

# Protutumorska učinkovitost kurkumina, bleomicina i hipertermije na stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora

---

**Strujić, Matija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:217:038770>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Matija Strujić**

**Protutumorska učinkovitost kurkumina, bleomicina i hipertermije na stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2015**

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom Prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

*Želim izraziti najveću zahvalnost svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na predloženoj temi, podršci i razumijevanju tijekom planiranja, izrade i pisanja diplomskoga rada.*

*Posebno zahvaljujem kolegama koji su nesebično pomogli i odradili sa mnom eksperimentalni dio Ediju Rođaku i Josipu Skoko.*

*Zahvaljujem i svim profesorima i djelatnicima Zavodu za animalnu fiziologiju na pomoći i konstruktivnim savjetima, posebno tehničarima Mariji Potočić i Hrvoju Jedvaj koji su uvijek bili tu kada je trebalo i uvelike mi olakšali rad u laboratoriju.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Protutumorska učinkovitost kurkumina, bleomicina i hipertermije na stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora**

Matija Strujić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kemoterapija je jedan od najnaprednijih i najučinkovitijih pristupa u borbi protiv tumora. Primjenom kemoterapije sprječava se proliferacija i širenje tumorskih stanica, te potiče proces apoptoze. Kemoterapiju osim apoptoze često prati proces nekroze koja prouzrokuje oštećenje i okolnoga zdravoga tkiva. Budući da su flavonoidi u drugim istraživanjima već pokazali učinkovitost protiv tumorskih stanica i mogućnost smanjivanja razine oštećenja u zdravim stanicama, u ovom istraživanju proučavan je *in vitro* učinak kurkumina (1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)hepta-1,6-dien-3,5-dion) na proliferaciju stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT), te njegov utjecaj na pokretanje apoptoze/nekroze kod stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora i njegov učinak u kombinaciji s bleomicinom i hipertermijom. Stanice EAT su rasle u Swiss albino miševima, iz kojih su izvađene nakon 7 dana, te su kultivirane u hranjivom mediju, obrađene kurkuminom, bleomicinom i hipertermijom. Antiproliferativni učinak test komponenti potvrđen je testom kolorimetrije (MTS testom) neposredno nakon kratkoročne inkubacije bleomicinom tijekom 2 h te kurkuminom slijedeća 2 h pri fiziološkim (37 °C) ili hipertermalnim (43 °C) uvjetima te nakon obrade stanica tijekom 24 sata. Analiziran je postotak tumorskih stanica u apoptozi i nekrozi na protočnom citometru te istražen genotoksični učinak komet testom. Kurkumin je pokazao da može zaustaviti proliferaciju stanica EAT u uvjetima *in vitro*, te da slabo povećava postotak stanica u apoptozi. Kombinacija s citostatikom bleomicinom i hipertermijom daje bolji antiproliferativni učinak koji se temelji na visokom postotku indukcije nekroze te potpunog lizi stanica.

(42 stranica, 8 slika, 4 tablica, 38 literarnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Ehrlichov ascitesni tumor, bleomicin, kurkumin, hipertermija

Voditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Duje Lisičić, doc; Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, doc.; Dr. sc. Goran

Kovačević, izv. prof.

Rad prihvaćen: 15.09.2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### **Antitumor efficacy of curcumin, bleomycin and hyperthermia on Ehrlich ascites tumor cells**

Matija Strujić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Chemotherapy is one of the most advanced and successful actions in the fight against cancer. Chemotherapy is used to stop proliferation and spreading of cancer cells, as well as to initiate apoptosis in cancer cells. Due to its necrotic nature chemotherapy usually causes damage to nearby healthy tissue. Flavonoids already have shown their capability to fight cancer cells and to prevent some damage to healthy cells. In this research curcumin (1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)hepta-1,6-dien-3,5-dion) was tested *in vitro* for its effect on Ehrlich ascites tumor (EAT) cells, their proliferation and the ability to initiate apoptosis/necrosis in the cells, and curcumin's effect in interaction with bleomycin and hyperthermia. EAT was grown in Swiss albino mice, the cells were isolated on the 7<sup>th</sup> day, they were incubated in the culture medium, and treated with curcumin, bleomycin and hyperthermia. The antiproliferative effect of the test components was confirmed by a colorimetry assay (MTT assay) after a short incubation directly with bleomycin for 2 h and curcumin next 2 h at physiological (37 °C) or hyperthermal (43 °C) conditions and after the treatment of cells for 24 hrs. I analyzed the percentage of tumor cells in apoptosis and necrosis in flow cytometry and studied genotoxic effects using comet assay. Curcumin demonstrated the potential to inhibit the proliferation of EAT cells *in vitro*, and to slightly increase the percentage of cells in apoptosis. The combination with cytostatic bleomycin and hyperthermia provides a better anti-proliferative effect which is based on the high percentage induction of necrosis and complete cell lysis.

(42 pages, 8 figures, 4 tables, 38 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Ehrlich ascites tumor, bleomycin, curcumin, hyperthermia

Supervisor: Dr. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: Dr. Duje Lisičić, Asst. Prof.; Dr. Sandra Radić Brkanac, Asst. Prof.; Dr. sc. Goran Kovačević, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 15.09.2015.

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	Biologija zloćudnih tumora.....	1
1.2	Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora.....	3
1.3	Stanične kulture kao eksperimentalni sustav.....	4
1.4	Polifenoli.....	6
1.4.1	Flavonoidi .....	6
1.4.2	Kurkumin .....	7
1.5	Citostatici.....	8
1.5.1	Podjela citostatika .....	9
1.5.1.1	Inhibitori mitoze .....	9
1.5.1.2	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari.....	10
1.5.1.3	Alkilirajući citostatici.....	11
1.5.1.4	Antimetaboliti.....	12
1.5.1.5	Hormoni i srodni spojevi .....	12
1.5.1.6	Kompleksi s platinom .....	12
1.5.1.7	Ostali citostatici .....	14
1.6	Hipertermija .....	14
1.6.1	Hipertermija i bleomicin.....	15
1.7	Apoptoza .....	16
1.8	Cilj rada.....	18
<b>2</b>	<b>MATERIJALI</b> .....	<b>19</b>
2.1	Pokusne životinje.....	19
2.2	Ehrlichov ascitesni tumor .....	19
2.3	Kultura stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora .....	19
2.4	Kurkumin .....	20
2.5	Bleomicin .....	20
2.6	MTS test kit.....	20
2.7	Kit za mjerenje apoptoze i nekroze .....	20
<b>3</b>	<b>METODE</b> .....	<b>21</b>
3.1	Nasađivanje stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT).....	21
3.2	MTS test.....	22
3.3	Analiza apoptoze i nekroze tumorskih stanica na protočnom citometru .....	23

3.4	Komet test .....	25
3.5	Statistička obrada podataka .....	25
4	<b>REZULTATI</b> .....	26
4.1	Rezultati MTS testa tijekom kratkotrajne inkubacije EAT stanica obrađenih bleomicinom (2 h) i kurkuminom (2 h) pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima .....	26
4.2	Rezultati MTS testa tijekom 24 h inkubacije EAT stanica nakon obrade bleomicinom i kurkuminom pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima.....	28
4.3	Rezultati nekroze tijekom 24 h inkubacije EAT stanica nakon obrade bleomicinom i kurkuminom pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima.....	30
4.4	Rezultati apoptoze tijekom 24 h inkubacije EAT stanica nakon obrade bleomicinom i kurkuminom pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima.....	32
4.5	Rezultati komet testa .....	34
5	<b>RASPRAVA</b> .....	35
6	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	38
7	<b>LITERATURA</b> .....	39



## **KRATICE**

AIF – apoptoza inducirajući faktor

BLM – bleomicin

CAD – kaspazno aktivirana DNaza

c-FLIP – stanični FLICE (FADD-slični IL-1 $\beta$ -konvertirajući enzim) inhibicijski protein

DIABLO – IAP vezujući protein s niskim pI

EAT – Ehrlichovog ascitesnog tumora

FADD – Fas-asocirani protein s domenom smrti

HSPs – protein toplinskog stresa

IAP – inhibitor apoptoze

ICAD – inhibitor kaspazno aktivirane DNaze

IKK – inhibitor kapa B kinaze

MHC – glavni histokompatibilni kompleks

MTS – test kolorimetrije

NF $\kappa$  $\beta$  – nuklearni čimbenik kapa B

PARP – poli (ADP-riboza) polimeraza

PDGF – trombocitni faktor rasta

PKC – protein kinaza C

RIP – receptor interakcije proteina

ROS – uzročnici oksidativnog stresa

Smac – sekundarni mitohondrijski proizveden aktivator kaspaze

TNF – tumor nekroznog faktor

TRADD – receptor proteina tumor nekroznog faktora tipa 1-asociranog s domenom smrti

VGEF – vaskularni endotelni faktor rasta

# 1 UVOD

## 1.1 BIOLOGIJA ZLOĆUDNIH TUMORA

Zloćudni tumor ili maligna neoplazma je bolest koju karakterizira nekontrolirana, autonomna, nenormalna, nesvršishodna i neprestana dioba zloćudno preobraženih stanica vlastitog organizma koja postoji i nakon djelovanja prvobitnog čimbenika koji je uzrokovao ovakav rast (Cooper i sur. 2004). Zloćudni tumori su invazivni, brzorastući, slabo ograničeni od okolnog tkiva i imaju sposobnost širenja organizmom stvaranjem metastaza putem krvnih i limfnih žila te tjelesnih šupljina. Svojim razarajućim i infiltrativnim rastom razaraju tkiva i organe, a svojim toksinima i raspadnim proizvodima metabolizma oštećuju čitavi organizam. Građeni su od parenhima i strome. Parenhim je sastavljen od zloćudno preobraženih stanica, a stromu čini vezivno-tkivna osnova koja predstavlja potporni okvir tumorskim stanicama te istovremeno osigurava opskrbu krvi. Stroma tumora nastaje od postojeće vezivno-tkivne strome okolnog, normalnog tkiva te proliferira pod utjecajem različitih čimbenika rasta koje izlučuju stanice parenhima tumora.

Tumori su monoklonskog podrijetla budući da nastaju od jedne transformirane stanice. Većinom je potrebno više od jedne mutacije da se pokrenu promjene koje rezultiraju zloćudnom transformacijom stanice. Mutacije u vlastitoj DNA mogu biti uzrokovane kemijskim čimbenicima, zračenjem, infektivnim čimbenicima, nasljednim čimbenicima ili pak mogu nastati spontano kao rezultat grešaka nastalih tijekom replikacije DNA. Nastanak zloćudnog tumora je povezan s poremećenim odgovorom na kontrolne mehanizme normalnog rasta stanica kao posljedica poremećene ekspresije odnosno inaktivacije, mutacije ili gubitka gena koji reguliraju stanični ciklus. Pritom su posebno važni protoonkogeni koji reguliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu te tumor supresorski geni (npr. p53, Rb) koji inhibiraju stanični ciklus i sudjeluju u nadzoru popravka oštećenja DNA. Prema funkciji proteina koje kodiraju, razlikujemo slijedeće protoonkogene: faktori rasta (npr. PDGF), receptori (npr. ErbB2), G-proteini (npr. Ras), protein kinaze (npr. Raf, Src, Abl, Jak), faktori transkripcije (npr. Ets, Fos, Jun, Myc) te regulatori staničnog ciklusa i stanične smrti (npr. Cdk, Bcl-2, Mdm2). Aktivacija protoonkogeni u onkogene i inaktivacija ili gubitak tumor supresorskih gena su osnovne kategorije genetskih promjena koje uzrokuju nekontroliranu diobu stanica i dovode do razvoja zloćudne bolesti. Mehanizmi aktivacije protoonkogeni u onkogene su točkasta

mutacija, kromosomska translokacija i amplifikacija gena. Točkasta mutacija podrazumijeva zamjenu jednog nukleotida drugim unutar protoonkogenena. Kod kromosomske translokacije dolazi do premještanja odlomljenog dijela kromosoma na drugi kromosom. Amplifikacija gena podrazumijeva njegovu prekomjernu aktivnost. Onkogeni kodiraju modificirane faktore rasta ili njihove receptore ili dijelove unutarstaničnih signalizacijskih procesa putem kojih faktori rasta reguliraju staničnu proliferaciju odnosno kodiraju sintezu proteina čija je uloga stimulacija proliferacije tumorskih stanica. Pored genetskih promjena, na razvoj zloćudnog tumora utječu i brojni epigenetski čimbenici (npr. promotori, ko-kancerogeni, hormoni), koji sami za sebe ne uzrokuju zloćudnu bolest, ali povećavaju mogućnost da posljedica genetske mutacije bude zloćudna promjena (Šamića i sur. 2006).

Složen i višestupanjski proces razvoja tumora naziva se kancerogeneza, a sastoji se od stadija inicijacije, promocije, progresije i zloćudne preobrazbe. Inicijacija je posljedica međureakcije kancerogena i stanične DNA koja može rezultirati prekidom lanca DNA ili promjenom nukleotida koju nazivamo aduktom. Adukti mogu nastati direktno ili nakon metaboličke aktivacije kancerogena. Ukoliko se nastale promjene ne poprave prije replikacije DNA, dolazi do trajnog oštećenja odnosno mutacije gena. Smatra se da je samo mala populacija stanica, koja ima sposobnost diobe i služi za obnovu normalnog tkiva, podložna zloćudnoj preobrazbi. Promocija predstavlja proliferaciju iniciranih stanica u višestaničnu tvorevinu koja ima potencijal da postane zloćudna. Progresija se sastoji od postupne evolucije tumorskih stanica u kojem one postaju progresivno sve zloćudnije.

Značajke zloćudnih tumora su nekontrolirana proliferacija, gubitak diferencijacije i funkcije stanica, smanjena apoptoza, autonoman rast, angiogeneza, genetska nestabilnost, invazivnost i metastaziranje. Proliferacija zloćudnih stanica nije pod kontrolom procesa koji normalno reguliraju diobu stanica i rast tkiva. Nekontroliranoj proliferaciji prethode promjene u faktorima rasta i njihovim receptorima, promjene u unutarstaničnim putovima signalizacije koji kontroliraju stanični ciklus i apoptozu, promjene u ekspresiji telomerase te promjene u lokalnim krvnim žilama kao rezultat tumorom usmjeravane angiogeneze. Osobine tumorskih stanica unutar istog tumora su heterogene. Tome doprinose brojne mutacije, različit stupanj diferencijacije te različita opskrbljenost hranjivim tvarima kao posljedica neravnomjernog rasta krvnih žila u tumoru. Tumorske stanice su genetski nestabilne i stoga su podložne mnogim mutacijama tijekom rasta. Pritom su mnoge promjene letalne ili uzrokuju smanjen rast u odnosu na susjedne stanice pa se takvi supklonovi izgube iz populacije stanica tumora. Neke mutacije pridonose većoj autonomiji i prednosti u rastu pa predstavljaju zloćudne supklonove koji

postaju dominantni. Stoga, selekcija mutiranih supklonova, koji pokazuju proliferativne prednosti, može uzrokovati progresiju tumora s izraženijim zloćudnim osobinama. Tumorska angiogeneza odnosno stvaranje novih od već postojećih krvnih žila nastaje posredstvom faktora rasta proizvedenih u rastućim tumorima. Hipoksija i gubitak glukoze omogućuju napredovanje tumora, dok nedostatak ATP-a rezultira njegovom nekrozom. Hipoksija djeluje kao poticaj za angiogenezu na način da inducira ekspresiju brojnih gena. Neki proizvodi tih gena sudjeluju u povećanju opskrbe kisikom (npr. eritropoetin, transferin), drugi pomažu u povećanju anaerobnog metabolizma stanica (npr. proteini koji sudjeluju u procesu glikolize i prijenosu glukoze), dok ostali izravno ili neizravno potiču stvaranje novih krvnih žila (npr. VEGF).

Metabolizam i biokemijski procesi u tumorskim stanicama nisu specifični samo za tumore, već su većinom odraz njihova stupnja diferencijacije. Jedna od zajedničkih karakteristika je sklonost anaerobnoj glikolizi i stvaranju mliječne kiseline u uvjetima dovoljne količine kisika. Smatra se da je ovo posljedica oštećenja mitohondrijskog genoma i neučinkovite natrijeve pumpe koja za svoju aktivnost zahtijeva prevelike količine ATP-a i time stimulira glikolizu. Tumorske stanice ne podliježu kontaktnoj inhibiciji rasta, što je posljedica promjene staničnih membrana tumora. Osim toga, gubitak kohezije i smanjena adhezivnost, koja je posljedica nedostatka površinskih adhezivnih molekula, olakšava lokalnu invazivnost i metastaziranje tumora. Nadalje, tumorske stanice su znatno manje ovisne o serumskim faktorima rasta u odnosu na normalne stanice. Naime, vlastiti onkogeni proizvodi mogu stimulirati jezgru tumorske stanice na mitozu, tumorska stanica može sintetizirati receptore za faktore rasta koji se već nalaze u njezinoj okolini ili pak tumorska stanica može sama sintetizirati faktore rasta za koje već posjeduje površinske receptore. Također, važno je naglasiti i sposobnost neprestane diobe tumorskih stanica zahvaljujući enzimu telomerazi koji tijekom svake mitoze obnavlja kromosomske telomere pri čemu ne dolazi do njihovog skraćivanja kao kod normalnih stanica (Rang i sur. 2003; Cooper i sur. 2004; Tannock i sur. 2004; Kleinsmith 2006; McKinnell 2006).

## **1.2 STANICE EHRLICHOVOG ASCITESNOG TUMORA**

Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) brzo rastu u skoro svim sojevima miševa. EAT se pojavljuje u dva oblika, ascitesnom ili solidnom, te ubija domaćina čak i kad se transplantira u iznimno malim dozama. Jedna od najvažnijih karakteristika tih stanica, koja je neophodna za formiranje djelotvornog staničnog imunološkog odgovora i nespecifičnih upalnih reakcija, je njihova sposobnost da migriraju u upalna područja. Korištenjem životinjskih modela,

istraživanja su pokazala da niz tumorskih stanica može proizvesti faktore koji smanjuju upalne reakcije, što omogućava rast tumora *in vivo*. To se objašnjava nedostatkom ekspresije glavnog histokompatibilnog kompleksa (engl. major histocompatibility complex; MHC). Ta karakteristika vjerojatno uvelike isključuje ulogu citotoksičnih T limfocita tijekom razvoja tumora, što ukazuje da stanični imunitet nije glavni mehanizam imunološke reakcije domaćina.

### 1.3 STANIČNE KULTURE KAO EKSPERIMENTALNI SUSTAV

Sami početci kultiviranja tkiva *in vitro* datiraju još iz 1907. godine, kada je Harrison izolirao te potom kultivirao komadić tkiva iz medularnog kanala žabljeg embrija. Kulturu je uspio održati svega nekoliko tjedana zbog kontaminacije i neadekvatnih eksperimentalnih uvjeta.

Kasnije, 1912. godine Carrel uvodi sterilne uvjete, ali zbog nedostatka odgovarajućih hranjivih sastojaka, kulture tkiva je bilo nemoguće održavati kroz dulje vremensko razdoblje.

Stanična je kultura kao eksperimentalna metoda prihvaćena 1952. godine kada je uz pomoć enzima tripsina pripravljena jednoslojna kultura stanica. Na taj način je omogućena priprema staničnih monokultura, a time i kvantitativno mjerenje staničnog rasta. Eagle, 1955. godine utvrđuju da je stanicama u kulturi za rast potreban definirani medij koji se sastoji od najmanje 13 esencijalnih aminokiselina, 8 vitamina, glukoze, soli te seruma sisavaca (<http://www.coriell.org/research-services/cell-culture/what-is-cell-culture>).

Stanične kulture se dijele na primarne kulture, stanične linije i stanične sojeve. Primarna kultura se priprema iz stanica, tkiva ili organa koji su uzeti izravno iz organizma. Stanična linija se dobiva iz primarne kulture subkultivacijom.

Primarne kulture se pripremaju iz normalnog ili tumorskog tkiva. Stanične linije nastaju diferencijacijom i transformacijom primarnih staničnih kultura. Transformacija je fiziološka adaptacija i ne nastaje zbog mutacija.

Stanične kulture možemo podijeliti na stanične suspenzije i adherirajuće kulture.

Stanične suspenzije nalaze se više ili manje ravnomjerno raspoređene u staničnoj suspenziji dok se adherirajuće stanične kulture vežu na podlogu (<http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>).

Stanična kultura je kao eksperimentalna metoda prihvaćena tek 1952. godine kada je Dulbecco uspio iz tkiva izolirati stanice pomoću tripsina. Standardizacija uvjeta kultivacije i uspostava

staničnih linija, a posebno proizvodnja velikog broja stanica prikladnih za biokemijska istraživanja dali su značajan doprinos razvoju moderne tehnologije kulture tkiva (Freshney 1987).

Kultura stanica je kultura dobivena od resuspendiranih stanica uzetih iz originalnog tkiva, iz primarne kulture ili stanične linije. Stanice u monosloju se odvajaju od podloge djelovanjem enzima (tripsin) i nakon razrjeđivanja ponovno nasađuju ili sub-kultiviraju u novim bocama za uzgoj ili petrijevim zdjelicama. Stanice *in vitro* kao model fiziološke funkcije *in vivo* često prolaze kroz cijeli niz promjena u okolišu stanice: stanice *in vitro* imaju smanjeno međudjelovanje stanice sa staničnim matriksom, gube heterogenost i trodimenzionalnu arhitekturu, zbog nedostatka homeostatskih procesa regulacije *in vivo* (endokrini i tkivni sustav), stanični metabolizam je stabilniji i uglavnom ide preko glikolize dok ciklus limunske kiseline ima manju ulogu u ukupnom energetske metabolizmu stanice. Stanice u kulturi žive, rastu i dijele se, odnosno metabolički su aktivne prolazeći kroz različite faze staničnog ciklusa. S obzirom na to u kojoj fazi staničnog ciklusa se stanična populacija nalazi, rast kultura dijelimo na sinkroni i asinkroni rast. Asinkrona stanična populacija je ona u kojoj se svaka stanica nalazi u drugoj fazi staničnog ciklusa. Nakon presađivanja, mogu se razlikovati tri faze asinkronog rasta; faza zastoja ili prilagodbe (lag-faza), eksponencijalna faza ili faza logaritamskog rasta (log-faza) i stacionarna faza ili plateau faza (Freshney 1987).

Faza zastoja praćena je pričvršćivanjem stanica za podlogu i prilagodbom na nove uvjete. Stanice se u toj fazi ne razmnožavaju, ali su metabolički aktivne. Eksponencijalna faza je faza učestalih dioba. Vrijeme umnožavanja stanica u ovoj fazi gotovo je identično vremenu diobe stanica diobenog ciklusa. U ovoj fazi se izračunava vrijeme umnožavanja ili duplikacijsko vrijeme ( $T_2$ ). Pri kraju eksponencijalne faze rasta vrijeme umnožavanja se usporava. U stacionarnoj fazi rasta broj stanica se više ne mijenja. Stanice izlaze iz diobenog ciklusa i ulaze u fazu mirovanja ( $G_0$ - faza); prebacivanjem stanica u svježi medij, stacionarne stanice mogu opet ući u diobeni ciklus i to počevši s  $G_1$  fazom (Freshney 1987).

Bez obzira na nedostatke stanične kulture kao model imaju i brojne prednosti: brzo umnožavanje stanica omogućava brzo i ponovljivo dobivanje rezultata, održavanje stanica je prilično jeftino, lako se održavaju i pohranjuju u tekućem dušiku ili zamrzivaču na  $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$  prema potrebi.

## 1.4 POLIFENOLI

Polifenoli su strukturna skupina prirodnih, sintetičkih te polusintetičkih organskih molekula koje su okarakterizirane prisustvom velikog broja fenolnih strukturnih jedinica.

Ime im je izvedeno iz poli, od grčke riječi polis, što znači “mnogi“ te riječi fenol koja označava kemijsku strukturu nastalu vezivanjem benzena te hidroksilne (-OH) skupine. Fenolni spojevi su fitokemikalije odnosno sekundarni biljni metaboliti koji su široko rasprostranjeni u biljnom carstvu, te se ovisno o strukturi generalno mogu razvrstati u tri razreda.

Prvi razred obuhvaća fenoličnu kiselinu, polifenole te monofenole. Drugi razred obuhvaća polimerizirane fenolične spojeve kao npr. kondenzirane tanine, lignane i lignine. Treći razred obuhvaća fenolične derivate, uključujući jednostavne fenole, fenilpropanoide, derivate benzilne kiseline, stilbene te flavonoide (Weng i Yen 2012).

Već je poznato da su protutumorske tvari izolirane iz biljaka i njihovi derivati efikasni u borbi protiv tumora, polifenoli tvore jednu od najvažnijih i najkorištenijih skupina spojeva biljnog podrijetla koje se koriste u prevenciji i terapiji tumora (Ali i sur. 2012).

### 1.4.1 FLAVONOIDI

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se u prirodnom obliku nalaze u hrani i biljnim organizmima te utječu na mnoge bolesti u čovjeka. Imaju različite biološke aktivnosti, od protualergijskih, protuoksidativnih, protuupalnih do neutralizacije slobodnih radikala a mogu djelovati i protumutacijski.

Istraživanja su dokazala da su flavonoidi jaki inhibitori ključnih enzima koji igraju važnu ulogu u prijenosu signala. Oni inhibiraju nekoliko kinaza kao što su protein kinaza C (PKC), tirozin kinaze ili lipidne kinaze, te djeluju na različite metaboličke puteve kao što su aktivacija glikolitičkih enzima ili sinteza proteina, blokiraju stanični ciklus u G0/G ili G1/M fazi. Što ovisi o njihovoj strukturi te modelu stanice na koju djeluju. Flavonoidne sastavnice pokazuju izrazit protutumorski učinak temeljen na njihovim antioksidativnim svojstvima, inhibiciji prooksidativnih enzima (ciklooksigenaza, lipooksigenaza, ksantin oksidaza), inhibiciji prijenosa signalnih molekula, modulaciji aktivnosti onkogeni, poticanju procesa apoptoze/nekroze, promjeni redoks stanja stanica tumora, inhibiciji angiogeneze te enzima metaloproteinaza, telomeraza i topoizomeraza, ornitin dekarboksilaza, sinteze poliamina, kao i

brojnih kinaza (protein tirozin kinaza, cAMP-ovisnih protein kinaza, fosfoinozitol 3 kinaza, mitogen aktiviranih protein kinaza, ciklin–ovisnih kinaza) uključenih u proliferaciju stanica (Oršolić i Bašić 2007). Također, pokazano je da inhibicijom prooksidativnih enzima flavonoidnim sastavnicama dolazi do inhibicije angiogeneze te odlaska stanica u apoptozu.

Dosadašnja istraživanja bioaktivnosti flavonoida dokazale se jako protuvirusno djelovanje. Flavonoidi s najvećim protuvirusnim učincima su svakako krizin i galagnin koji se koriste u borbi protiv virusa imunodeficijencije kod ljudi (Critchfield i sur. 1996). Kvercetin, hesperidin i katehin su inhibitori virusa *Herpes simplex*, polio-virusa i virusa parainfluence.

Dokazano je međudjelovanje flavonoida s estrogenom tipa II vezivanjem na vezna mjesta u svrhu regulacije staničnog rasta, a također potiču i apoptozu različitih staničnih linija. Neki flavonoidi su selektivniji prema tumorskim stanicama i mogu imati potencijal u smanjenju popratnih štetnih učinaka u usporedbi sa ostalim lijekovima.

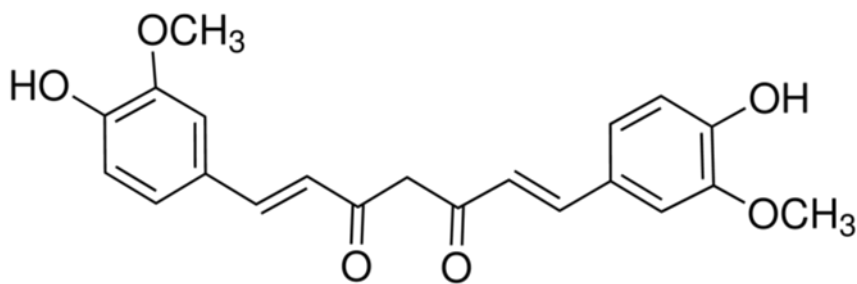
S obzirom da ljudi flavonoide unose u velikim količinama svakodnevnom prehranom logično je i razmišljanje o njihovoj primjeni i mogućim učincima tijekom kemoterapije. Flavonoidi svojim djelovanjem mogu pojačati protu-proliferativni učinak nekih kemoterapeutika. Gotovo je sigurno da će se mnoge njihove, danas još nepoznate, osobine tek otkrivati u budućnosti.

#### **1.4.2 KURKUMIN**

Karcinom je najčešći uzrok smrtnosti u razvijenim državama, stoga je cilj mnogih istraživanja usmjeren ka pronalasku prirodnih i sintetskih spojeva učinkovitih u njegovoj prevenciji i/ili liječenju. Prehrana značajno utječe na zdravstveno stanje te nastanak i razvoj kroničnih bolesti. Hrana može sadržavati sastojke s protutumorskim djelovanjem, ali i mutagene i/ili kancerogene tvari. Pokazano je da kurkumin ima višestruko antikancerogeno djelovanje, uključujući i inhibiciju proliferacije, indukciju apoptoze, inhibiciju angiogeneze i inhibiciju DNA topozomeraze II. Kurkumin (1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)hepta-1,6-dien-3,5-dion) je polifenol koji se nalazi u biljci *Curcuma longa*, te je osnovni sastojak curry-a. Koristi se kao dodatak hrani, naziva E-100, zbog svoje žarke žute boje. U proteklih nekoliko godina kurkumin se sve češće dovodi u kontekst kao tvar sa farmakološkom aktivnošću, vrlo često zbog svojih anti-oksidativnih svojstava, a posebno se ističe njegov protutumorski učinak. Njegov protutumorski učinak potvrđen je kod tumora debelog crijeva, dojke, glave i vrata, pluća i prostate. Protutumorska aktivnost kurkumina javlja se zbog njegovog inhibitornog utjecaja na



kompleks transkripcijskog čimbenika, nuklearnog čimbenika kappa B ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ), koji kontrolira transkripciju DNA (prepisivanje) i igra ključnu ulogu u regulaciji aktivacije brojnih gena uključujući i gene čiji produkti sudjeluju u lokalnoj upali te općenito u regulaciji imunskog odgovora, te ima (anti-)apoptički utjecaj i utječe na radiorezistenciju i kemorezistenciju. Kurkumin direktnom inhibicijom IKK (inhibitora kappa B kinaze) ili aktivacijom uzvodnih promotora IKK inhibira  $\text{NF}\kappa\text{B}$ . Kurkumin inhibicijom  $\text{NF}\kappa\text{B}$  smanjuje upalni proces i vodi povećanju apoptoze, ključnom procesu u protutumorskom djelovanju. Temeljem navedenog kurkumin postaje jedan od boljih izbora za sprečavanje rasta tumora povezanih s upalom kao što je Ehrlichov ascitesni tumor (EAT). Nadalje brojni podaci ukazuju da kurkumin može imati kemosenzitivni učinak. Stoga cilj ovog istraživanja je na modelu stanične kulture stanica EAT istražiti kemiosenzitivnu sposobnost kurkumina združenog s kemoterapeutikom bleomicinom u fiziološkim ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ili hipertermalnim uvjetima ( $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) uvjetima.



Slika 1. Strukturna formula kurkumina

## 1.5 CITOSTATICI

S obzirom da su tumori izrazito nestabilne i komplicirane tvorbe, u njihovu liječenju koriste se različite metode i njihove kombinacije. Najčešća metoda je kirurško odstranjivanje primarnog tumora, u slučajevima kada je klinička slika povoljna. Ipak, često je potrebno primijeniti i druge terapije poput radioterapije, imunoterapije, stimulacije stanica hematopoeze, indukciju diferencijacije u tumorskom tkivu, inhibiciju angiogeneze te terapije citostaticima.

Citostatici su lijekovi koji uništavaju zloćudne stanice, koče njihov rast i diobu. Oni ne djeluju selektivno, samo na tumorske stanice, nego mogu oštetiti i zdrave stanice u tijelu, naročito one koje se brzo dijele: krvne stanice, sluznicu probavnog sustava, spolne stanice, folikul kose.

Poznato je da su citostatici otrovni spojevi i da imaju kancerogeni, mutageni i teratogeni potencijal. Medicinsko osoblje koje je u stalnom kontaktu sa citostaticima, izloženo je otrovnim tvarima putem inhalacije i apsorpcijom preko kože. Višegodišnji rad s opasnim tvarima-citostaticima kod medicinskog osoblja može izazvati različite zdravstvene poteškoće: promjene na DNA, promjene na koži, alergijske reakcije, mutagenost u mokraći, disfunkciju reproduktivnih organa (oštećenja jajnika), itd. (Krešić 2009).

Kod primjene citostatika postoji mogućnost razvoja rezistencije na lijek zbog neodgovarajućeg načina primjene, nedovoljne koncentracije lijeka ili nastajanja inaktivirajućih protutijela. S obzirom na kompleksnu građu tumora i njegovu nestabilnost, može doći do mutacija stanica tumora te, posljedično do eliminacije lijeka iz stanice aktivnim prijenosom, inaktivacije lijeka enzimima, kvalitativnih i kvantitativnih promjena stanične strukture, pojačane obnove DNA stanica tumora i razvoja sekundarnih tumora uslijed karcinogenog učinka citostatika oštećenjem DNA. Rezistencija se može izbjeći primjenom kombinacije kemoterapeutika ili lokalnom primjenom visokih doza lijeka. Kombinacijom citostatika različitog djelovanja se postiže sinergistički učinak i brže, selektivnije citotoksično djelovanje na stanice tumora, a smanjuje se mogućnost rezistencije tumora na pojedini citostatik.

### **1.5.1 PODJELA CITOSTATIKA**

Citostatike možemo podijeliti na inhibitore mitoze, antitumorske antibiotike, alkilirajuće citostatike, antimetabolite, hormone i srodne spojeve, komplekse s platinom i ostale spojeve.

#### **1.5.1.1 INHIBITORI MITOZE**

Inhibitori mitoze dijeljenje stanica raka spriječeno je inhibicijom mitoze. U ovu skupinu ubrajamo kolhicin, taksane i vinca alkaloide.

Kolhicin je iscrpak mrazovca (*Colchicum autumnale*) čije je antitumorsko djelovanje poznato još iz antičkih vremena. Inhibira mitozu u metafazi, stoga ga se može nazvati mitotskim otrovom. Nakon uzimanja kolhicina, simptomi se javljaju kroz 2-5 sati i slični su trovanju arsenom (akutni gastroenteritis, povraćanje, dijareja). Za odraslog čovjeka letalna doza je 20 mg, protuotrova nema.

Vinca alkaloidi (alkaloidi zimzelena) su alkaloidi iz vrsta *Vinca rosea Linnaeus* i *Catharanthus rosea*. Alkaloidi vinblastin, vinkristin i vindesin su komplicirane građe, od katarantinskih i

vindolinskih prstenastih sustava. Inhibiraju dijeljenje stanica u metafazi te inhibiraju sintezu DNA i RNA. Vinblastin je najdjelotvorniji, a vinkrisitin najtoksičniji; neurotoksičnost ovisna o dozi.

Taksani su inhibitori u koje ubrajamo paklitaksel i docetaksel.

Paklitaksel je izvorno izoliran iz pacifičke tise (*Taxus brevifolia*) 1960. godine, a danas se može dobiti i iz drugih europskih biljaka poput *Taxus baccata* (obična tisa). Javlja se problem isplativosti i ekonomičnosti u proizvodnji lijeka, s obzirom da treba posjeći 4 drveta vrste *Taxus baccata* kako bi se izolirala dovoljna količina za pripremu jednodnevne doze lijeka. U stanici se paklitaksel veže na tubulin, što dovodi do toga da se mikrotubuli usmjere paralelno, a ne na način potreban za mitozu na mitotsko vreteno, čime je spriječena mitozna. Za razliku od Vinca alkaloida ne izaziva depolimerizaciju. Paklitaksel je izrazito lipofilan spoj koji ne tvori stabilne soli s kiselinama i bazama.

Docetaksel se primjenjuje intravenozno, u polisorbata 80%-tnoj otopini. Koristi se kod karcinoma krvi, cerviksa, pluća, ovarija, malignog melanoma i ne-Hodgkinovog limfoma.

#### **1.5.1.2 CITOTOKSIČNI ANTIBIOTICI I NJIMA SRODNE TVARI**

Imaju različite mehanizme djelovanja, ali većina se ubacuje (interkalira) između parova baza u DNA i narušava sintezu i/ili funkciju nukleinskih kiselina, dok neki izazivaju lomove u DNA i inhibiciju enzima DNA-topoizomeraze II (Page i sur. 2002). Aktinomicin D inhibira sintezu mRNA čime je onemogućena i sinteza proteina (Vig 1977; Lenhard i sur. 2001; Page i sur. 2002). Aktinomicin D je izoliran 1940. iz *Actinomyces* (Waksman) i strukturno predstavlja tzv. kromopeptid (kromofor-fenoksazonski derivat), koji je povezan sa različitim cikličkim peptidnim lancima. Koristi se kod tumora mokraćnog mjehura i korionetskog tumora.

Ovdje ubrajamo i skupinu antraciklina, koja je glavna skupina antineoplastičnih tvari koje su izolirane iz gljivice *Streptomyces peucetius*. Do danas je sintetizirano stotine strukturnih analoga, ali u kliničkoj uporabi su samo daunorubicin, doksorubicin, idarubicin i epirubicin.

Antraciklinski antibiotici doksorubicin i daunomicin vežu se na dvolančanu molekulu DNA i umetanjem između lanaca remete sintezu i DNA i RNA, inhibiraju DNA-topoizomerazu II, izazivaju dvolančane i jednolančane lomove u DNA te stvaranje slobodnih radikala. Doksorubicin također alkilira makromolekule, potiče stvaranje slobodnih radikala koji dodatno

oštećuju DNA (Page i sur. 2002; Henke 2005) i vrlo je kardiotoksičan. Doksorubicin djeluje ubacivanjem između dvostrukih lanaca DNA, čime inhibira sintezu, smanjuje količine reduktaze na membrani, čime dolazi do stvaranja slobodnih radikala i toksičnosti te utječe na funkcije membrane.

Daunorubicin može inhibirati aktivnost enzima polimeraze i utječe na regulaciju ekspresije gena (Gewirtz 1999). Doksorubicinu su strukturno i funkcionalno srodni epirubicin i mitoksantron, a daunorubicinu idarubicin. Epirubicin je analog doksorubicina, sa sličnim djelovanjem, ali je manje toksičan. Idarubicin ima dulje vrijeme poluživota od doksorubicina i epirubicina.

Bleomicin je mješavina peptida male molekularne mase. Veže se na DNA te nakon stvaranja kompleksa sa željezom izaziva brojne jednolančane i dvolančane lomove koji dovode do fragmentiranja DNA. Osim toga, aktivira kisik pri čemu nastaje superoksid radikal. Uzrokuje inhibiciju sinteze DNA, a u manjoj mjeri utječe na inhibiciju sinteze RNA i proteina (Vig i Lewis, 1978; Povirk i Austin 1991; Erexson i sur. 1995; Page i sur. 2002).

Mitomycin C nakon aktiviranja u stanici djeluje kao alkilirajući agens uzrokujući ukriženo povezivanje lanaca. Potiče stvaranje slobodnih radikala i lomova u DNA. Inhibira sintezu i funkciju DNA, a u višim koncentracijama i RNA (Lenhard i sur. 2001; Page i sur. 2002; Henke 2005).

### **1.5.1.3 ALKILIRAJUĆI CITOSTATICI**

Alkilirajući spojevi obično prenose jednu ili više alkilnih skupina 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. Oni imaju znatno veći učinak na brzo rastuće stanice; zbog nastalih oštećenja stanica i nemogućnosti popravka odlaze u smrt apoptozom.

Predstavnici ove skupine su: dušikovi plikavci (ciklofosfamid, klorambucil, melfalan), alkilsulfonati (busulfan), derivati nitrozureje (karmustin, lomustin), etilenimini (trietilenmelamin, heksametilmelamin, tiofosforamid).

#### **1.5.1.4 ANTIMETABOLITI**

Antimetaboliti interferiraju sa sintezom nukleinskih kiselina. Dije se na sljedeće skupine: analozi folne kiseline koji inhibiraju pretvaranje folne kiseline u tetrahidrofolnu kiselinu vežući se na aktivno mjesto enzima dihidrofolat reduktaze. Predstavnik je metotreksat te analozi pirimidina (5-fluorouracil i citarabin), analozi purina (6-merkaptopurin kao sumporni derivat hipoksantina, tiogvanin, azatioprin-derivat 6-merkaptopurina, fludarabin fosfat, pentostatin i kladribin).

#### **1.5.1.5 HORMONI I SRODNI SPOJEVI**

Za rast nekih tumora potrebna je određena hormonalna aktivnost, a korištenjem njihovih antagonista može se inhibirati rast tumora. Smatra se da je 30% svih karcinoma pod utjecajem spolnih hormona, posebice tumori dojke, prostate i endometrija. U liječenju se koriste inhibitori hormona ili antagonist hormona koji potiče rast tumora.

U ovu skupinu citostatika ubrajamo adrenokortikosteroide, aminoglutetimide, progesterone, estrogen i androgene, antiestrogene, analoge gonadotropnog hormona i nesteroidne antiestrogene. Najpoznatiji predstavnik antiestrogena je tamoksifen, a od nesteroidnih antiandrogena flutamid.

#### **1.5.1.6 KOMPLEKSI S PLATINOM**

Kompleksi s platinom su planarni diaminski kompleksi kod kojih dvovalentna platina ( $Pt^{2+}$ ) čini centralni atom. Djelatni oblik je elektrofilni kompleks koji nastaje unutarstanično i sprječava povezivanje DNA lanaca te posljedično, diobu stanica.

Primjenjuju se kod različitih oblika tumora, a moguće štetne posljedice uzimanja lijeka su oštećenje i otkazivanje bubrega. U ovu skupinu ubrajamo cisplatinu i karboplatinu.

Karboplatina je strukturno ciklobutan dikarboksilatni prsten, ligandno vezan s Pt na kojoj su vezani još dva  $NH_3$ . Zbog zamjene dva Cl, karboplatina je stabilnija od cisplatinine. Treba joj više vremena da počne djelovati od cisplatinine, ali zato djeluje dulje. Manje je potentan lijek od cisplatinine i većinom se izlučuje urinom, s poluvremenom života 2-6 sati.

Cisplatina je jedan od najčešće primjenjivanih citostatika danas. Ima platinski kompleks s dva Cl atoma sa amonijakom. Cisplatina (cis-diamminedichloridoplatinum) je dvovalentni, anorganski, u vodi topivi kompleks s platinom sintetskog podrijetla.

Koristi se za terapiju raznih tumora uključujući: sarkom, tumor pluća, limfom, tumor jajnika, cerviksa, prostate, testisa, bronhija, vrata i glave, i melanoma. Iako ga često smatraju alkilirajućim lijekom, ne sadrži alkilnu skupinu i ne potiče alkilirajuće reakcije, stoga je pravilno reći da je cisplatina lijek s mehanizmom djelovanja sličnim alkilirajućim tvarima. Njezina sličnost sa alkilirajućim tvarima očituje se u činjenici da kovalentno povezuje uzvojnice DNA, inhibira sintezu DNA te zaustavlja rast stanice, a učinci tog unakrsnog vezivanja najviše su izraženi u S fazi. Druga imena koja se koriste za cisplatinu su DDP, cisplatinum i CDDP (cis-diamminedichloridoplatinum(II)).

Uvođenje cisplatine u široku kliničku upotrebu dovelo je do značajnog napretka u kemoterapijskom liječenju, rezultati liječenja kemoterapijom su poboljšani te su postali ujednačeni. Cisplatina sadrži kompleks Pt koji ulazi u stanice difuzijom i oštećuje heliks DNA. Atomi klora ulaze u reakciju s nukleofilima, te pozitivno nabijena molekula reagira sa nukleinskim kiselinama i proteinima.

Cisplatina je pokazala u *in vitro* i *in vivo* uvjetima značajno sinergističko djelovanje s većinom drugih citostatika. Iako nije najučinkovitija među pojedinačno primijenjenim citostaticima, jedan je od najšire i najviše primjenjivanih citostatika u kemoterapijskim protokolima.

Citotoksičnost cisplatine određena je ravnotežom između enzimske stanične obnove, oštećene DNA i opsega međusobnih veza DNA. Enzimski popravak mostova koji su nastali zbog djelovanja cisplatine uključuje izsjecanje zahvaćene baze, ubacivanje nove baze i ponovno formiranje oštećene baze enzimima (Kopjar i sur. 2002).

Cisplatina reagira prvenstveno na N-7 položaj gvanina i stvara različite jednostruke i dvostruke mostove. Prvi korak je stvaranje jednostrukih veza, koje mogu dalje reagirati i stvarati dvostruke unakrsne veze unutar lanca DNA ili između dva lanca. Najčešća dvostruka oštećenja koja izaziva cisplatina na lancu DNA *in vitro* su d(GpG)Pt, d(ApG)Pt i d(GpNpG)Pt, a međulančane veze između gvanina smještenih na suprotnim stranama lanaca nastaju u manje od 5% slučajeva. Ove veze sprječavaju stanične procese kod kojih dolazi do međusobnog odvajanja lanaca DNA, kao što su replikacija i transkripcija (Eastmen 1987).

Dokazano je da vezanje platine na DNA izaziva različite poremećaje u dvostrukom heliksu DNA, uključujući uvijanje za 26 do 50 stupnjeva između povezanih gvaninskih baza, zakrivljavanje osi heliksa i odmotavanje DNA. Nadalje, proteini koji u normalnim uvjetima sudjeluju u popravku DNA kao npr. polimeraze, ne prepoznaju ove hidrofobne mostove; drugi proteini koji prepoznaju oštećenu DNA postaju aktivni i pokreću programiranu smrt stanica tj. apoptozu (Zamble i Lippard 1999).

Redoslijed događaja koji vode do stanične smrti nakon stvaranja veze platina-DNA nije još dovoljno istražen, međutim stanice obrađene s cisplatinom izražavaju biokemijska i morfološka obilježja apoptoze (Sorenson i Eastman 1988).

Osjetljivost stanica na cisplatinu ovisna je i o staničnom ciklusu; stanice u proliferaciji su osjetljivije za razliku od stanica u G0 ili G1 fazi (Evans i Dive 1993).

#### **1.5.1.7 OSTALI CITOSTATICI**

Uz nabrojane citostatike postoji veliki broj lijekova koji se ne mogu svrstati niti u jednu od navedenih skupina, te se prikazuju odvojeno. Među najvažnijima su:

- prokarbazin koji se veže na DNA
- dakarbazin (derivat antracenediona), inhibira sintezu DNA i RNA
- amsakrin koji stimulira aktivnost topoizomeraze i cijepa DNA
- L-asparaginaza koja cijepa asparaginsku kiselinu koja je potrebna tumorskim stanicama
- heksametilmelamin koji je najbliži alkilirajućim citostaticima

#### **1.6 HIPERTERMIJA**

Pod utjecajem hipertermije nastaju strukturne i funkcionalne promjene stanica. Zbog porasta stanične permeabilnosti dolazi do povećanja pasivnog transporta. Mikrotubuli, koji sudjeluju u tvorbi diobenog vretena, pod utjecajem hipertermije se raspadaju te uzrokuju smrt stanica u fazi mitoze. Oštećenje mikrotubula objašnjava termosenzitivnost stanica u mitozu. Nadalje, hipertermija potiče bubrenje, pucanje i gubitak funkcije mitohondrija. Sinteza proteina, koja se odvija u citosolu na poliribosomima, pod utjecajem hipertermije biva značajno zakočena. Lizosomi, koji su rezervoari hidrolitičkih enzima, u normalnim uvjetima nadziru razgradnju

makromolekula. Pod utjecajem hipertermije dolazi do oštećenja lizosomske membrane što dovodi do smrti stanica u interfazi staničnog ciklusa. Tumorski lizosomi su termolabilniji od lizosoma normalnih stanica. Zbog oštećenja stanične jezgre dolazi do inhibicije sinteze DNA i popravaka oštećenja DNA. Osnovni odgovor stanica na hipertermiju je toplinski stres (HS, engl. heat shock) pri čemu se aktivira grupa gena koja kodira sintezu proteina toplinskog stresa (HSPs, engl. heat shock proteins). Ovi proteini prijanjaju na hidrofobna mjesta staničnih proteina čime sprječavaju stvaranje nefunkcionalnih agregata slučajnim povezivanjem hidrofobnih mjesta denaturiranih proteina. Time se omogućuje prevladavanje hipertermije te popravak oštećenih proteina. Kod produljenog djelovanja hipertermije ili nekog toksičnog čimbenika uslijed nedovoljne sinteze HSPs dolazi do apoptoze stanice. Inhibicija gena koji kodiraju HSPs uzrokuje povećanu termosenzitivnost stanica. Nadalje, hipertermija stimulira pro-oksidativne reakcije pri čemu se povećava produkcija reaktivnih oblika kisika (ROS) što dovodi do oksidativnog stresa i apoptoze stanica.

### **1.6.1 HIPERTERMIJA I BLEOMICIN**

Prema literaturnim podacima pokazano je hipertermija pojačava toksičnost bleomicina (BLM) kroz mehanizam inhibicije popravka DNA. Glikopeptid bleomicin je citostatik koji se koristi zbog svoje citotoksične aktivnosti koja oštećuje staničnu DNA, može dovesti do jednolančanih ili dvolančanih lomova DNA. Citotoksičnost bleomicina proizlazi iz njegovog svojstva da pokreće oksidativni stres, za što su je potrebna prisutnost kofaktora kao što su Fe(II), O<sub>2</sub> i jedan slobodan elektron. Molekularni mehanizam bleomicina temelji se na sposobnosti bleomicina da inducira oslobađanje baza te formiranju jednostrukih i dvostrukih lomova. U izoliranom DNA, BLM prouzrokuje jednolančane lomove, djeluje na alkalno-labilna mjesta (što predstavlja mjesta gubitka baze bez cijepanja fosfodieterske veze), i dvostruke lomove u omjeru od 5:5:1.

Uzročnici oksidativnog stresa (engl. Reactive Oxygen Species; ROS) nastaju i tijekom normalne stanične funkcije. Učinak ROS-a na sudbinu stanice ovisi o razini koncentracije prisutnosti ROS-a. ROS su jako nestabilni spojevi zbog svoje visoke kemijske reaktivnosti, što dovodi do lipidne peroksidacije i masivne oksidacije proteina, te njihove degradacije. Tri glavne vrste ROS-a su superoksidni anion radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), koji je konstitutivno prisutan u stanicama zbog curenja iz respiratornog lanca mitohondrija, vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), koji nastaje kao produkt dismutacije O<sub>2</sub><sup>-</sup> ili direktnim djelovanjem oksidaza, i hidroksilni radikal (OH), koji je visoko



reaktivni oblik i može izazvati modifikacije purinskih i pirimidinskih baza, te uzrokovati lomove lanaca DNA. ROS mogu izazvati promjene u DNA nizu u obliku mutacija, delecija, amplifikacije gena i genskog preoblikovanja. Ove promjene mogu dovesti do pokretanja signalizacije koja dovodi do stanične smrti ili aktivirati nekoliko protoonkogenih i/ili inaktivirati neke tumor-supresor gene. Smrt stanice kao odgovor na oštećenje DNA u većini slučajeva provodi se apoptozom.

Kapacitet hipertermije da potencira citotoksičnost bleomicina na razini popravka DNA može biti od posebne važnosti u povećanju protutumorske učinkovitosti i pokretanju stanične smrti.

U radu očekujemo sinergističko djelovanje kemoterapeutika i hipertermije na stanice EAT. Samostalno hipertermija nema dovoljno antikancerogeno djelovanje, međutim ukoliko se primijeni zajedno sa citostaticima, može se postići znatno bolji terapijski učinak. Literaturni podaci ukazuju da se citotoksično djelovanje bleomicina na tumorske stanice pojačava pri hipertermiji (Mircheva i sur. 1986; Smith i sur. 1986; Teicher i sur. 1988). Sinergizam između bleomicina i hipertermije je najveći pri njihovoj istovremenoj primjeni. Općenito je poznato da se za svaki stupanj porasta temperature vrijeme trajanja terapije može skratiti za polovicu kako bi se postigao jednaki terapijski učinak. Hipertermija povećava topljivost citostatika te reaktivnost između citostatika i DNA, što posljedično dovodi do brojnijih jednolančanih i dvolančanih lomova, poprečnih veza unutar i između lanaca DNA te pojačane apoptoze tumorskih stanica. Nadalje, hipertermija uzrokuje strukturne i funkcionalne promjene stanica. Oštećenje stanične membrane i porast pasivnog transporta pridonose povećanju količine citostatika u stanici. Hipertermija zaustavlja sintezu proteina i enzima te razara lizosomske membrane. Zbog oštećenja diobenog vretena i enzima, posebice DNA i RNA polimeraze, zaustavljena je sinteza i popravak DNA što dodatno pospješuje djelovanje bleomicina. Dakle, kemosenzitivni i citotoksični učinak hipertermije pridonose učinku bleomicina.

## **1.7 APOPTOZA**

Apoptoza je genetski ograničen proces koji ima važnu ulogu u embriogenezi, staničnoj homeostazi, a omogućuje sofisticirani mehanizam pri uklanjanju zaraženih, oštećenih ili mutiranih stanica. Dva glavna puta koji iniciraju apoptozu su vanstanični put, koji se još naziva put posredovan receptorima smrti, i unutarstanični put, odnosno posredovan mitohondrijima. Put receptora smrti uključuje interakciju posredovanu transmembranskim receptorima, koja uključuje superobitelj gena receptora tumor nekroznog faktora (TNF). Na tom putu domena

smrti prenosi signal smrti s površine stanice na unutarstaničnu signalnu kaskadu. Ti receptori smrti (engl. Death receptors; DR) i njihovi ligandi uključuju FasL/FasR, TNF $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 i Apo2L/DR5. Nakon vezanja liganda regrutiraju se citoplazmatski adapter proteini, te kao odgovor na to dolazi do vezanja domena smrti s receptorima. Kao primjer, vezanje Fas liganda na Fas receptor dovodi do vezanja adapterskog proteina FADD, a vezanje TNF liganda na TNF receptor dovodi do vezanja adapterskog proteina TRADD s istovremenom regrutacijom FADD-a i RIP-a. FADD se tada povezuje s prokaspazom-8, koji čine kompleks pokretanja signala smrti (engl. Death-inducing signalig complex; DISC) što dovodi do aktivacije prokaspaze-8. Apoptoza posredovana receptorima smrti može biti inhibirana s c-FLIP-om, proteinom koji veže i inaktivira FADD i kaspazu-8. Unutarstanični put, odnosno mitohondrijski posredovana apoptoza uključuje stimulanse koji proizvode unutarstanične signale koji pokreću događaje unutar stanice. Ovi signali uzrokuju promjene na unutarnjoj membrani mitohondrija, što rezultira povećanjem permeabilnosti mitohondrijskih permeabilnih tranzicijskih pora (engl. Mitochondrial permeability transition pore; MPT), gubitkom mitohondrijskog transmembranskog potencijala i oslobađanjem dvije skupine proapoptičkih proteina iz intermembranskog prostora u citosol. Prva skupina sadrži citokrom c, sekundarni mitohondrijski proizveden aktivator kaspaze (Smac), koji je IAP (engl. Inhibitors of apoptosis proteins) vezujući protein s niskim pI (DIABLO), i serin proteazu HtrA2/Omi. Ti proteini aktiviraju kaspazu ovisan mitohondrijski put. Citokrom c veže i aktivira Apaf-1 kao i prokaspazu-9 formirajući "apoptosome". Postoje izvješća da Smac/DIABLO i HtrA2/Omi potiču apoptozu inhibiranjem aktivnosti IAP-a. Druga skupina proapoptičkih proteina sastoji se od AIF, endonukleaze G i CAD-a, a oslobađa se kasnije tijekom apoptoze posredovane mitohondrijem. Obitelj proteina Bcl-2 kontrolira i regulira događanja tijekom apoptoze posredovane mitohondrijem. Tumor supresorski gen p53 ima ulogu pri regulaciji obitelji Bcl-2. Članovi obitelji Bcl-2 također kontroliraju permeabilnost mitohondrijske membrane i mogu biti proapoptički, kao što su Bcl-10, Bcl-xS, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik i Blk, ili protuapoptički, kao što su Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-w i BAG. Ti proteini igraju važnu ulogu u sudbini stanice. Pod određenim uvjetima apoptički putovi mogu se ispreplitati što dovodi do pojačanja apoptoze.

Faza egzekucije, koja se smatra završnom fazom apoptoze, uključuje aktivaciju egzekucijske kaspaze. Egzekucijska kaspaza aktivira citoplazmatsku endonukleazu i proteazu što dovodi do razgradnje nuklearnog materijala, te nuklearnih i citoskeletnih proteina. Kaspaza-3, kaspaza-6 i kaspaza-7 djeluju kao efektori ili "egzekutorske" kaspaze. One cijepaju različite supstrate,

uključujući citokeratin, PARP, plazmatko membranski citoskeletni protein alfa fodrin, nuklearni protein NuMA i druge. Sva ta događanja izazivaju morfološke i biokemijske promjene koje su uobičajeni za staničnu apoptozu. Kaspaza-3 je najbitniji kaspaza efektor, a on se aktivira inicijatornim kaspazama, odnosno kaspazom-8, -9, -10. Kaspaza-3 aktivira endonukleazu CAD. Kod stanica u proliferaciji, CAD se nalazi u kompleksu sa svojim inhibitorom ICAD. U apoptičkim stanicama aktivirana kaspaza-3 cijepa ICAD što oslobađa CAD. CAD uzrokuje kondenzaciju kromatina razaranjem kromosomske DNA unutar jezgre. Kaspaza-3 uzrokuje reorganizaciju citoskeleta i raspad stanice na apoptička tjelešca.

Međutim, kompleksna struktura eukariotskog kromatina ograničava dostupnost BLM, tako da su regije „otvorenog tipa“ (npr. transkripcijski aktivna regija, vjerojatno povezana s nuklearnom matriksom) pretežno oštećene. Dakle, kromatina struktura može igrati važnu ulogu u kontroli odgovora stanica sisavaca na BLM, može utjecati na mjesta i razinu oštećenja te posljedično na pristupačnost staničnih popravni enzima.

## **1.8 CILJ RADA**

Cilj rada je istražiti kemosenzitivnu sposobnost kurkumina združenog s kemoterapeutikom bleomicinom u fiziološkim (37 °C) ili hipertermalnim (43 °C) uvjetima na modelu stanične kulture stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora.

## **2 MATERIJALI**

### **2.1 POKUSNE ŽIVOTINJE**

U pokusima sam rabilo miševe muškog spola visokosrodnog soja Swiss albino starosti 3-4 mjeseca, mase 20-30 grama, uzgojene u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta (PMF). Miševe sam držao u kavezima i hranili sa standardnom laboratorijskom hranom (Standard Diet GLP, 4 RF 1, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italy) koja je, kao i voda, bila stalno dostupna. Istraživanja sam proveo po etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19,1999) i prema vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

### **2.2 EHRlichOV ASCITESNI TUMOR**

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) potječe od spontanog mamarnog adenokarcinoma miša (Pinello i sur., 2005). Rabio sam stanice EAT-a koje sam održavao iniciranjem u trbušnu šupljinu (intraperitonealno - ip) miševa soja Swiss albino u periodu od 7 do 9 dana. Nakon uzimanja ascitesa i pripreme stanica, konačan broj živih satnica odredio sam brojanjem na Bürker-Türkovoj komorici koristeći boju tripansko modrilo. Potreban broj stanica EAT ( $2 \times 10^6$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) postigao sam razrjeđivanjem s fiziološkom otopinom (0,9% otopinom natrijevog klorida). Broj živih tumorskih stanica bio je uvijek iznad 90%.

### **2.3 KULTURA STANICA EHRlichOVOG ASCITESNOG TUMORA**

Izolirane EAT stanice iz miša sam nasadio u Petrijeve zdjelice za staničnu kulturu u 10 mL kompletnog medija DMEM (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium) (Imunološki zavod d.d., Zagreb, Hrvatska), s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, engl. fetal bovine serum; Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), te 100 U/mL penicilina i 0,1 mL/mg streptomicina. Držao sam ih 24 h u inkubatoru na 37°C pri 5% CO<sub>2</sub> i uz relativnu vlažnost 95%. Nakon 24 h izdvojio sam makrofagne stanice te prikupili EAT stanice koje sam koristio za daljnja istraživanja.

## **2.4 KURKUMIN**

Koristio sam kurkumin (1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione; C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>; Mt: 368.39) proizvođača Sigma-Aldrich Corporation, SAD. Kurkumin sam primijenio u dozi od 5, 10, i 20 μM. Strukturna formula kurkumina prikazana je na Slici 1.

## **2.5 BLEOMICIN**

Korišten je bleomicin (Bleomycin PFI proizvođača Euro Nippon Kayaku GmbH, Staufenstrasse 4, 60323 Frankfurt am Main, Njemačka) u dozi od 5 μM.

## **2.6 MTS TEST KIT**

U utvrđivanju postotka vijabilnosti stanica koristio sam kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA) prema naputku proizvođača.

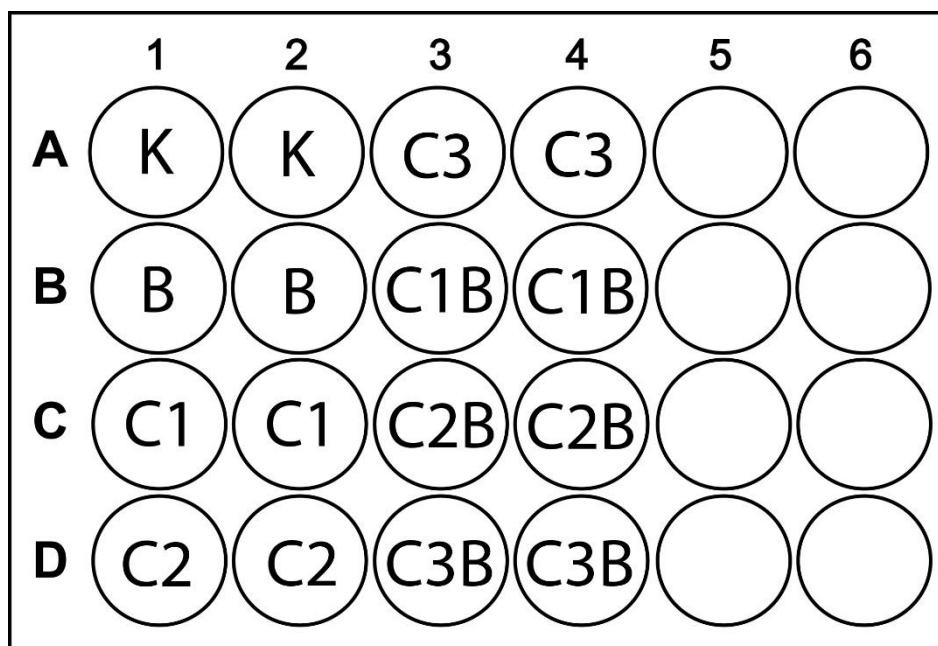
## **2.7 KIT ZA MJERENJE APOPTOZE I NEKROZE**

Upotrijebio sam kit ApoAlert® Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company 1290 Terra Bella Ave. Mountain View, CA 94043) za mjerenje apoptoze i nekroze.

### 3 METODE

#### 3.1 NASADIVANJE STANICA EHRLICHOVOG ASCITESNOG TUMORA (EAT)

S obzirom da nam je bio potreban veći broj stanica, kako bi nakon obrade stanica iz iste jažice mogli uzeti stanice za određivanje stanične vijabilnosti, apoptoze, nekroze te za utvrđivanje genotoksičnog učinka komet testom, stanice sam nasadio u pločice sa 24 jažice ( $1 \times 10^6$  stanica po mL) u DMEM hranjivom mediju s 10% FBS, te 100 U/mL penicilina i 0,1 mL/mg streptomicina) tijekom 24 h u inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$  pri 5%  $\text{CO}_2$  i uz relativnu vlažnost 95%. Slijed stavljanja uzoraka i način obilježavanja prikazan je na Slici 2. Stanice su nasadene u 2 pločice s 24 jažice; jedna pločica je kod obrade održavana na temperaturi u inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$  a druga na temperaturi od  $43^\circ\text{C}$  (hipertermija). Vrijeme trajanja obrade bleomicinom bilo je 2 h a nakon bleomicina stanice su obrađene kurkuminom u navedenim dozama slijedeća 2 h ili su bile izložene 24 sata.



Slika 2. Shematski prikaz pločice s jažicama kako su bile označene u istraživanju. K – kontrola; B – bleomicin; C1 – kurkumin koncentracije  $20 \mu\text{M}$ ; C2 – kurkumin koncentracije  $10 \mu\text{M}$ ; C3 – kurkuin koncentracije  $5 \mu\text{M}$ ; C1B – C3B su kombinacije već navedenog bleomicina i različitih koncentracija kurkumina

### 3.2 MTS TEST

MTS test je ustaljena kolorimetrijska metoda za utvrđivanje vijabilnosti stanica. Tom metodom možemo mjeriti proliferaciju, odnosno aktivaciju stanica te citotoksičnost određenog spoja ili pripravka koji istražujemo (Mosmann, 1983). MTS tetrazolium komponenta, poznata kao Owensov reagens, [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sol; MTS(a)] se u stanicama kemijski reducira u obojeni, u mediju topivi, formazan. Mjerenjem absorbancije formazana vrši se na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica na valnoj duljini 490 nm. Test mjeri aktivnost enzima dehidrogenaze, koji je prisutan samo u živim, metabolički aktivnim stanicama. Dakle, stvaranje formazana je proporcionalno broju živih stanica. Intenzitet stvorene boje je dobar pokazatelj vijabilnosti stanica.

Nakon što su prošla 2 sata u inkubatorima sa kurkuminom iz svake jažice, iz pločice s 24 jažice sam uzeo 100  $\mu\text{L}$  uzorka i prebacili u jažicu na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica, svaki uzorak prebačen je u triplikatu na pločici od 96 jažica, što je učinjeno za pločicu koja se nalazila u inkubatoru na 37 °C i pločicu koja se nalazila u inkubatoru na 43 °C, te sam u jažice, bez prisustva svjetla u laminaru, dodao 20  $\mu\text{L}$  MTS reagensa i pločicu inkubirali slijedeća 4 sata, na 37 °C i 5%  $\text{CO}_2$ , što je potrebno vrijeme da se MTS u stanicama reducira u formazan. Očitao sam absorbancije na ELISA mikro - čitaču s odgovarajućim filtrom valne duljine od 490 nm (Slika 3).



Slika 3. Bio-Rad, Model 550 mikro – čitač

Funkcionalnu vijabilnost izračunao sam prema formuli: postotak vijabilnosti = srednja vrijednost absorbancije u testiranim bunarićima x 100 / srednja vrijednost absorbancije u kontrolnim bunarićima.

Cijeli postupak je ponovljen nakon dodatna 24 sata. S time da su obje pločice sa 24 jažice provele 24 sata na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>, te su pločice od 96 jažica nanovo pripremljene od tih uzoraka.

### **3.3 ANALIZA APOPTOZE I NEKROZE TUMORSKIH STANICA NA PROTOČNOM CITOMETRU**

Udjela apoptoze i nekroze EAT stanica mjerio sam na protočnom citometru 24 sata nakon obrade s bleomicinom i kurkuminom. Apoptozu EAT stanica pokazao sam obilježavanjem stanica aneksinom V i propidij jodidom pomoću kita prema naputku proizvođača ApoAlert® Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company 1290 Terra Bella Ave. Mountain View, CA 94043). Stanice sam isprao 2x u hladnom PBS (puferirana fiziološka otopina) serumu prema uputstvu proizvođača. Stanični talog ( $1 \times 10^5$  stanica) resuspendirao sam u 100  $\mu$ L vezujućeg pufera i dodali 10  $\mu$ L fluorescein izotiocijanat



(FITC) konjugiranog aneksina V i 10  $\mu$ L propidij jodida. Inkubirao sam 15 minuta na sobnoj temperaturi, dodali 400  $\mu$ L vezujućeg pufera i propustili na protočnom citometru.

Sve uzroke analizirao sam protočnim citometrom (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, USA) koji je opremljen argonskim laserom, emisijom pogodne valne dužine od 488 nm i standardnim setom optičkih filtera: BP 530/30 (FL1), BP 585/44 (FL22), i Ip > 650 (FL3) (Slika 4).

Sakupljao sam po 10 000 stanica u svakom uzorku uz optimalnu brzinu propuštanja 400-600 stanica/sek. Zastupljenost pojedinih specifičnih biljega na stanicama analizirao sam postavljanjem aktivne ograde na dvoparametarskom histogramu raspodjele stanica prema veličini (engl. Forward scatter, FSC) i zrnatosti (engl. Side scatter, SSC). Rezultate sam analizirao programom "CellQuest" koji izračunava postotke stanica jednostruko i/ili dvostruko i/ili trostruko pozitivnih ili negativnih za određeni biljeg. Aneksin V se veže na stanice koje eksprimiraju fosfatidilserin na vanjskoj strani stanične membrane, a propidij jodid se vezuje na DNA mrtvih stanica. Žive stanice su aneksin V i propidij jodid negativne, stanica u apoptozi su aneksin V pozitivne i propidij jodid negativne a stanice u nekrozi su aneksin V i propidij jodidom pozitivne.



Slika 4. Protočni citometar FACSCalibur, Imunološki zavod

### 3.4 KOMET TEST

U istraživanju sam primijenio standardnu izvedbu komet testa koju su predložili (Singh i sur. 1988). Na brušeno predmetno stakalce Pasteurovom pipetom nakapao sam svježe priređenu otopinu 1% agaroze normalnoga tališta (NMP), pokrili pokrovnicom te ostavili na sobnoj temperaturi. Nakon polimerizacije agaroze sa stakalca sam uklonio pokrovnicu i sloj gela. Na osušeno staklo pomoću mikropipete nakapao sam 300  $\mu\text{L}$  0,6% NMP agaroze, stakalce sam pokrio pokrovnicom te ga držali 10 minuta na ledu. Na stakalca s priređenim slojem NMP agaroze nanosio sam slijedeći sloj koji se sastojao od 100  $\mu\text{L}$  0,5% agaroze niskoga tališta (LMP) pomiješane sa 5  $\mu\text{L}$  uzorka stanica uzetih iz jažica, te ponovo pokrili pokrovnicom. Nakon 10 minuta stajanja na ledu, taj sloj gela prekrrio sam sa 100  $\mu\text{L}$  0,5% agaroze niskog tališta (LMP) i preparat ponovo držali na ledu 10 minuta. Nakon polimerizacije skinuo sam pokrovnice priređenim preparatima i uronili ih u pufer za lizu (NaCl, Na-laurilsarkozinat, Tris-HCl, DMSO, Triton X-100), pH=10 u kojem su stajali jedan sat na 4 °C. Preparate sam iz pufera za lizu prebacio u pufer za denaturaciju (NaOH, Na<sub>2</sub>EDTA), pH=13. Denaturaciju sam proveo na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Nakon denaturacije, preparate sam premjestio u aparat za elektroforezu. Elektroforezu sam proveo u istom puferu kao i denaturaciju, istosmjernom strujom jakosti 300 mA i naponu od 25 V, tijekom 20 minuta. Nakon elektroforeze, preparate sam ispirao tri puta po 5 minuta u neutralizacijskom Tris-HCl puferu, pH=7,5. Nakon zadnjeg ispiranja, preparate sam bojao sa 100  $\mu\text{L}$  etidij-bromida masene koncentracije 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 10 minuta. Obojene gelove kratko sam isprao u Tris-HCl puferu, pH=7,5 i pokrili pokrovnicom. Radi stabilizacije boje, preparate sam prije početka analize držao u mraku najmanje 15 minuta. Preparate sam analizirao pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filtrom od 515 - 560 nm. Mjerenja dužine repa, postotak DNA u repu i repnog momenta proveo sam pomoću programa za analizu slike Comet Assay II, proizvođača Perceptive Instruments Ltd. Za svaki uzorak izmjerio sam po 50 stanica.

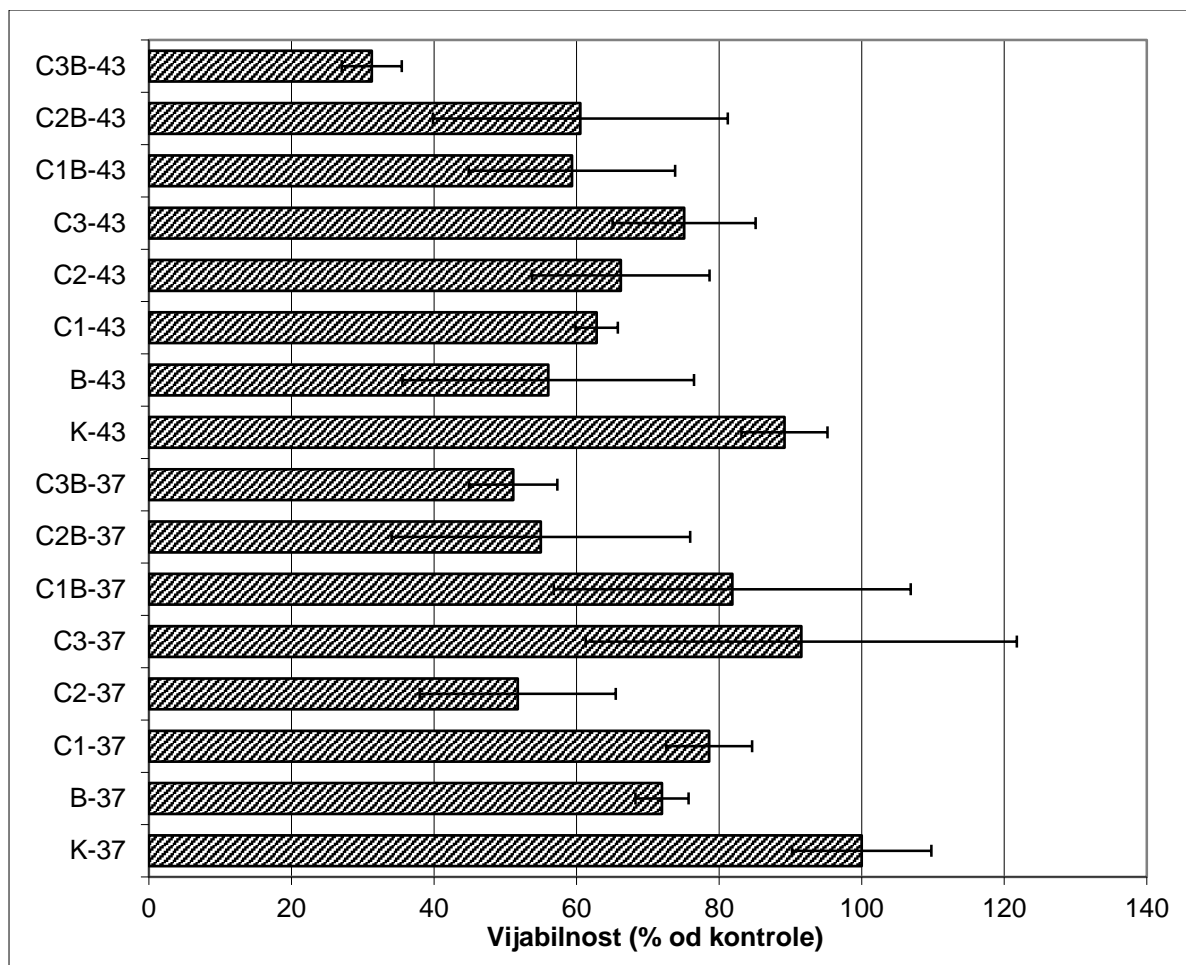
### 3.5 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Sve analize radio sam u triplicatu, a dobivene vrijednosti izrazio sam kao srednju vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija). Statističku značajnost rezultata ( $P < 0,05$ ) testirao sam pomoću računalnog programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa. SAD) primjenom Student *t*-testa.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI MTS TESTA TIJEKOM KRATKOTRAJNE INKUBACIJE EAT STANICA OBRAĐENIH BLEOMICINOM (2 H) I KURKUMINOM (2 H) PRI FIZIOLOŠKIM I HIPERtermALNIM UVJETIMA

Nakon prvih mjerenja absorbancije na ELISA mikro - čitaču s odgovarajućim filtrom (490 nm) dobiveni su rezultati prikazani na Slici 5. Kao što se može primijetiti kod svih uzoraka došlo je smanjena proliferacije stanica EAT. Stanice obrađene i izložene hipertermiji (43 °C), pokazuju veću inhibiciju proliferacije stanica EAT od uzoraka na 37 °C. Najmanja razlika se primjećuje kod C3 uzorka, odnosno uzorka obrađenog sa 5 µM kurkumina, dok je združena obrada kurkumina u dozi od 5 µM i bleomicina u dozi od 5 µM (C3B) pokazuje najveći uspjeh u inhibiciji proliferacije stanica EAT; pri hipertermalnim uvjetima inhibicija stanične proliferacije pri istoj obradi je 68,74% manja u odnosu na kontrolu (100%). Tablice 1. pokazuje statističku obradu rezultata MTS-a; najznačajniji rezultati prvoga dana primijećen je kod uzorka C3B pri hipertermiji ( $P < 0,001$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrole pri 37 °C i 43 °C. višestruki pristup obrade pokazuje bolji učinak na inhibiciju proliferacije stanica EAT u ( $P < 0,05$ ) u usporedbi s kurkuminom ili hipertermijom. Bleomicin pokazuje inhibiciju proliferacije ( $P < 0,05$ ) stanica EAT pri fiziološkim uvjetima (37 °C) u usporedbi s kontrolom dok u hipertermalnim uvjetima nije pokazao statistički značajan učinak.



Slika 5. Učinak kurkumina i bleomicina te njihovih kombinacija na vijabilnost stanica EAT pri fiziološkim (37 °C) ili pri hipertermalnim (43 °C) uvjetima. U triplikatima uzoraka stanice su obrađene bleomicinom u dozi od 5  $\mu$ M tijekom 2 h te kurkuminom u dozi od 5, 10, i 20  $\mu$ M tijekom slijedeća 2 h. Vijabilnost je procijenjena MTS testom a postotak vijabilnosti prikazan u odnosu na kontrolu (100%). Barovi prikazuju srednje vrijednosti triplikata uzorka  $\pm$  SD (standardna devijacija).

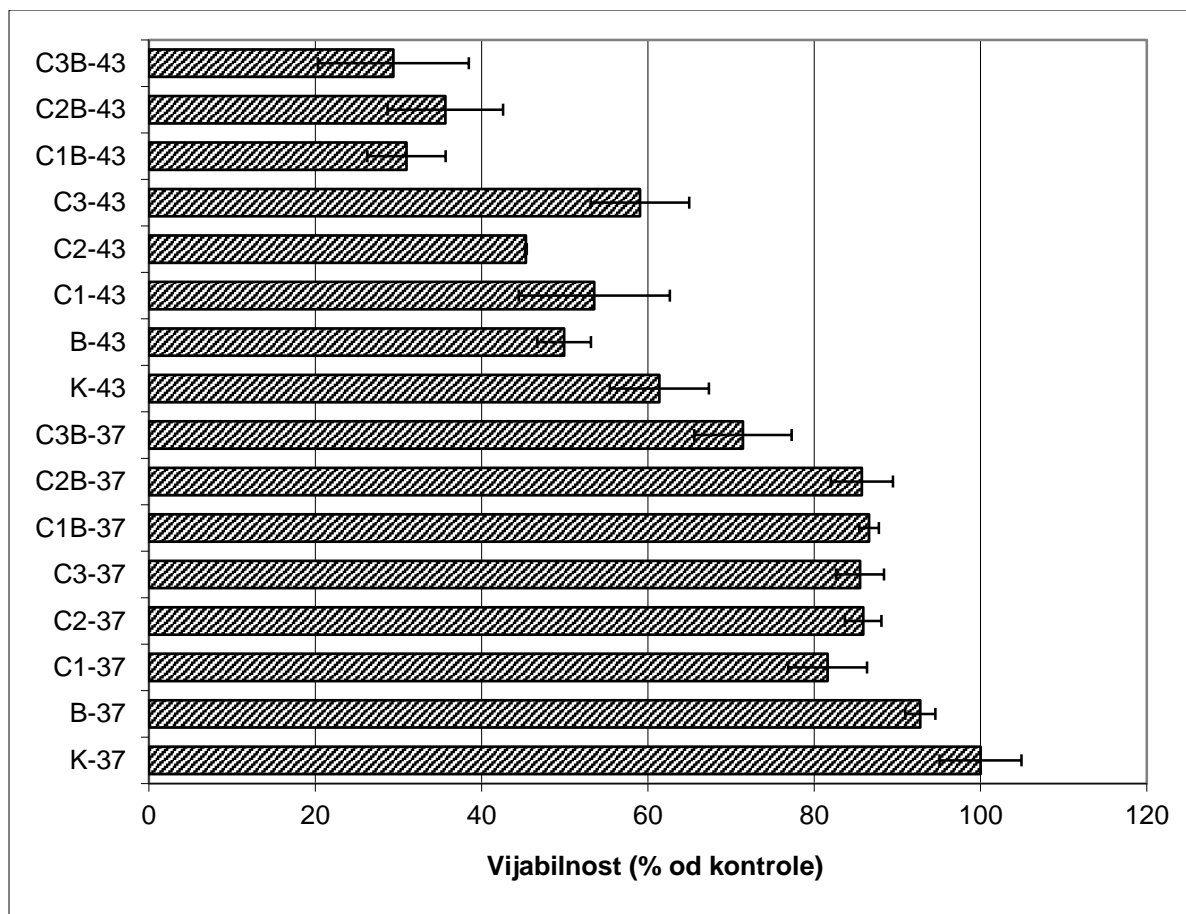
Legenda: K – kontrola; B – bleomicin; C1 – kurkumin koncentracije 20  $\mu$ M; C2 – kurkumin koncentracije 10  $\mu$ M; C3 – kurkumin koncentracije 5  $\mu$ M; C1B – C3B su kombinacije već navedenog bleomicina i različitih koncentracija kurkumina

Tablica 1. Rezultati Studentovog *t*-testa za MTS test učinka kurkumina i bleomicina te njihovih kombinacija na vijabilnost stanica EAT pri fiziološkim (37 °C) ili pri hipertermalnim (43 °C) uvjetima. Korištene kratice su jednake kao kod Slike 5.

	B-37	C1-37	C2-37	C3-37	C1B-37	C2B-37	C3B-37	K-43	B-43	C1-43	C2-43	C3-43	C1B-43	C2B-43	C3B-43
K-37	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	p<0,05	p<0,01	NZ	NZ	p<0,05	p<0,01	NZ	p<0,05	NZ	p<0,001
B-37		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,01	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,001
C1-37			NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,01
C2-37				NZ	p<0,05	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C3-37					NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
C1B-37						NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
C2B-37							NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C3B-37								p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05
K-43									NZ	p<0,05	NZ	NZ	p<0,05	NZ	p<0,001
B-43										NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C1-43											NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05
C2-43												NZ	NZ	NZ	p<0,05
C3-43													NZ	NZ	p<0,05
C1B-43														NZ	NZ
C2B-43															NZ
C3B-43															

#### 4.2 REZULTATI MTS TESTA TIJEKOM 24 H INKUBACIJE EAT STANICA NAKON OBRADJE BLEOMICINOM I KURKUMINOM PRI FIZIOLOŠKIM I HIPERTERMALNIM UVJETIMA

Rezultati dobiveni MTS testom 24 sata nakon obrade uzoraka bleomicinom i kurkuminom prikazani su na Slici 6. Neznatna razlika u vijabilnosti kontrolni stanica EAT u odnosu na bleomicin ili kurkumin je vidljiva pri 37 °C; značajne razlike ( $P<0,05$ ) su zapažene u uzorcima B, C1 i C3B u odnosu na kontrolu. Uzorci izloženi hipertermiji pokazuju bolji rezultat nakon 24 sata; značajna razlika ( $P<0,01$ ) i redukcija proliferacije u svim uzorcima je vidljiva u odnosu na kontrolu. Najbolji rezultat polučila je kombinacija C3B (Tablica 2), ali i bleomicin ( $P<0,001$ ). Najznačajniji rezultati postignuti su u kombinaciji C1B, C2B i C3B pri hipertermiji ( $P<0,01$ ;  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ) u usporedbi s istim kombinacijama pri 37 °C.



Slika 6. Učinak kurkumina i bleomicina te njihovih kombinacija na vijabilnost stanica EAT pri fiziološkim (37 °C) ili pri hipertermalnim (43 °C) uvjetima tijekom 24 h. U triplikatima uzoraka stanice su obrađene bleomicinom u dozi od 5  $\mu$ M tijekom 2 h te kurkuminom u dozi od 5, 10, i 20  $\mu$ M te inkubirane dodatna 24 h. Vijabilnost je procijenjena MTS testom a postotak vijabilnosti prikazan u odnosu na kontrolu (100%). Barovi prikazuju srednje vrijednosti triplikata uzorka  $\pm$  SD (standardna devijacija).

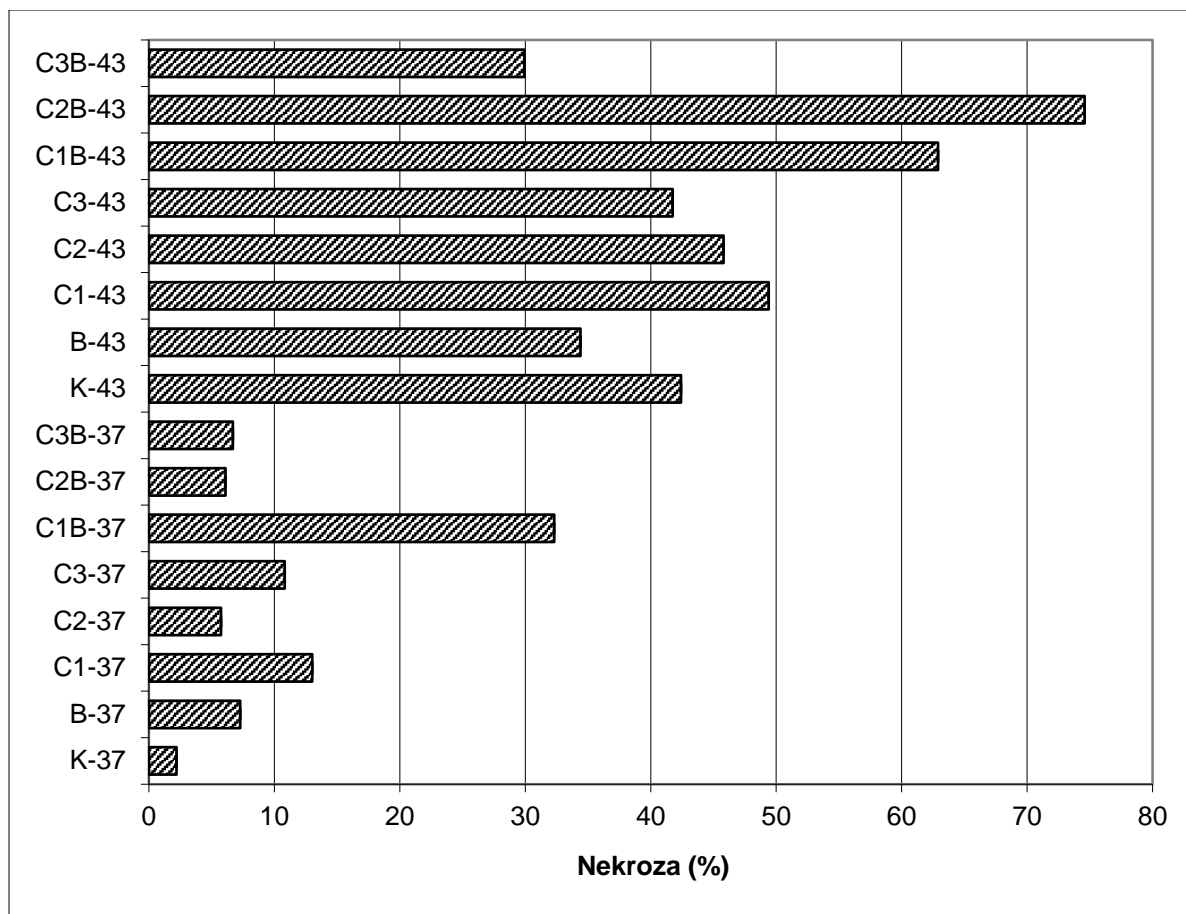
Legenda: K – kontrola; B – bleomicin; C1 – kurkumin koncentracije 20  $\mu$ M; C2 – kurkumin koncentracije 10  $\mu$ M; C3 – kurkumin koncentracije 5  $\mu$ M; C1B – C3B su kombinacije već navedenog bleomicina i različitih koncentracija kurkumina

Tablica 2. Rezultati Studentovog *t*-testa za MTS test učinka kurkumina i bleomicina te njihovih kombinacija na vijabilnost stanica EAT pri fiziološkim (37 °C) ili pri hipertermalnim (43 °C) uvjetima tijekom 24 h inkubacije. Korištene kratice su jednake kao kod Slike 6.

	B-37	C1-37	C2-37	C3-37	C1B-37	C2B-37	C3B-37	K-43	B-43	C1-43	C2-43	C3-43	C1B-43	C2B-43	C3B-43
K-37	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,01	p<0,001	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01
B-37		p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,01	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01
C1-37			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	NZ	p<0,01	p<0,001	p<0,05
C2-37				NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,001	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01
C3-37					NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,05
C1B-37						NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,001	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
C2B-37							p<0,01	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,05	p<0,01
C3B-37								NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,01
K-43									p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	p<0,01	NZ
B-43										p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ
C1-43											NZ	NZ	NZ	p<0,01	NZ
C2-43												NZ	p<0,05	NZ	NZ
C3-43													p<0,001	NZ	p<0,01
C1B-43														NZ	NZ
C2B-43															NZ
C3B-43															

#### 4.3 REZULTATI NEKROZE TIJEKOM 24 H INKUBACIJE EAT STANICA NAKON OBRADJE BLEOMICINOM I KURKUMINOM PRI FIZIOLOŠKIM I HIPERTERMALNIM UVJETIMA

Rezultati dobiveni protočnim citometrom podudaraju se sa rezultatima MTS. Usporedbom kontrolnih uzoraka pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima vidljivo je da hipertermija povećava postotak stanica u nekrozi (42,41% usporedno s 2,2%) dok su razlike u apoptozi neznačajne (1,98% na 43 °C apoptozi usporedno s 1,31% na 37 °C). Najveći postotak nekroza pri hipertermalnim uvjetima pokazuje kombinacija C2B (74,58%) i C1B (62,9%) dok je postotak nekroza u uzorku C3B 29,92% (Slika 7). Bleomicin pri hipertermalnim uvjetima izazvao je nekrozu od 34,4%. Tablica 3 pokazuje statističke razlike dobivenih rezultata stanica EAT u nekrozi; gotovo svi uzorci u usporedbi s kontrolom na 43 °C pokazuju značajnost od ( $P < 0,05$ ), osim B i C3B uzorka (Tablica 3).



Slika 7. Učinak kurkumina i bleomicina te njihovih kombinacija na nekrozu stanica EAT pri fiziološkim (37 °C) ili pri hipertermalnim (43 °C) uvjetima tijekom 24 h. U triplikatima uzoraka stanice su obrađene bleomicinom u dozi od 5  $\mu\text{M}$  tijekom 2 h te kurkuminom u dozi od 5, 10, i 20  $\mu\text{M}$  te inkubirane dodatna 24 h. Stanice su analizirane protočnim citometrom te obilježene aneksinom i propidij jodidom; stanice u nekrozi su aneksin V i propidij jodidom pozitivne i izražene kao postotak stanica u nekrozi.

Legenda: K – kontrola; B – bleomicin; C1 – kurkumin koncentracije 20  $\mu\text{M}$ ; C2 – kurkumin koncentracije 10  $\mu\text{M}$ ; C3 – kurkumin koncentracije 5  $\mu\text{M}$ ; C1B – C3B su kombinacije već navedenog bleomicina i različitih koncentracija kurkumina

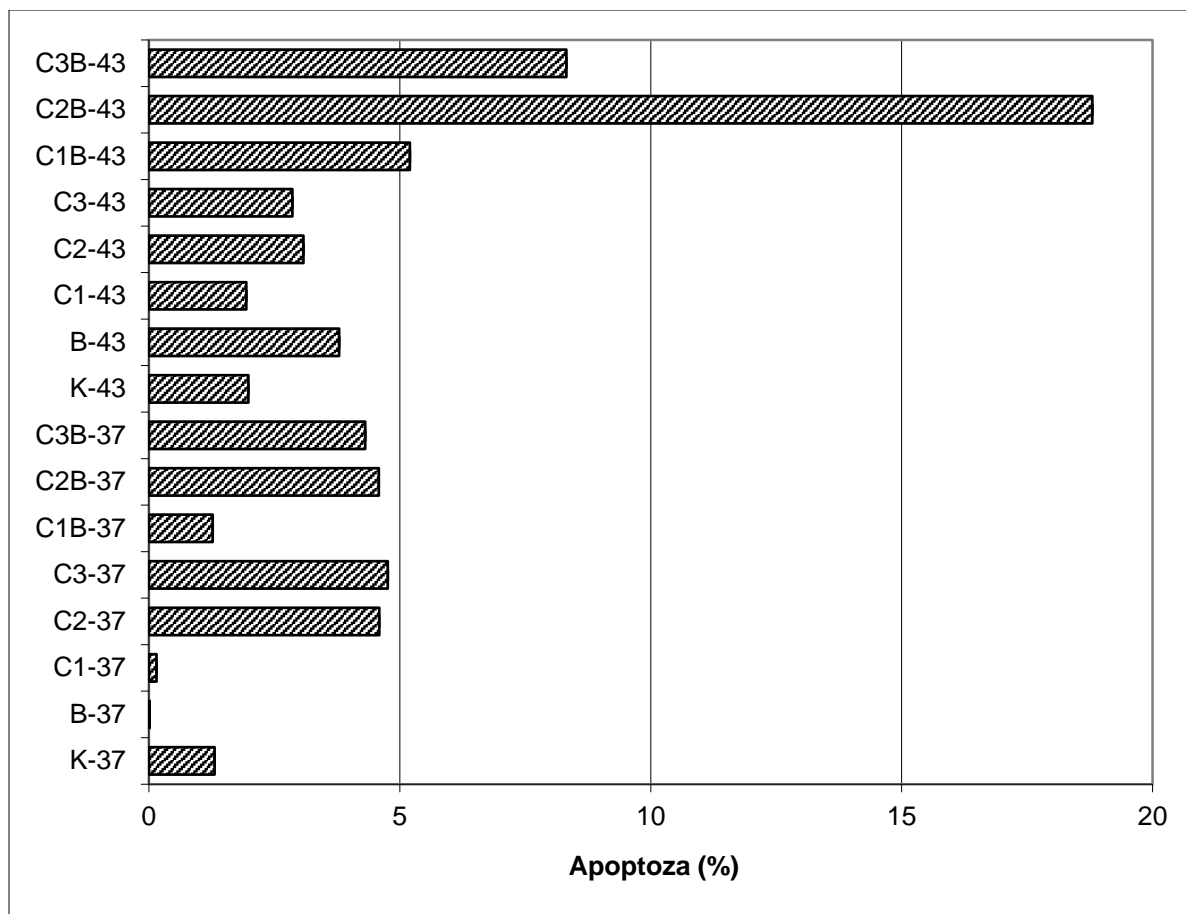


Tablica 3. Rezultati Studentovog *t*-testa za nekrozu stanica EAT nakon obrade kurkuminom i bleomicinom te njihovim kombinacija pri fiziološkim (37 °C) ili pri hipertermalnim (43 °C) uvjetima tijekom 24 h inkubacije. Korištene kratice su jednake kao kod Slike 7.

	B-37	C1-37	C2-37	C3-37	C1B-37	C2B-37	C3B-37	K-43	B-43	C1-43	C2-43	C3-43	C1B-43	C2B-43	C3B-43
K-37	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NZ
B-37		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C1-37			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C2-37				NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C3-37					NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C1B-37						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C2B-37							NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C3B-37								NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
K-43									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
B-43										NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C1-43											NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C2-43												NZ	NZ	NZ	NZ
C3-43													NZ	NZ	NZ
C1B-43														NZ	NZ
C2B-43															NZ
C3B-43															

#### 4.4 REZULTATI APOPTOZE TIJEKOM 24 H INKUBACIJE EAT STANICA NAKON OBRADJE BLEOMICINOM I KURKUMINOM PRI FIZIOLOŠKIM I HIPERTERMALNIM UVJETIMA

Postotak stanica EAT nakon obrade bleomicinom i/ili kurkuminom pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima bio je manji u odnosu na postotak stanica u (Slika 8). U većini slučajeva postotak stanica u apoptozi kretao se oko 5%, osim u uzorcima C3B (8,32%) i C2B (18,8%) pri hipertermalnim uvjetima. Sam bleomicin je kod hipertermije imao 3,79% stanica u apoptozi, što ukazuje da su kombinacije bleomicina i kurkumina nešto uspješnije nego on sam. Iz Tablice 4. možemo iščitati da je značajna apoptoza u usporedbi s kontrolom samo u uzorku C2B pri 43 °C, gdje je  $P < 0,05$  i odnosu na bleomicin  $P < 0,001$  (Tablica 4).



Slika 8. Učinak kurkumina i bleomicina te njihovih kombinacija na apoptozu stanica EAT pri fiziološkim (37 °C) ili pri hipertermalnim (43 °C) uvjetima tijekom 24 h. U triplikatima uzoraka stanice su obrađene bleomicinom u dozi od 5 μM tijekom 2 h te kurkuminom u dozi od 5, 10, i 20 μM te inkubirane dodatna 24 h. Stanice su analizirane protočnim citometrom te obilježene aneksinom i propidij jodidom; stanice u apoptozu su aneksin V pozitivne i propidij jodid negativne i izražene kao postotak stanica u nekrozi.

Legenda: K – kontrola; B – bleomicin; C1 – kurkumin koncentracije 20 μM; C2 – kurkumin koncentracije 10 μM; C3 – kurkumin koncentracije 5 μM; C1B – C3B su kombinacije već navedenog bleomicina i različitih koncentracija kurkumina

Tablica 4. Rezultati Studentovog *t*-testa za apoptozu stanica EAT nakon obrade kurkuminom i bleomicinom te njihovim kombinacija pri fiziološkim (37 °C) ili pri hipertermalnim (43 °C) uvjetima tijekom 24 h inkubacije. Korištene kratice su jednake kao kod Slike 8.

	B-37	C1-37	C2-37	C3-37	C1B-37	C2B-37	C3B-37	K-43	B-43	C1-43	C2-43	C3-43	C1B-43	C2B-43	C3B-43
K-37	p<0,01	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ
B-37		NZ	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001
C1-37			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C2-37				NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C3-37					NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C1B-37						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ
C2B-37							NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C3B-37								NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
K-43									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
B-43										NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C1-43											NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
C2-43												NZ	NZ	NZ	NZ
C3-43													NZ	NZ	NZ
C1B-43														NZ	NZ
C2B-43															NZ
C3B-43															

#### 4.5 REZULTATI KOMET TESTA

Pregledom rezultata komet testa većina stanica je bila u nekrozi tako da zbog nemogućnosti da se prikupi dovoljno stanica za analizu komet testa, nisam mogao pokazati rezultate koji bi bili vjerodostojni i statistički obrađeni.

## 5 RASPRAVA

U borbi protiv tumora medicina je u konstantnoj potrazi za uspješnijim načinima liječenja, cilj je pronaći potencijalno učinkovite citotoksične, selektivne i pro-apoptične lijekove za stanice tumora a očuvati zdrave stanice. Većina današnjih citotoksika koji se koriste u kemoterapiji imaju cijeli niz nuspojava, što se povezuje s njihovim citotoksičnim učinkom i na zdrave stanice. Potreba za pronalaskom tvari koje smanjuju toksični učinak kemoterapije na zdrave stanice, dok i dalje ne smanjuju, ili čak povećavaju učinak citostatika na stanice tumora sve je veća kao i pronalazak novih načina primjene postojećih oblika terapije, primjerice višestrukog (engl. multimodal treatment) pristupa liječenja uključujući hipertermiju, kemoterapiju i imunomodulaciju. Ja sam u radu kao imunomodulator rabio kurkumin koji se u tradicionalnoj indijskoj i kineskoj medicini upotrebljava već tisućama godina za liječenje mnogobrojnih bolesti, primjerice, bolesti jetre i žučnjaka, želuca, pluća, dijabetesa, anoreksije, reumatizma, tumora i drugih različitih upalnih bolesti (Menon i Sudheer 2007; Jurenka 2009).

Cilj ovog rada je istražiti kemiosenzitivnu sposobnost kurkumina združenog s kemoterapeutikom bleomicinom u fiziološkim (37 °C) ili hipertermalnim uvjetima (43 °C) uvjetima na modelu stanične kulture Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT).

Istražio sam antiproliferativni učinak kurkumina i bleomicina u fiziološkim i/ili hipertermalnim uvjetima MTS testom te učinak višestrukog pristupa liječenja na apoptozu i nekrozu tumorskih stanica pomoću protočnog citometra kao i genotoksični učinak.

Kao što je bilo i očekivano MTS test je pokazao da je proliferacija stanica obrađenih bleomicinom, kurkuminom, te njihovom kombinacijom manja od kontrole. Primjena samog kurkumina na stanice EAT posebice pri kratkotrajnoj inkubaciji nije izazvala značajan protutumorski učinak na stanice EAT osim uzorka obrađenoga sa 10 µM kurkuminom, gdje je postotak vijabilnih stanica bio 51,74% stanica u odnosu na kontrolu. dok u kombinaciji s hipertermijom i citostatikom je postignut najbolji protutumorski učinak; najbolji učinak postignut je primjenom 5 µM kurkuminom i 5 µM bleomicina pri hipertermalnim uvjetima, gdje je proliferacija u odnosu na kontrolu smanjenja za 68,74% (Slika 5). Ovakvi rezultati poklapaju se s rezultatima dobivenim u drugim istraživanjima (Rao i sur. 2014).

Nakon 24 sata inkubacije stanica EAT s test komponentama dobio sam bolji protutumorski učinak, posebice pri hipertermalnim uvjetima. Kombinacija kurkumina i bleomicina pokazuje izraziti antiproliferativni učinak pri 43 °C; proliferacija u svim kombinacijama s bleomicinom

je manja ili oko 35% u odnosu na kontrolu (Slika 6). Mehanizam ovakvog oblika terapije temelji se na oksidativnom učinku bleomicina i učinku hipertermije koja olakšava ulazak citostatika bleomicina u stanice EAT, te utjecaju kurkumina na inhibiciju nuklearnog čimbenika kapa B ( $\text{NF}\kappa\beta$ ), koji kontrolira transkripciju DNA.

Istraživanja drugih (Mircheva i sur. 1986; Smith i sur. 1986; Teicher i sur. 1988) pokazuju bolji protutumorski učinak bleomicina izloženog hipertermiji. Bleomicin je prostorno veliki spoj i teže ulazi u stanicu, hipertermija očito pomaže i povećava propusnost lipidne membrane (Slike 5 i 6).

Iako postoje suprotni učinci o djelovanju kurkumina u kombinaciji s bleomicinom na apoptozu, primjerice sinergistički učinak na apoptotičke puteve pokazuje Cort i sur (2012) na malignim zametnim stanicama testisa ljudi dok isti autori Cort i sur (2013) pokazuju da istovremena uporaba kurkumina s bleomicinom smanjuje kaspaznu aktivnost, i razinu Bax proteina i Cyt-C u odnosu na njihove pojedinačne učinke u NCCIT (ljudskim embrionski tumor; engl. human embryonic carcinoma) stanicama te da istodobnu primjenu kurkumina tijekom kemoterapije karcinoma testisa treba izbjegavati zbog inhibitornog učinka kurkumina na bleomicinom-induciranu apoptozu.

Postotci apoptoze postignuti u istraživanju su vrlo niski, što ukazuje da kurkumin nazočan u kulturi u višim koncentracijama može smanjiti pro-apoptotičko djelovanje bleomicina, postotak stanica u apoptozi je bio oko 5,2%. Kod manjih koncentracija odnosi nekroze i apoptoze su bolji, iako je postotak nekroze jače izražen. Najbolji rezultat je tako dao uzorak C2B, 5  $\mu\text{M}$  bleomicin i 10  $\mu\text{M}$  kurkumin, pri hipertermiji, gdje je postotak stanica u nekrozi iznosio 74,58%, a apoptoze 18,8% (Slika 8). Bleomicin na tjelesnoj temperaturi je dao najmanji postotak apoptoze, svega 0,013%, te su svi ostali uzorci u usporedbi s njim dali rezultate koji su bili značajni (Tablica 4). Moguće je da dolazi do neutralizacije reaktivnih radikala stanica EAT s prooksidativnim učinkom bleomicina ili nastanka toksičnih aldehida koji sprječavaju odlazak stanica u apoptozu. Tako primjena antioksidanata poput kurkumina ali u nižim koncentracijama može spriječiti nastanak toksičnih aldehida i pojačati apoptozu (Menon i Sudheer 2007).

Postotak EAT stanica u nekrozi nakon obrade bleomicinom ili kurkuminom pri fiziološkoj temperaturi nije dao značajne rezultate, čak ni kod bleomicina. No gotovo svi uzorci izloženi hipertermiji pokazali su dobar učinak, posebice kombinacija C2B i C3B (74,58% i 62,9%) (Slika 7).

Prema literaturnim podacima pokazano je da hipertermija pojačava toksičnost bleomicina kroz mehanizam inhibicije popravka DNA. Glikopeptid bleomicin je citostatik koji se koristi zbog svoje citotoksične aktivnosti koja oštećuje staničnu DNA, može dovesti do jednolančanih ili dvolančanih lomova DNA. Citotoksičnost bleomicina proizlazi iz njegovog svojstva da pokreće oksidativni stres, za što su je potrebna prisutnost kofaktora kao što su Fe(II), O<sub>2</sub> i jedan slobodan elektron. Molekularni mehanizam bleomicina temelji se na sposobnosti bleomicina da inducira oslobađanje baza te formiranju jednostrukih i dvostrukih lomova. U izoliranom DNA, bleomicin prouzrokuje jednolančane lomove, djeluje na alkalno-labilna mjesta (što predstavlja mjesta gubitka baze bez cijepanja fosfodiesterske veze), i dvostruke lomove u omjeru od 5 : 5 : 1 (Smith i sur. 1986; Teicher i sur. 1988).

Međutim, kompleksna struktura eukariotskog kromatina ograničava dostupnost bleomicina, tako da su regije „otvorenog tipa“ (npr. transkripcijski aktivna regija, vjerojatno povezani s nuklearnom matriksom) pretežno oštećene. Dakle, kromatinska struktura može igrati važnu ulogu u kontroli odgovora stanica sisavaca na bleomicina, može utjecati na mjesta i razinu oštećenja te posljedično na pristupačnost staničnih popravkih enzima. Kapacitet hipertermije da potencira citotoksičnost bleomicina na razini popravka DNA (Teicher i sur. 1988; Schuler i sur. 2010) može biti od posebne važnosti u povećanju protutumorske učinkovitosti i pokretanju stanične smrti.

Izraziti učinak bleomicina na razinu oštećenja DNA pokazuju i moji rezultati gdje je razina oštećenja, posebice pri hipertermalnim uvjetima dovela do potpunog oštećenja DNA stanica tako da nisam mogao napraviti usporedbu rezultata niti je obraditi statistički.

Ipak da bi dobili pravi odgovor ovog višestrukog pristupa na stanice EAT potrebno je istražiti učinak na animalnom modelu. Smatram da bi učinak bleomicina i hipertermije bio puno bolji zbog toga što krvožilni sustav koji je izrazito promijenjen kod tumora pri hipertermalnim uvjetima igra ključnu ulogu a ujedno bi više saznali o ulozi kurkumina kao imunomodulatora, ali i o njegovom antioksidativnom potencijalu u zaštiti zdravih stanica.

## 6 ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Kurkumin inhibira proliferaciju stanica EAT u uvjetima *in vitro*.
2. Niže koncentracije kurkumina u kombinaciji s bleomicinom imaju bolji antiproliferativni učinak na stanice EAT *in vitro*.
3. Hipertermija izrazito povećava antiproliferativni učinak bleomicina i/ili kurkumina.
4. Duža inkubacija (24 h) stanica EAT s bleomicinom i kurkuminom pri fiziološkim i/ili hipertermalnim uvjetima ostvarila je bolji protutumorski učinak.
5. Veći postotak nekroze pri hipertermiji dokazuje da hipertermija povećava propusnost stanične membrane, te olakšani unos citostatika i kurkumina a ujedno onemogućava mehanizme popravka.
6. Najveći postotak stanica u apoptozi pokazuju uzorci obrađeni s bleomicinom i kurkuminom; anti-oksidativni učinak kurkumina povećava kemosenzitivnost stanica EAT
7. Daljnja istraživanja trebalo bi napraviti na animalnom modelu kako bi dobili jasniju sliku višestrukog pristupa u terapiji tumora.

## 7 LITERATURA

Ali, A., Akhtar, N., Khan, B. A., Khan, M. S., Rasul, A., Zaman, S.-U., Khalid, N., Waseem, K., Mahmood, T., Ali, L. (2012): *Acacia nilotica*: A plant of multipurpose medicinal uses. *J. Med. Plants Res.* **6** (9): 1492-1496.

Bush J. A., Cheung K. J. Jr, Li G. (2001): Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res.* **271** (2): 305–14.

Cooper G. M., Hausman R. E. (2004): *The Cell: A Molecular Approach*. Boston University, Boston.

Cort A., Ozdemir E., Timur M., Ozben T. (2012): Effects of N-acetyl-L-cysteine on bleomycin induced oxidative stress in malignant testicular germ cell tumors. *Biochimie.* **94** (12): 2734-9

Cort A., Timur M., Ozdemir E., Ozben T. (2013): Effects of curcumin on bleomycin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cells. *J Physiol Biochem.* **69** (2): 289-96

Critchfield J. W., Butera S. T., Folks T. M. (1996): Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **12** (1): 39–46.

Eastman A. (1987): Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem Biol Interact.* **61** (3): 241-8.

Erexson G. L., Bryant M. F., Kwanyuen P., Kligerman A. D. (1995): Bleomycin sulfate-induced micronuclei in human, rat, and mouse peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* **25** (1): 31-6.

Evans D. L., Dive C. (1993): Effects of Cisplatin on the Induction of Apoptosis in Proliferating Hepatoma Cells and Nonproliferating Immature Thymocytes. *Cancer Res.* **53** (9): 2133-9.

Freshney R. I. (1987): *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 2nd edition. Alan R Liss, New York.

Gewirtz D. A. (1999): A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* **57** (7): 727-41.



- Goel A., Aggarwal B. B. (2010): Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr Cancer*. **62** (7): 919-30.
- Henke Y. C., Hansen F. M., Goodman M., urednici. (2005): *Cancer Nursing: Principles and Practice*. 6. izd. Sudbury, Jones and Bartlett Publishers Inc.
- Jurenka J. S. (2009): Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. **14** (2): 141-53
- Kleinsmith L. J. (2006): *Principles of Cancer Biology*, 1st Edition. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Kopjar N., Garaj-Vrhovac V., Milas I. (2002): Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen*. **22** (1): 13-30.
- Krešić V. (2009): Centralna jedinica za pripremu citostatske i intravenozne terapije - standardi kvalitete -. *Sestrinski glasnik* br. 2, Zagreb
- Lenhard R. E., Osteen R. T., Gansler T. S., urednici. (2001): *Clinical Oncology*. 2. izd. Malden, Blackwell Science Inc.
- McKinnell, R.G. (2006): *The biological basis of cancer*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Menon V. P., Sudheer A. R. (2007): Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. **595**: 105-25.
- Mircheva J., Smith P. J., Bleehen N. M. (1986): Interaction of bleomycin, hyperthermia and a calmodulin inhibitor (trifluoperazine) in mouse tumour cells: I. In vitro cytotoxicity. *Br J Cancer*. **53** (1): 99-103.
- Oršolić N., Bašić I. (2007): Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. U: Singh V. K., Govil J. N., Arunachalam C. (ur). *Recent Progress in Medicinal Plants*. Studium Press LLC, USA, str. 55-113.
- Page C., Curtis M., Sutter M., Walker M., Hoffman B., urednici (2002): *Integrated Pharmacology*. 2. izd. Edinburgh, Mosby International Ltd.

- Povirk L. F., Austin M. J. F. (1991): Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res.* **257** (2): 127-43.
- Rang, H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K. (2003): *Pharmacology*. 5th Edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Rao W., Zhang W., Poventud-Fuentes I., Wang Y., Lei Y., Agarwal P., Weekes B., Li C., Lu X., Yu J., He X. (2014): Thermally responsive nanoparticle-encapsulated curcumin and its combination with mild hyperthermia for enhanced cancer cell destruction. *Acta Biomater.* **10** (2): 831-42.
- Schuler P. J., Trellakis S., Greve J., Bas M., Bergmann C., Bölke E., Lehnerdt G., Mattheis S., Albers A. E., Brandau S., Lang S., Whiteside T. L., Bier H., Hoffmann T. K. (2010): In vitro chemosensitivity of head and neck cancer cell lines. *Eur J Med Res.* **15** (8): 337-44.
- Shankar S., Srivastava R. K. (2007): Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol.* **30** (4): 905-18.
- Shankar S., Ganapathy S., Chen Q., Srivastava R. K. (2008): Curcumin sensitizes TRAIL-resistant xenografts: molecular mechanisms of apoptosis, metastasis and angiogenesis. *Mol Cancer.* **7**: 16.
- Smith P. J., Mircheva J., Bleehen N. M. (1986): Interaction of bleomycin, hyperthermia and a calmodulin inhibitor (trifluoperazine) in mouse tumour cells: II. DNA damage, repair and chromatin changes. *Br J Cancer.* **53** (1): 105-14.
- Sorenson C. M., Eastman A. (1988): Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* **48** (23): 6703-7.
- Šamija M., Vrdoljak E., Krajina Z. (2006): *Klinička onkologija*. Medicinska naklada Zagreb.
- Teicher B. A., Herman T. S., Holden S. A. (1988): Combined modality therapy with bleomycin, hyperthermia, and radiation. *Cancer Res.* **48** (22): 6291-7.
- Tannock I.F., de Wit R., Berry W. R., Horti J., Pluzanska A., Chi K. N., Oudard S., Théodore C., James N. D., Turesson I., Rosenthal M. A., Eisenberger M. A.; TAX 327 Investigators (2004): Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* **351** (15): 1502-12.

Vig B. K. (1977): Genetic toxicology of mitomycin C, actinomycins, daunomycin and adriamycin. *Mutat Res* **48** (2): 189-238.

Vig B. K., Lewis R. (1978): Genetic toxicology of bleomycin. *Mutat Res.* **55** (2): 121-45.

Weng C. J., Yen G. C. (2012): Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev.* **31** (1-2): 323-51.

Zamble D. B., Lippard S. J. (1999): The response of Cellular proteins to Cisplatin-damaged DNA. *Thirty years of cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug.* Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Switzerland.

## **ŽIVOTOPIS:**

**Datum rođenja:** 08.10.1986., Osijek (Hrvatka)

**Obrazovanje:** 2009. – 2015. PMF – Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalna biologija – fiziologija i imunobiologija  
2005. – 2009. PMF – Biološki odsjek, preddiplomski studij molekularna biologija  
2001. – 2005. I. Gimnazija Osijek

**Strani jezici:** Engleski  
Njemački  
Španjolski

**Posao:** lipanj - srpanj 2012. – 6 tjedana volontiranja u Peruu, Manu nacionalni park,

- Crees Volunteer Foundation
- Pod vodstvom PhD candidate Andrew Whitworth, Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, Glasgow
  - Konzervacijska teorija: povratak vrsta na uništene dijelove Amazone
  - Mapiranje dijelova prašume
  - Pronalazak novih vrsta

**Sport:** 1996. – 2005. aktivno veslao u klubu Iktus

- 2002. državni prvak 4+JMB
- Razna odličja sa međunarodnih natjecanja

2006. – 2010. rekreativno se bavio veslanjem na razini fakulteta

- 2009. – 2010. Predsjednik veslačkog kluba PMF

### **Laboratorijska stručna praksa**

- ožujak 2009. Zoologijski zavod (pod vodstvom prof. dr. sc. Goran Klobučar i dr. sc. Maja Šrut)