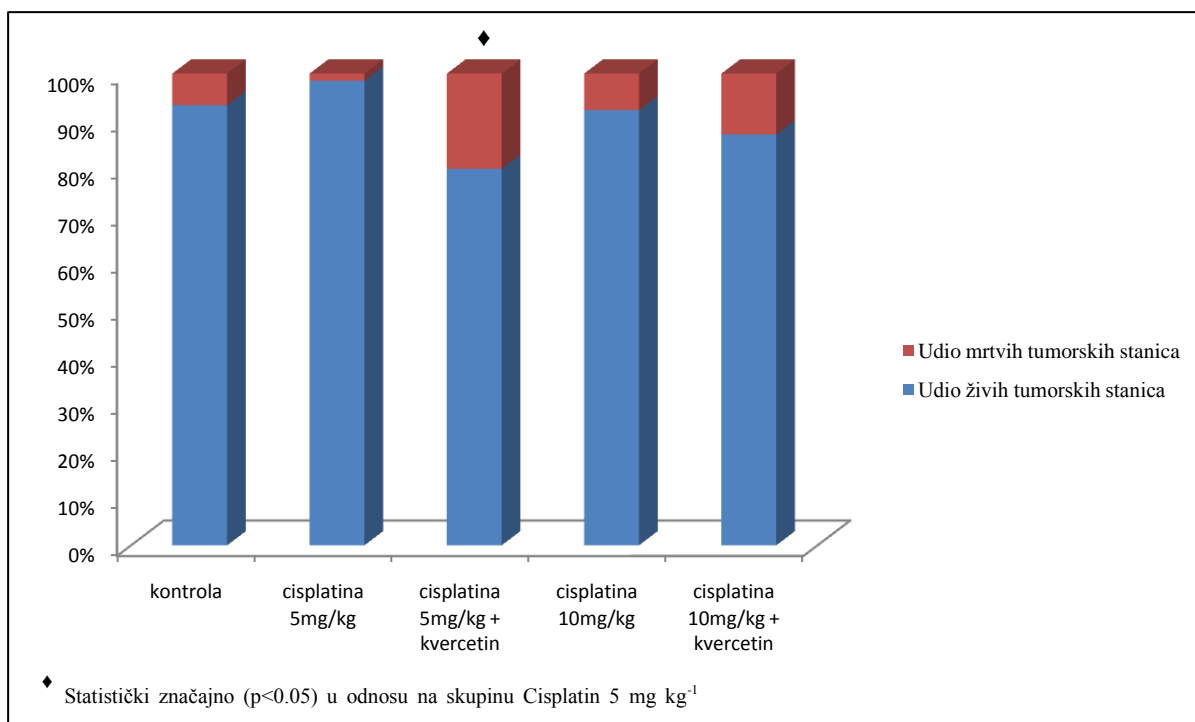


#### 4.2.2. Učinak preventivne intraperitonejske imunoterapije kvercetinom i kemoterapije cisplatinom na broj živih i mrtvih stanica u peitonejskoj tekućini u miševa nositelja EAT - a u uvjetima hipertermije



Slika 8. Broj živih i mrtvih stanica u peritonejskoj tekućini miševa nositelja EAT - a nakon preventivne imunoterapije s kvercetinom i cisplatinom u uvjetima hipertermije (43 °C)

Iz rezultata broja živih tumorskih stanica vidljivo je da u svim obrađenim skupinama (cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup>, cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup>, cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin, cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin) dolazi do smanjenja broja živih tumorskih stanica iako ti rezultati nisu statistički značajni.



Slika 9. Udio živih i mrtvih stanica u peritonejskoj tekućini miševa nositelja EAT - a nakon preventivne imunoterapije s kvercetinom i cisplatinom u uvjetima hipertermije (43 °C)

U kontrolnoj skupini zabilježeno je 93,3 % živih i 6,7 % mrtvih tumorskih stanica. Uočili smo da se udio mrtvih tumorskih stanica povećava u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu, osim u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>. Najveći udio mrtvih tumorskih stanica zabilježen je u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> i kvercetinom, zatim u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> i kvercetinom, te cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup>.

Statistički značajno smanjenje udjela živih tumorskih stanica uočili smo u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>.

### **4.3. Rezultati diferencijalnog određivanja broja stanica u peritonejskoj tekućini**

Uzorci za diferencijalno određivanje broja stanica u peritonejskoj tekućini pri preventivnoj obradi miševa uzeli smo 3. dan od unosa EAT stanica u peritonejsku šupljinu miša. Rezultati diferencijalnog određivanja broja stanica u peritonejskoj tekućini preventivno obrađenih miševa 3. dan nakon unosa EAT stanica prikazani u Tablici 3. i na Slikama 10. i 11.

Tablica 3. Udio tumorskih stanica i leukocita u peritonejskoj tekućini miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne imunoterapije kvercetinom te kemoterapije cisplatinom pri temperaturi 37 °C i 43 °C

Skupina	Temperatura 37 °C				Temperatura 43 °C			
	Tumorske stanice (%)	Makrofagi (%)	Limfociti (%)	Neutrofili (%)	Tumorske stanice (%)	Makrofagi (%)	Limfociti (%)	Neutrofili (%)
Kontrola	85,14 ± 13,47	14,29 ± 13,02	0,00 ± 0,00	0,57 ± 0,53	91,29 ± 15,45	7,85 ± 15,85	0,00 ± 0,00	0,86 ± 1,21
Kvercetin	22,44 ± 12,39*	69,86 ± 20,83*	0,33 ± 0,71	1,70 ± 1,62				
Cispl. 5 mg kg <sup>-1</sup>	73,14 ± 18,64*	26,43 ± 18,75*	0,00 ± 0,00	0,43 ± 0,53	87,57 ± 7,09	10,43 ± 6,50	0,14 ± 0,38	1,86 ± 2,48
Cispl. 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin	51,50 ± 16,50*♦	44,83 ± 15,82*♦	0,17 ± 0,41	3,50 ± 3,78	80,50 ± 16,37*	15,17 ± 11,94*	2,17 ± 4,02	2,17 ± 3,92
Cispl. 10 mg kg <sup>-1</sup>	63,00 ± 7,10*	35,00 ± 5,90*	0,00 ± 0,00	2,00 ± 1,55	94,00 ± 4,54	4,50 ± 3,93	0,13 ± 0,35	1,38 ± 1,92
Cispl. 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin	56,00 ± 25,93*	40,75 ± 25,07*•	0,13 ± 0,35	3,13 ± 4,58	93,63 ± 1,77	5,00 ± 1,51	0,00 ± 0,00	1,38 ± 1,77

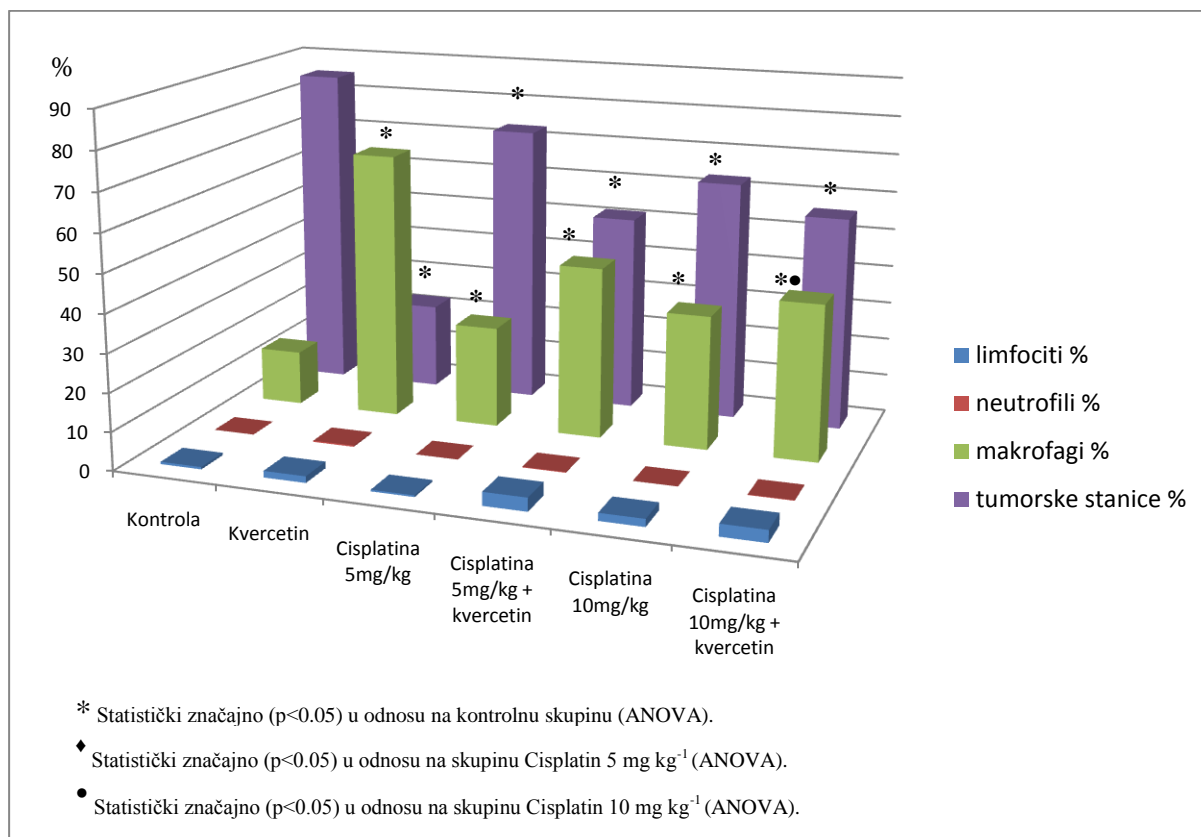
<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi od 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Diferencijalni broj stanica u peritonejskoj tekućini miševa određen je 3. dan nakon unosa EAT stanica. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ).

\* Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (ANOVA).

♦ Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> (ANOVA).

• Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu Cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup> (ANOVA).

#### 4.3.1. Učinak preventivne intraperitonejske imunoterapije kvercetinom i kemoterapije cisplatinom na udio tumorskih stanica i leukocita u peritonejskoj tekućini miševa nositelja EAT - a u fiziološkim uvjetima



Slika 10. Udio tumorskih stanica i leukocita u peritonejskoj tekućini miševa nositelja EAT - a nakon preventivne imunoterapije kvercetinom i kemoterapije cisplatinom pri 37 °C

Najveći udio tumorskih stanica od 85,1 % zabilježen je u kontrolnoj skupini. U svim ostalim skupinama zabilježen je niži udio, s time da je kvercetin najučinkovitiji u smanjenju udjela tumorskih stanica.

Najveći udio makrofaga od 69,86 % je zabilježen u skupini obrađenoj kvercetinom, a najmanji u kontrolnoj skupini od samo 14,3 %.

U svim obrađenim skupinama zabilježen je udio neutrofila manji od 1 %.

Limfociti su prisutni u peritonejskoj tekućini miševa svih obrađenih skupina s niskim udjelom, s time da je najveći udio zabilježen u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> s udjelom od 3,13 %.

Statistički značajno smanjenje udjela tumorskih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu uočili smo u svim obrađenim skupinama (kvercetin, cisplatina 5mg kg<sup>-1</sup>, cisplatina 5 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin, cisplatina 10 mg kg<sup>-1</sup>, cisplatina 10 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin).

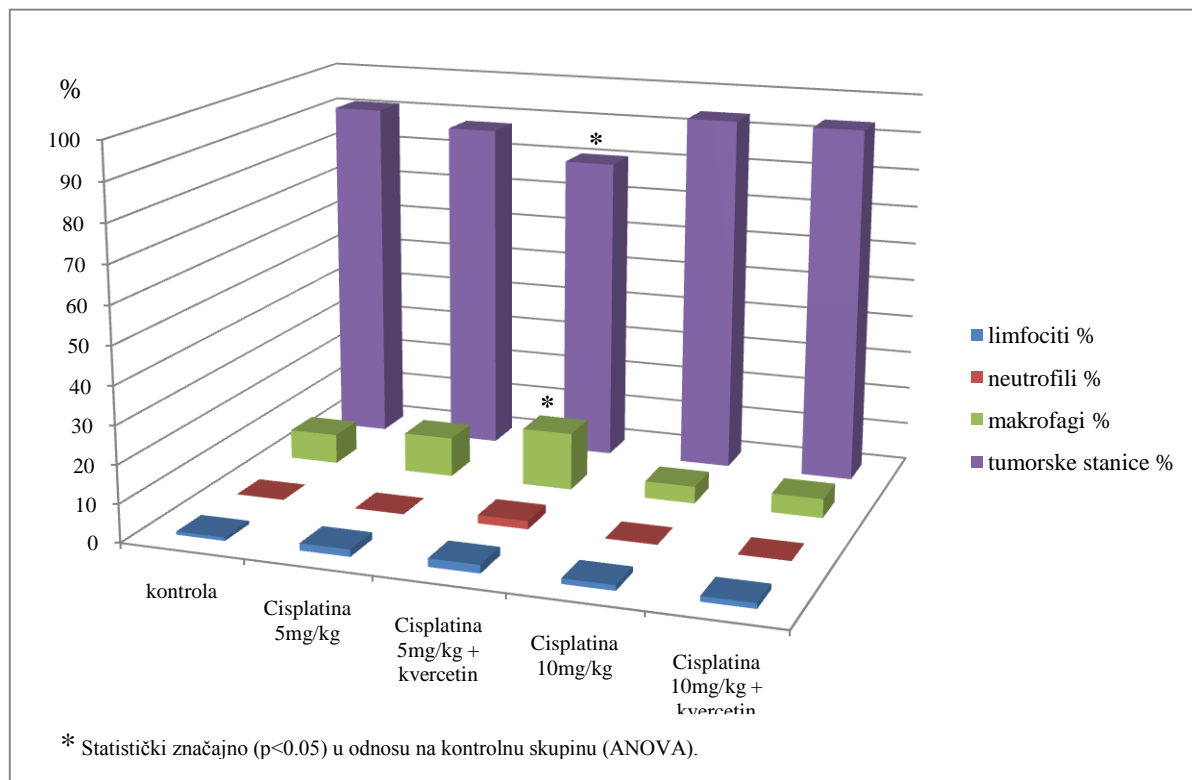
Statistički značajno povećanje udjela makrofaga uočili smo u svim obrađenim skupinama (kvercetin, cisplatina 5mg kg<sup>-1</sup>, cisplatina 5 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin, cisplatina 10 mg kg<sup>-1</sup>, cisplatina 10 mg kg<sup>-1</sup> + kvercetin) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Statistički značajno smanjenje udjela tumorskih stanica u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> uočili smo u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>.

Statistički značajno povećanje udjela makrofaga zapaženo je u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>.

Statistički značajno povećanje udjela makrofaga u odnosu na skupinu obrađenu cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> vidljivo je u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup>.

#### 4.3.2. Učinak preventivne intraperitonejske imunoterapije kvercetinom i kemoterapije cisplatinom na udio tumorskih stanica i leukocita u peritonejskoj tekućini miševa nositelja EAT - a u uvjetima hipertermije



Slika 11. Udio tumorskih stanica i leukocita u peritonejskoj tekućini miševa nositelja EAT - a nakon preventivne imunoterapije kvercetinom i kemoterapije cisplatinom pri 43 °C

U svim promatranim skupinama zabilježen je visok udio tumorskih stanica (91,29 % u kontrolnoj skupini, 87,57 % u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>, 94 % u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup>, te 93,63 % u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup>). Najmanji udio tumorskih stanica od 80,5 % zabilježen je u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>.

Najveći udio makrofaga od 15,17 % zabilježen je u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>, a najmanji od 4,5 % u skupini obrađenoj cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup>.

U svim skupinama zabilježena je prisutnost limfocita, od čega je najveći udio od 2,17% zabilježen u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup>.

Statistički značajno smanjenje udjela tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini miševa uočili smo u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  u odnosu na kontrolnu skupinu.

Statistički značajno povećanje udjela makrofaga u odnosu na kontrolnu skupinu uočili smo u skupini obrađenoj kvercetinom i cisplatinom u dozi  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ .



## **5. RASPRAVA**

Tumor je bolest koja posljednjih desetljeća predstavlja sve veći problem, kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj. Prema podacima državnog zavoda za statistiku novotvorine su drugi po učestalosti vodeći uzrok smrti (24,5 %) u Republici Hrvatskoj u 2008. godini. Zloćudni tumori su drugi po učestalosti uzrok smrtnosti u SAD - u i Europi (www.dzs.hr.). Stoga, liječenje tumora predstavlja velik izazov za suvremenu medicinu. U liječenju tumora i njegovih metastaza najčešće se primjenjuje liječenje koje uključuje kirurško odstranjivanje, terapiju citostaticima, radioterapiju i imunoterapiju, jer se potpuni terapijski učinak vrlo rijetko postiže primjenom samo jedne metode.

Priroda osnovnog pristupa liječenju tumora se neprestano mijenja. Klinički protokoli sada uključuju gensku terapiju, djelovanje na imunski sustav, stimulaciju stanica hematopoeze, indukciju diferencijacije u tumorskom tkivu i inhibiciju angiogeneze. U isto vrijeme, neki od tih lijekova u svakodnevnoj upotrebi imaju mali terapijski učinak i uzrokuju štetne nuspojave.

Terapija citostaticima je osnovna metoda u terapiji tumora. Kako su citostatici često vrlo agresivni lijekovi, kako za tumore, tako i za zdrave stanice, često je nemoguće primijeniti koncentraciju citostatika koja bi bila učinkovita za liječenje tumora a da se pritom ne ugroze zdrave stanice.

Naši rezultati preživljavanja pokazuju da preventivna obrada kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> te kombinacijama citostatika cisplatine u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> i 10 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom u uvjetima fiziološke intraperitonejske temperature (37 °C) i intraperitonejske hipertermije (43 °C) značajno (p<0,05; Log - Rank test) utječe na produljenje životnog vijeka životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupinama koje su preventivno obrađene kombinacijama cisplatine u dozi 5 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom, cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> te kombinacijama cisplatine u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom u uvjetima intraperitonejske hipertermije (43 °C) preživjele su sve životinje tijekom 90 dana praćenja preživljavanja, dok je u pripadajućoj kontrolnoj skupini srednja vrijednost preživljavanja bila 20 dana (Tablica 1., Slika 4. i 5.). Također, preživljavanje svih životinja zabilježili smo u skupini koja je obrađena cisplatinom u dozi 10 mg kg<sup>-1</sup> u uvjetima fiziološke intraperitonejske temperature (37 °C), dok je u pripadajućoj kontrolnoj skupini srednja vrijednost preživljavanja bila 22 dana (Tablica 1., Slika 4.). Nadalje, važno je naglasiti da je da je preventivna obrada provedena samo s kvercetinom u uvjetima fiziološke intraperitonejske temperature (37 °C), te s kvercetinom u

uvjetima intraperitonejske hipertermije (43 °C) značajno ( $p < 0,05$ ; Log - Rank test) povećala preživljavanje životinja (Tablica 1., Slika 4. i 5.).

U terapiji mnogih vrsta tumora cisplatina se pokazala prilično uspješnim lijekom, iako njeno korištenje ima nekoliko nedostataka kao rezultat njegove toksičnosti i na zdrave stanice (Jamieson i Lippard, 1999).

Kako bi se umanjila toksičnost cisplatine, odnosno citostatika općenito, potrebno je smanjiti terapijsku koncentraciju, a da se pritom ne umanjuje učinak na tumorske stanice. To se može postići na više načina. Jedan način da se to postigne je korištenje hipertermije. Hipertermija povećava protok krvi zbog čega dolazi do pojačanog nakupljanja citostatika u tumorskom tkivu, povećava propusnost stanične membrane čime se povećava unutarstanična koncentracija citostatika (doxorubicin, cisplatina, karboplatina i oksaliplatina), ubrzava oštećivanje DNA i proteina, povećava stvaranje slobodnih radikala, te oštećuje mitohondrije. Hipertermija u kombinaciji s drugim terapijama potiče apoptozu na dva načina. To su aktivacija kaspaze 8 i poremećaj funkcije mitohondrija. Kaspaze su ključni elementi u apoptozi induciranoj hipertermijom (Sugarbaker i sur., 2005).

To potvrđuju i dobiveni rezultati. Srednja vrijednost preživljavanja veća je u skupinama miševa koje su preventivno obrađene u uvjetima intraperitonejske hipertermije (43 °C) u odnosu na preventivno obrađene skupine u uvjetima fiziološke intraperitonejske temperature (37 °C). Naime, preventivna imunoterapija s kvercetinom izaziva bolji imunski odgovor prema tumorskim stanicama i istovremeno štiti zdrave stanice od toksičnog djelovanja cisplatine, a hipertermija doprinosi povećanoj učinkovitosti cisplatine u liječenju miševa nositelja EAT - a.

Osim hipertermijom, terapijska koncentracija citostatika može se smanjiti kombiniranjem citostatika s polifenolima/flavonoidima pronađenim u propolisu, voću, povrću, voćnim napitcima, koji osim što mogu smanjiti dozu korištenih citostatika, mogu i poboljšati protutumorsko djelovanje mnogih tipova tumora u miševa kao što je tumor mliječne žlijezde (MCA) i EAT. Njihov kemopreventivni učinak na tumore u životinjskim modelima i u staničnim kulturama rezultat je inhibicije sinteze DNA, pokretanja apoptoze u tumorskim stanicama, te aktivacije makrofaga na izlučivanje citokina koji reguliraju funkciju B, T, i NK stanica. To znači da pripravci propolisa i flavonoidi mogu poboljšati protutumorski učinak citostatika i smanjiti citotoksičnost na imunokompetentne stanice. Prethodno izlaganje flavonoidima, *in vitro* i *in vivo* čini tumorske stanice osjetljivijima na inhibiciju rasta i

apoptozu uzrokovanu citostaticima. Flavonoidi inhibiraju aktivnost P - gp pumpe, čija je funkcija izbacivanje citostatika iz stanice, čime povećavaju akumulaciju citostatika u tumorskim stanicama. (Oršolić i sur., 2008a).

Određivanjem broja živih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini miševa ustanovili smo citotoksičnost istraživanih tvari prema tumorskim stanicama (Tablica 2.). U skupinama obrađenim kvercetinom te kombinacijama cisplatine od 5 i 10 mg kg<sup>-1</sup> s kvercetinom u uvjetima fiziološke intraperitonejske temperature (37 °C) zabilježili smo značajno (p<0,05; ANOVA) smanjeni broj živih tumorskih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupinama kod kojih je provedena obrada cisplatinom (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) u fiziološkim uvjetima (37 °C) broj živih tumorskih stanica je smanjen ali protutumorski učinak cisplatine je veći u uvjetima intraperitonejske hipertermije (43 °C). Skupine u kojima je provedena preventivna obrada s kvercetinom u kombinaciji s cisplatinom (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) u uvjetima intraperitonejske hipertermije (43 °C) pokazuju znatno smanjeni broj živih tumorskih stanica, stoga je protutumorski učinak navedene terapije veći u odnosu na jednake skupine obrađene u uvjetima fiziološke intraperitonejske temperature (37 °C). Iz rezultata broja živih tumorskih stanica u peritonejskoj tekućini vidljiv je sinergizam citostatika, kvercetina i hipertermije pri čemu je hipertermija povećala osjetljivost tumorskih stanica na cisplatinu združenu s kvercetinom.

Objašnjenje sinergizma između hipertermije, citostatika i kvercetina moglo bi se temeljiti i na inhibiciji NF - κB kvercetinom. Neki lijekovi, uključujući cisplatinu, irinotekan, doksorubicin uzrokuju u tumorskim stanicama aktivaciju NF - κB što vodi stjecanju otpornosti na lijek. Prema tome inaktivacija NF - κB može rezultirati boljim uništenjem tumorskih stanica. Inaktivacija NF - κB propolisom ili flavonoidima prije obrade citostaticima može učiniti tumorske stanice osjetljivijima na apoptozu. Mnogi sastojci propolisa uključujući kvercetin inhibiraju rast mnogih tumorskih stanica u uvjetima *in vitro* i *in vivo* bez toksičnog učinka na zdrave stanice što ukazuje na njihov selektivni učinak. Ti flavonoidi reguliraju gene uključene u kontrolu stanične proliferacije, staničnog ciklusa, apoptoze, onkogeneze, regulacije transkripcije, angiogeneze i invaziju tumorskih stanica i metastaza (Oršolić i sur., 2008b).

Drugi važan mehanizam navedenog sinergizma mogao bi se temeljiti na učinku flavonoida, odnosno kvercetina u inhibiciji proteina temperaturnog šoka (engl. Heat shock proteins; Hsp). Kod stanica izloženih povišenoj temperaturi, lijekovima, UV zračenju,

deprivaciji glukoze i hipertermiji dolazi do povišenja razine Hsp - a, proteina koji predstavlja zaštitni mehanizam koji inhibira put stanične apoptoze. Kod povišene koncentracije Hsp - a dolazi do rezistencije na hipertermiju (Sugarbaker i sur., 2005).

Taj učinak može se spriječiti korištenjem flavonoida koji vrše utjecaj na Hsp čime se smanjuje otpornost tumorskih stanica na kemoterapiju i hipertermiju. Kvercetin smanjuje ekspresiju Hsp 90, Hsp70 i Hsp 27, a pozitivan učinak je dokazan na tumoru glave, vrata, kolorektalnom, cervikalnom i tumoru prostate. Inkubacija s kvercetinom prije terapije cisplatinom aktivira kaspazu 3, pa dolazi do inhibicije Hsp - a te pokretanja apoptoze (Sugarbaker i sur., 2005).

Izravni protutumorski učinak flavonoida i citostatika cisplatine temelji se na indukciji procesa apoptoze u tumorskim stanicama. Apoptoza je jedan od najjačih mogućih mehanizama obrane protiv tumora. Mnogo prirodnih tvari sadržanih u prehrani, uključujući i kvercetin pokreću apoptozu. Eksperimentalni podaci upućuju na direktnu vezu između količine glutationa u tumorskim stanicama, citotoksičnosti i apoptoze (Oršolić, 2010b). Za pokretanje puta apoptoze ili stanične proliferacije od presudnog značaja je koncentracija slobodnih radikala (Oršolić i Bašić, 2006; Oršolić, 2010). Flavonoidi uzrokuju apoptozu samo u transformiranim stanicama, dok se u zdravim stanicama to ne događa što ukazuje na selektivni učinak flavonoida (Oršolić, 2010). Sposobnost pokretanja apoptoze tumorskih stanica imaju flavonoidi zbog svoje prooksidativne aktivnosti. Prooksidativni učinak flavonoida ima utjecaj na unutarstaničnu razinu glutationa. Na taj način se uklanjaju važni unutarstanični obrambeni mehanizmi protiv citotoksičnih tvari u kemoterapiji, te se povećava citotoksičnost lijeka ili pokreće apoptoza i oksidativna oštećenja DNA u tumorskim stanicama (Oršolić i sur., 2008b).

Mehanizmi prevencije karcinogeneze flavonoidima su sljedeći: mehanizmi uključeni u prevenciju karcinogeneze metaboličkom aktivacijom, mehanizmi prevencije proliferacije tumorskih stanica, inaktivacija ili smanjenje funkcije prooksidativnih enzima ili signalnih putova te apoptoza posredovana inhibicijom funkcije mitohondrija (Oršolić i Bašić, 2006).

Jedan od važnih mehanizama u protutumorskom učinku flavonoida je i imunomodulacija. U skupinama koje su preventivno obrađene kvercetinom te kombinacijama cisplatine (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) s kvercetinom u uvjetima fiziološke intraperitonejske temperature (37 °C) uočili smo značajno (p<0,05; ANOVA) smanjenje udjela tumorskih stanica i povećanje udjela makrofaga u ukupnom broju stanica peritonejske tekućine u odnosu na

kontrolnu skupinu (Tablica 3.). Čak i u skupinama koje su preventivno obrađene samo s kvercetinom u uvjetima fiziološke intraperitonejske temperature (37 °C) zabilježen je značajno ( $p < 0,05$ ; ANOVA) smanjeni udio tumorskih stanica i povećani udio makrofaga u ukupnom broju stanica peritonejske tekućine u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajnu aktivaciju makrofaga u preventivnoj obradi miševa nositelja EAT – a kvercetinom. Također, rezultati ukazuju da je stimulacija imunskog sustava važan mehanizam koji zaustavlja rast tumora te vodi k njegovom uništenju. Smanjen broj tumorskih stanica i povećan broj makrofaga je rezultat izravnog citotoksičnog učinka kvercetina i citostatika cisplatine kao i imunostimulacijskog učinka kvercetina.

Rezultati istraživanja pokazuju da citotoksičnost flavonoida ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, koncentraciji i tipu tumorskih stanica. Koncentracija flavonoida je ključni faktor koji potiče proliferaciju i/ili staničnu smrt apoptozom ili nekrozom. Niska koncentracija (1  $\mu$ M) kvercetina utječe na funkciju monocita i makrofaga povećavajući učestalost fagocitoze (Oršolić i Bašić, 2006; Oršolić, 2010).

Pored citotoksičnog učinka primjena pripravaka propolisa i flavonoida zaštićuje imunosne stanice vjerojatno putem antioksidativnih mehanizama i sakupljanjem toksičnih slobodnih radikala i ROS – a.

Pripravci propolisa i flavonoidi mogu povećati apoptozu tumorskih stanica a istovremeno združeni s cisplatinom mogu povećati njenu toksičnost na tumorske stanice. Nasuprot tome, flavonoidi smanjuju štetne učinke na normalno tkivo, sprječavaju apoptozu imunosnih stanica te povećavaju otpornost organizma.

Brojni literaturni podatci ukazuju da neki sastojci prirodnih antioksidanasa, primjerice, med, propolis i njegove sastavnice (kafeinska kiselina, kvercetin, naringenin, resveratrol, genistein) su tvari koje najviše obećavaju u terapiji tumora (Oršolić i Bašić, 2006), zbog njihovog pojačanog sinergističnog učinka na citotoksičnost i oštećenje DNA uzrokovano protutumorskim lijekovima kao što je cisplatina (Oršolić i sur., 2008b). Čini se da su brojni mehanizmi uključeni u protutumorsku učinkovitost združene primjene flavonoida kvercetina s citostatikom i hipertermijom; potvrda svih pretpostavljenih mehanizama i putova zasigurno će dovesti do kliničke uporabe ovakvog načina liječenja u cilju veće učinkovitosti citostatika na tumorske stanice te smanjene toksičnosti na zdrave stanice, posebice imunosne stanice. Ovakav vid terapije ne samo da je dostupan, jeftin i učinkovit, nego je i najmanje štetan za organizam.

## **6. ZAKLJUČAK**

Temeljem dobivenih rezultata možemo izvesti zaključke kako slijedi:

- Preventivna obrada životinja kvercetinom u kombinaciji s cisplatinom u uvjetima hipertermije znatno povećava preživljavanje životinja.
- Hipertermija povećava citotoksični učinak cisplatine na tumorske stanice
- Citostatik cisplatina i flavonoid kvercetin imaju protutumorski učinak na stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora u miševa; smanjuju ukupni broj stanica u trbušnoj šupljini miševa nositelja tumora te povećavaju preživljenje miševa.
- Mehanizam protutumorske učinkovitosti kvercetina cisplatine i hipertermije se temelji na povećanju izravne citotoksičnosti citostatika u nazočnosti hipertermije te aktivaciji imunološkog sustava kvercetinom, posebice makrofaga.
- Obrada kvercetinom može smanjiti posljedice toksičnosti citostatika cisplatine na imunosne stanice miševa nositelja EAT – a.
- Citotoksični učinak cisplatine i kvercetina ovisan je o primijenjenoj dozi i izloženosti hipertermiji.



## **7. LITERATURA**

1. Andreis I., Čulo F., Marušić M., Taradi M. (1998): Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb
2. Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006): Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. 99: 191 – 203
3. Ban J, Matulić M, Osmak M (2004): Molekularna biologija proliferacije zloćudnih tumora. U: Mršić - Krmpotic Z, Roth A i sur., ur. Internistička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada,; 3-37.
4. Bergman R. A., Afifi A. K., P. M. Heidger (1995): Histology. Saunders Publishing, Philadelphia.
5. Bowler K., Duncan C.J., Gladwell R.T., Davison T.F. (1973): Cellular heat injury. *Comp Biochem Physiol (A)* 45: 441 – 448
6. Brozović G. (2007): Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa. Disertacija
7. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. (2007): Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 7:3-18
8. Erdman J.W., Jr., Balentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. and Burrowes J. (2009): Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, *The Journal of Nutrition*
9. Fecchio D., Sirois P., Russo M., Jancar S. (1990): Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation* 14, 125-132.
10. Field S.B., Hand J.W. (1990): An introduction to the practical aspects of clinical hyperthermia, Taylor Francis, London, New York, Philadelphia
11. Folkman J. (1990): What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl Cancer Inst.*; 82(1):4-6.
12. Fuertes M.A., Alonso C., Perez J.M. (2002): Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chemical reviews*, Volume 103, Number 3

13. Hahn G.M.(1982): Hyperthermia and cancer, Plenum press, New York
14. Hausmann R.E., Cooper G.M. (2004): Rak. U: Hausmann R.E., Cooper G.M. Stanica – molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb, str.631-673
15. Jamieson E.R., Lippard S.J. (1999): Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev*, 99, 2467-2498
16. Kanakis C.D., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Diamantoglou S., Tajmir-Riahi H.A.: DNA Interaction with Naturally Occurring Antioxidant Flavonoids Quercetin, Kaempferol, and Delphinidin (2005). *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, ISSN 0739-1102 Volume 22, Issue Number 6
17. Kočevar N., Glavač I., Kreft S. (2007): Flavonoidi, farm vestn 58: 145-148
18. Kroon P. A., Clifford M. N., Crozier A., Day A. J., Donovan J. L., Manach C. and Williamson G. (2004): How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *American Journal of Clinical Nutrition*. 80(1):15-21.
19. Kumar V., Cotran., Robbins S.L. (2000): Novotvorine. U: Kumar V., Cotran., Robbins S.L. Osnove patologije – prema petom američkom izdanju, Školska knjiga, Zagreb, str. 171 – 215.
20. Lau A.H. (1999): Apoptosis caused by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney International*, Vol.56, pp.1259-1298
21. Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J.-M., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., and Caboche M.(2006): Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:405–30
22. Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K., and van Leeuwen P.A.M. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action andb potential applications, *The american journal of clinical nutrition*, 74:418–25
23. Oršolić N., Bašić I. (2006): Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. *Phytochemistry & Pharmacology III*, (Editor: V.K. Singh, J.N. Govil & C. Arunachalam, STUDIUM PRESS, LLC, U.S.A.). *Recent Progress in Medicinal Plants* 17:55-114.
24. Oršolić N., Bevanda M., Bendelja K., Horvat-Knežević A., Benković V., Bašić I. (2008a): Propolis and related polyphenolic compounds; their relevance to host resistance and interaction with chemotherapy. *Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine*. 223-250

25. Oršolić N., Horvat Knežević A., Benković V., Bašić I. (2008b): Benefits of use of propolis and related flavonoids against the toxicity of chemotherapeutic agents. Transworld research network. 195-222
26. Oršolić N.(2010): A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science. 1-20
27. Pietta P.G.(2000): Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products, 63(7):1035-42
28. Roti Roti J.L., Laszlo A.(1988): The effects of hyperthermia on cellular macromolecules. U: Hyperthermia and Oncology, Vol 1, Urano M. Douple E. (eds), VSP, Utrecht, str. 13 – 56
29. Son Y.O., Lee K.Y., Kook S.H., Lee J.C., Kim J.G., Jeon Y.M., Jang Y.S., (2004): Selective effects of quercetin on the cell growth and antioxidant defense system in normal versus transformed mouse hepatic cell lines, European Journal of Pharmacology 502: 195– 204
30. Sugarbaker P.H., Mora J.T., Carmignani P., Stuart O.A., Yoo D.( 2005): Update on chemotherapeutic agents utilized for perioperative intraperitoneal chemotherapy. Oncologist;10(2):112-22.
31. Tomek R. (2004): Sistemsko liječenje tumora. U: Šamija i suradnici: Onkologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 172-177.
32. Turić M., Kolarić K., Eljuga D.: Klinička onkologija, Nakladni zavod Globus, Zagreb 1996. Yonemura Y., Fujimura T., Nishimura G., et all Effects of intraoperative chemohyperthermia in patients with gastric cancer with peritoneal dissemination. Surgery 1996;119:437-44

Korištene Internet stranice:

- [http://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/StatInfo/pdf/StatInfo2010.pdf](http://www.dzs.hr/Hrv_Eng/StatInfo/pdf/StatInfo2010.pdf)
- <http://cancergrace.org/lung/2009/12/18/picoplatin-for-sclc-%E2%80%94another-one-bites-the-dust/>
- [http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/Molekularna\\_patologija\\_1\\_predavanje.pdf](http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/Molekularna_patologija_1_predavanje.pdf)
- [http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/Molekularna\\_patologija\\_2\\_predavanje.pdf](http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/Molekularna_patologija_2_predavanje.pdf)
- [http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/Molekularna\\_patologija\\_4\\_predavanje.pdf](http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/Molekularna_patologija_4_predavanje.pdf)