

# Učinak groždanih polifenola na stanični ciklus tumorskih staničnih linija in vitro

---

Pešut, Ena

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:519454>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2020-11-01**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Ena Pešut**

**UČINAK GROŽĐANIH POLIFENOLA  
NA STANIČNI CIKLUS TUMORSKIH  
STANIČNIH LINIJA *IN VITRO***

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Ena Pešut**

**UČINAK GROŽĐANIH POLIFENOLA  
NA STANIČNI CIKLUS TUMORSKIH  
STANIČNIH LINIJA *IN VITRO***

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentorica: doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Rad ima 31 list, 9 slika i 5 tablica.

**Zahvala:**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić, koja je svojim znanstvenim i stručnim savjetima oblikovala ideju i pomogla mi u izradi završnoga rada. Zahvaljujem joj se na pruženoj prilici, strpljenju i izdvojenom vremenu pri pisanju završnoga rada.*

*Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Teuti Opačak-Bernardi na pomoći i stručnim savjetima.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji koja me je podupirala za vrijeme školovanja i poticala moju težnju k ostvarivanju sve viših i viših ciljeva.*

*Zahvaljujem Branimiru što je cijelo vrijeme bio uz mene.*

*Zahvaljujem se i svim djelatnicima Medicinskog fakulteta u Osijeku koji su svojim radom pomogli u stjecanju moga znanja, te životu u struci i oko nje.*

*I na kraju zahvaljujem se svim kolegama i prijateljima koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom i pomogli da to vrijeme smatram najljepšim dijelom svoga života.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Polifenoli i njihova podjela</b> .....	1
<b>1.1.1. Antioksidacijski učinak polifenola</b> .....	3
<b>1.1.2. Protutumorski učinak polifenola</b> .....	4
<b>1.2. Stanični ciklus</b> .....	5
<b>1.3. Regulacija staničnog ciklusa</b> .....	8
<b>1.3.1. Regulacija kontrolnim točkama</b> .....	8
<b>1.3.2. Regulacijske molekule staničnog ciklusa</b> .....	8
<b>1.4. Rak i stanični ciklus</b> .....	9
<b>1.5. Rak debelog crijeva</b> .....	10
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	11
<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	12
<b>4.1. Materijali</b> .....	13
<b>4.1.1. Ispitivani spojevi</b> .....	13
<b>4.1.2. Stanične linije</b> .....	14
<b>4.1.3. Kemikalije</b> .....	14
<b>4.2. Metode</b> .....	15
<b>4.2.1. Uzgoj stanica <i>in vitro</i></b> .....	15
<b>4.2.3. Protočna citometrija</b> .....	15
<b>4.2.4. Statistika</b> .....	17
<b>5. REZULTATI</b> .....	18
<b>6. RASPRAVA</b> .....	22
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	25
<b>8. SAŽETAK</b> .....	26
<b>9. SUMMARY</b> .....	27
<b>10. LITERATURA</b> .....	28

<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>31</b>
----------------------------	-----------

## KRATICE

A431 - stanična linija humanog epidermidnog karcinoma

AAPH - 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid

ABAP - 2,2'-azobis (2-amidinopropan) hidroklorid

ABTS<sup>o+</sup> radikal kation - 2,2,4,4'-azobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

APC/C - anafaza promotorski kompleks/ciklosom

BIRC5 - gen koji kodira protein survivin

Caco-2 - stanična linija izolirana iz kolorektalnog adenokarcinoma

CDK (eng. cyclin-dependent kinases) - kinaze ovisne o ciklinima

DMEM HG - Dulbecco modificirani Eagle-ov medij s visokom koncentracijom glukoze

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

E2F - stanični transkripcijski faktor

EDTA - Etilendiamintetraoctena kiselina

EGCG - epigalokatehin galata

HL60 - stanična linija humane leukemije

HT-29 - stanična linija karcinoma debelog crijeva

LDL (eng. low density cholesterol)

MCF-7 - stanična linija karcinoma raka dojke

MG63 - stanična linija osteosarkoma

mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina

p21 - inhibitor kinaza ovisnih o ciklinu 1, protein p21

p53 - tumor supresorski protein p53

PBS - fosfatom puferirana otopina soli

PC - *Phanerochaete chrysosporium*

PI - propidij jodid

PP - čisti polifenoli

Rb - retinoblastoma protein

SW620 - stanična linija izolirana iz limfnog čvora kao metastaza raka debelog crijeva



TCF-4 - transkripcijski faktor 4

TG - *Trametes gibbosa*

tRNA - prijenosna (transportna) ribonukleinska kiselina

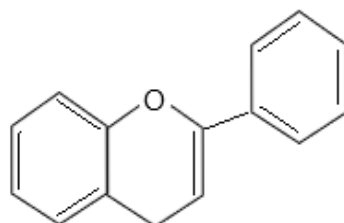
UV - ultraljubičasto zračenje

## 1. UVOD

### 1.1. Polifenoli i njihova podjela

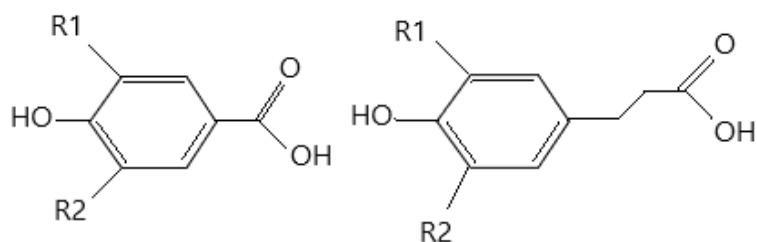
Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji su u brojnim istraživanjima pokazali svoje bioaktivne značajke kao što su antioksidacijsko, antimikrobno, antiproliferativno djelovanje te zaštitu od UV zračenja (1). Čine veliku skupinu međusobno strukturno različitih spojeva koji se ubrajaju u fitokemikalije. Više od 8000 vrsta polifenola je pronađeno i identificirano (2). Nastaju kao derivati fenilalanina s aromatskim prstenom ili hidroksilnom skupinom (3). Mogu se podijeliti na temelju nekoliko svojstava kao što su njihov izvor, biološka funkcija ili kemijska struktura. Prema najnovijoj klasifikaciji, polifenoli se dijele u dvije glavne skupine: flavonoidi i neflavonoidi. U neflavonoide se ubrajaju: fenolne kiseline, stilbene i lignane koje čine najvažnije neflavonoidne podskupine (2).

Najveću skupinu čine flavonoidi, male molekularne mase. Imaju zajedničku flavan jezgru 2-fenilkroman sastavljenu od 15 ugljikovih atoma (Slika 1). Razlike među flavonoidima su posljedica promjena u prstenu kao što su prisutnost dvostruke veze i položajima hidroksilnih i metoksilnih skupina. Povezivanjem acetilnih i malonilnih skupina sa šećernim konjugatima možemo povećati složenost same strukture flavonoida. Takav oblik naziva se glikozidima koji se nalaze u hrani, te su vezani za jedan ili više šećera (4).



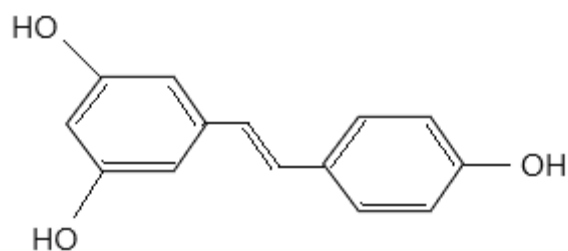
Slika 1. Osnovna struktura flavonoida.

Fenolni spojevi koji se nalaze u prehrani su derivati benzojeve kiseline, hidroksibenzojeve kiseline, cimetne kiseline, i hidroksicimetne kiseline (Slika 2). U hidroksicimetne kiseline koje su relativno česte, ubrajaju se kumarinska kiselina, kofeinska kiselina, ferulinska i još mnoge druge (4).



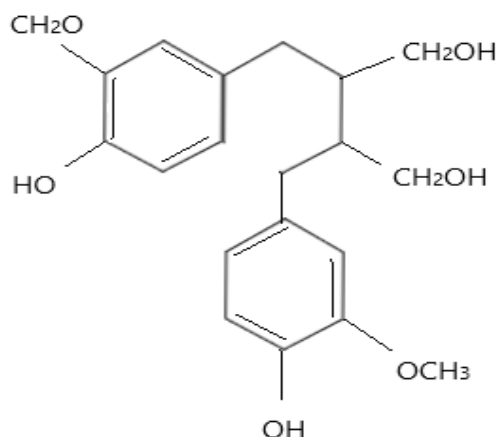
Slika 2. Osnovna struktura hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina.

Stilbeni su građeni od dva fenilna spoja povezana s 2-ugljikovim metilenskim mostom (Slika 3). Najčešće proučavan stilben je trans-3,4,5-trihidroksistilben, poznatiji kao resveratrol. Ima ga u grožđu, crvenom vinu i kikirikiju (4). U ljudskoj prehrani nađeni su samo u niskim koncentracijama (5).



Slika 3. Osnovna struktura stilbena.

Lignani difenolni su spojevi koji sadrže 2,3-dibenzilbutansku strukturu koja nastaje dimerizacijom dvaju ostataka cimetine kiseline (Slika 4) (4). Najbogatiji izvor prehrane je laneno sjeme (5).



Slika 4. Osnovna struktura lignana.

Polifenoli se mogu pronaći u hrani i pićima kao što su voće, povrće, žitarice, bilje, začini, mahunarke, orašasti plodovi, masline, čokolada, čaj, kava i vino te čine najbrojnije antioksidanse u ljudskoj prehrani. Voće sadrži 200 - 300 miligrama polifenola na 100 grama svježe mase, a čaša crnog vina, čaja ili kave sadrži oko 100 mg polifenola (6). Važno je spomenuti koliko su to velike količine koje se unose svakodnevno u organizam, a sudjeluju u brojnim procesima koji štite organizam. Imaju ulogu u obrani organizma od kardiovaskularnih, neuroloških bolesti, dijabetesa, te usporavaju proces starenja. Navedeni zaštitni učinci pobuđuju veliki interes za polifenolnim komponentama, te ih je potrebno bolje proučiti i objasniti mehanizme njihovog djelovanja.

### 1.1.1. Antioksidacijski učinak polifenola

Antioksidativni učinak polifenola je jedna od njihovih najvećih uloga. U svakoj stanici se može pojaviti oksidacijski stres, odnosno poremećaj oksidacije i redukcije u smjeru povećanog stvaranja slobodnih radikala. Slobodni radikali ili oksidansi su svi kemijski spojevi koji mogu prouzročiti oštećenja u stanicama jer imaju po jedan ili više nesparenih elektrona u zadnjoj ljusci (7). Zbog toga su polifenolni spojevi vrlo bitni jer mogu primiti taj jedan elektron i stvoriti stabilan radikal koji će zaustaviti niz oštećenja stanica. To im omogućava njihova fenolna ili pak kateholna skupina s dvije hidroksilne skupine na aromatskom prstenu. Postoje najčešći oksidansi koje polifenoli reduciraju, a to su: ABTS<sup>o+</sup> radikal kation (2,24-azobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), radikali nastali zagrijavanjem spoja AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid) ili ABAP (2,2'-azobis (2-amidinopropan) hidroklorid), željezovi ioni i radikali

nastali autooksidacijom linolne kiseline (6). Brojna su istraživanja dokazala neke antioksidativne aktivnosti pojedinih polifenola ekstrahiranih iz biljaka, a prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Antioksidativne aktivnosti nekih polifenola ekstrahiranih iz biljaka (8).

<b>Polifenoli</b>	<b>Antioksidacijska aktivnost</b>
Ekstrakt grožđa bogat polifenolima	Smanjuje oksidacijski stres u serumu
Ekstrakt sjemenki grožđa	Smanjuje oksidirani LDL (eng. low density cholesterol) u plazmi
Antocijanin	Uklanjaju slobodni radikal
Ekstrakti oraha i badema	Smanjuju peroksidaciju lipida u plazmi
Askorbinska kiselina, rosmadial	Zaštita membrane od oksidacijskog oštećenja

### 1.1.2. Protutumorski učinak polifenola

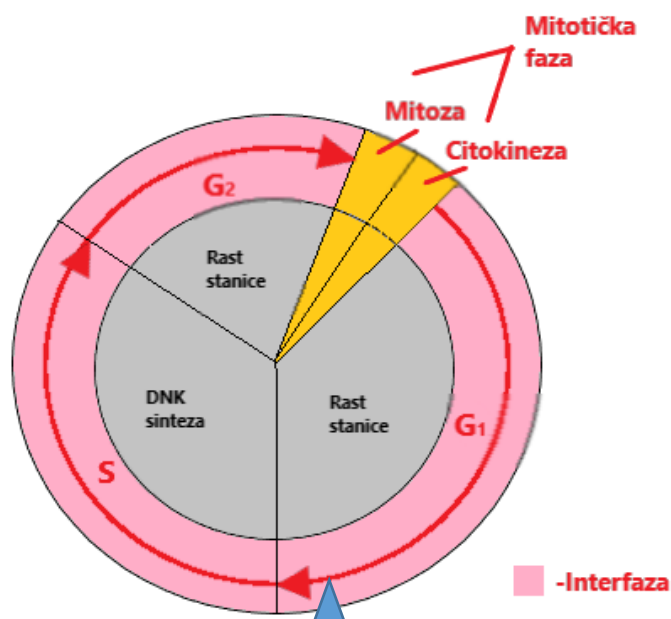
Zloćudni tumori obuhvaćaju skupinu bolesti koje karakterizira nekontrolirana dioba stanica, prodor u okolna tkiva, širenje putem limfe i krvi u druge dijelove organizma, te formiranje sekundarnog tumora ili metastaze. Maligna transformacija je rezultat genetičkih i epigenetičkih promjena onkogeni, tumorsupresorskih gena i gena uključenih u nadzor staničnog ciklusa (9,10). Upravo zbog ovakvih kompleksnih mehanizama tumora sve se više žele istražiti antikancerogene tvari poput polifenola koji će to spriječiti. Polifenoli inhibiraju proliferaciju tumora tako što zaustavljaju ekspresiju onkogeni i aktivnosti ornitin dekarboksilaze ili arahidonske kiseline koji utječu na faktore rasta tumora. Prema tome, može se zaključiti da imaju ulogu u zaustavljanju rasta tumora (6). Neki polifenoli mogu djelovati kao sredstvo blokiranja inicijalne faze čime se mijenja ekspresija citokrom P450 enzima koji su uključeni u proces aktivacije prokancerogeni u kancerogen (8). Također, potiču apoptozu i sprječavaju angiogenezu koja je potrebna da se tumor opskrbi krvlju i time metastazira. Spomenuto je i da polifenoli imaju antioksidacijska svojstva te upravo zbog toga sprječavaju DNK (deoksiribonukleinska kiselina) oksidaciju i smanjuju rizik od nastanka raka (6). Protutumorske aktivnosti nekih polifenola proučavane su na brojnim tumorima na različitim mjestima u organizmu, a neki od njih su navedeni u tablici 2.

Tablica 2. Protutumorske aktivnosti nekih polifenola (8).

<b>Polifenoli</b>	<b>Protutumorska aktivnost</b>
Proantocijanidi	Inhibira metastaziranje raka dojke
Antocijanin	Zaštita genetskog DNK integriteta i rast krvnih žila u nekim tumorima
Epigalokatehin-3-galat	Inhibira proteasom i inducira smrt stanica tumora; sprečavanje rasta raka prostate
Galinska kiselina	Sprječava karcinogenezu raka debelog crijeva inhibiranjem oštećenja DNK
Resveratrol	Inhibira svaku fazu višestupanjske karcinogeneze, uklanja početne populacije stanica raka prostate ovisne o androgenu

## 1.2. Stanični ciklus

Stanični ciklus je proces staničnog rasta i podjele koji svaka stanica mora proći. Dijeli se na dva dijela: mirovanje (interfaza) koja je karakterizirana rastom stanice i faza diobe stanice (mitoza). Stanični ciklus predstavlja temelj za nastanak odraslog organizma iz jedne oplođene jajne stanice, ima ulogu i u obnavljanju stanica. Kada promatramo eukariotski stanični ciklus koji ujedno predstavlja i ljudske stanice u samoj kulturi, možemo reći da on traje 24 sata. 95 % vremena staničnog ciklusa stanica je u interfazi koja se dijeli na 3 faze: G1 (eng. *gap*), S (sinteza) i G2 fazu, ostatak bi bio M faza (mitoza) (Slika 5) (10).

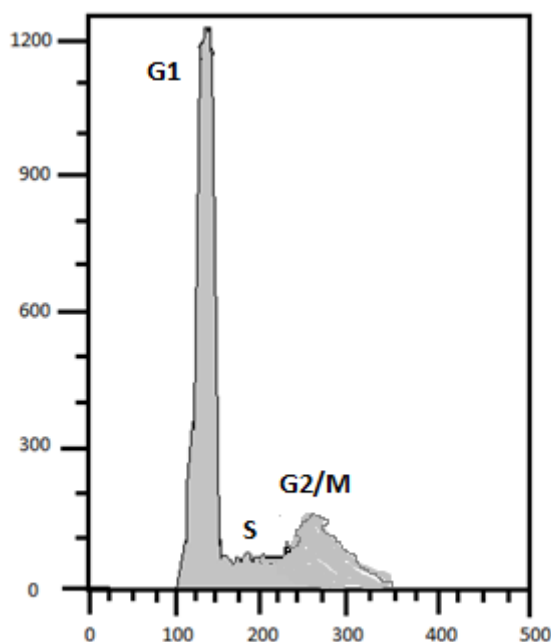


Slika 5. Shema staničnog ciklusa. Karakteristične faze staničnog ciklusa (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M) i prva kontrolna točka na kraju G<sub>1</sub> faze.

Poznato je vrijeme koliko stanica provede u svakoj od tih faza. U G<sub>1</sub> fazi oko 11 sati, S fazi oko 8 sati, G<sub>2</sub> fazi oko 4 sata i M fazi oko 1 sat. Svaka od tih faza ima svoju značajnu ulogu i vrlo je važno da ju ispune u potpunosti. U G<sub>1</sub> fazi se stanica priprema za udvostručenje, odnosno raste i sintetizira tRNK, mRNK, ribosome i enzime. Kada je spremna za udvostručenje, ide u S fazu u kojoj se odvija replikacija DNK. G<sub>2</sub> faza započinje dovršenjem DNK te se tu odvija sinteza proteina za mitozu, formiranje centrosoma i mikrotubula. Nakon toga slijedi M faza koja je karakterizirana podjelom jezgre (kariokineza) i citoplazme (citokineza). Količina DNK u G<sub>2</sub>/M fazi je dvostruka u odnosu na G<sub>1</sub> fazu (10). Kariokineza se sastoji od profaze, prometafaze, metafaze, anafaze i telofaze i rezultira odvajanjem sestrinskih kromatida i kromosoma u dvije stanice kćeri. Tijekom tih faza kromosomi se kondenziraju i stvara se diobeno vreteno na koje će se kromosomi vezati. Dijelovi na diobenom vretenu gdje se vežu kromosomi se nazivaju mikrotubuli. Kromatide se odvajaju i kreću na suprotne polove diobenog vretena stvarajući dvije jezgre. Nakon toga slijedi podjela citoplazme. Osim navedenih faza, ukoliko se stanica nađe u neodgovarajućim uvjetima, ulazi u fazu mirovanja tzv. G<sub>0</sub> fazu gdje je metabolički inaktivna do trenutka uspostave povoljnih uvjeta za rast. Neke stanice su privremeno u G<sub>0</sub> fazi sve dok

vanjski signal ne izazove početak G1. Druge stanice koje se nikada ili jako rijetko dijele, kao što su zreli srčani mišić i živčane stanice, trajno ostaju u G0 (11).

Da bi se analizirao stanični ciklus, potrebno je utvrditi u kojoj fazi se nalaze promatrane stanice. U fazi mitoze stanice se mogu vidjeti uz pomoć mikroskopa, a za ostale faze koristimo biokemijske analize. Jedna od najčešćih metoda je razlikovanje faza prema količini DNK. Haploidnu količinu DNK u stanicama označavamo kao  $n$ . Ljudske eukariotske stanice imaju diploidnu količinu DNK u stanicama što bi označili kao  $2n$ . Prilikom faze replikacije, udvostručuje se količina DNK što bi se označilo kao  $4n$ . Tijekom G2 i M faze još uvijek je ista udvostručena količina DNK dok ne dođe do citokineze i smanjenja količine DNK na  $2n$ . Ukupna količina DNK u stanici može se eksperimentalno odrediti inkubacijom stanica s fluorescentnom bojom koja ima svojstvo vezanja za DNK, nakon koje se pomoću protočnog citometra mjeri intenzitet fluorescencije pojedinačnih stanica. Taj intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini DNK. Rezultati protočnog citometra se prikazuju histogramom na kojem se mogu vidjeti tri pika koja označavaju G0/G1 fazu, S fazu i G2/M fazu (Slika 6). U fazama G0/G1 nalazi se ista nereplicirana količina DNK u stanici pa ih se ne može razlikovati što vrijedi i za G2/M fazu koja ima istu udvostručenu količinu DNK (10).



Slika 6. Skica histograma staničnog ciklusa. Histogram analize nesinhroniziranog staničnog ciklusa i karakterističnih pikovih pojedinih staničnih faza.



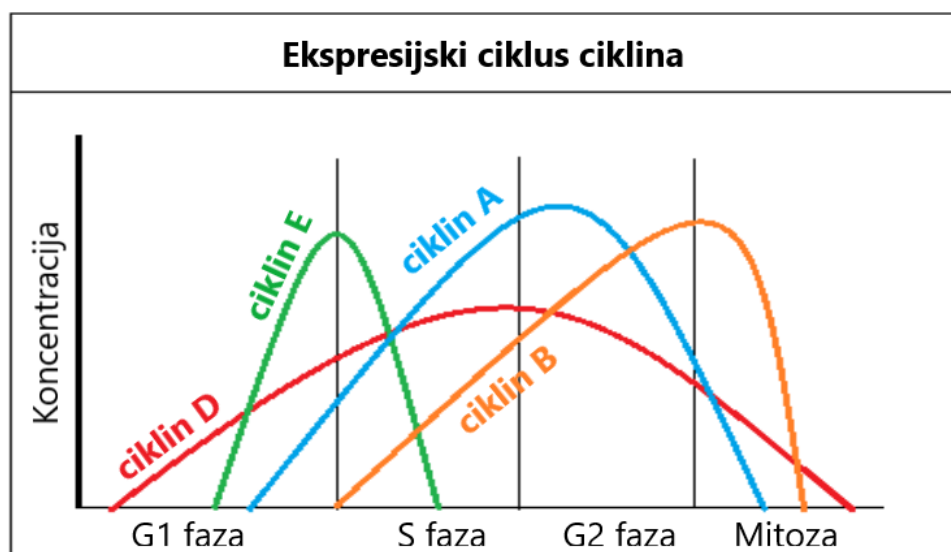
## 1.3.Regulacija staničnog ciklusa

### 1.3.1. Regulacija kontrolnim točkama

Znanje o tome kako se kontrolira stanični ciklus, iako još uvijek nepotpuno, u proteklih je 30 godina iznimno raslo. Trenutni pogled integrira dva osnovna pojma. Prvo, stanični ciklus ima dvije nepovratne točke: repliciranje genetskog materijala i odvajanje sestrinskih kromatida. Drugo, stanični ciklus može se zaustaviti na određenim mjestima pod nazivom kontrolne točke (12). Prva kontrolna ili restriksijska točka R je na kraju G1 faze, druga kontrolna točka G2/M na kraju G2 faze, dok je treća u fazi mitoze na prijelazu iz metafaze u anafazu. G1 kontrolna točka određuje jesu li svi uvjeti povoljni za repliciranje stanica. Tu se stanica nepovratno obvezuje na proces diobe stanice. Provjeravaju se genomska oštećenja DNK, dovoljna prisutnost faktora rasta i diobe. G2 kontrolna točka sprječava ulazak u mitotičku fazu ako se ne zadovolje određeni uvjeti poput rezervi proteina. Međutim, najvažnija uloga je provjera jesu li kromosomi replicirani i ima li oštećenja DNK. Ako mehanizmi kontrolne točke prepoznaju probleme s DNK, stanični ciklus je zaustavljen, a stanica pokušava popraviti oštećenje. M kontrolna točka pojavljuje se blizu kraja metafaze kariokineze. Poznata je i kao kontrolna točka vretena, jer određuje je li pričvršćenje na mikrotubule diobenog vretena ispravno. Budući da je odvajanje sestrinskih kromatida tijekom anafaze nepovratni korak, ciklus se neće nastaviti sve dok se čvrsto ne usidre na najmanje dva vretena (11).

### 1.3.2. Regulacijske molekule staničnog ciklusa

Pored unutarnjih kontrolnih točaka, postoje dvije skupine intracelularnih molekula koje reguliraju stanični ciklus. Ove regulatorne molekule mogu poticati napredovanje stanice u sljedeću fazu (pozitivna regulacija) ili zaustaviti ciklus (negativna regulacija). Mogu djelovati pojedinačno ili mogu utjecati na aktivnost i proizvodnju drugih regulacijskih proteina. Skupine proteina, nazvanih ciklini (*eng. cyclins*), kinaze ovisne o ciklinu (CDK, *eng. cyclin-dependent kinases*) te inhibitori kinaza ovisni o ciklinima odgovorni su za napredak stanice kroz različite kontrolne točke. Razine četiri ciklina fluktuiraju kroz stanični ciklus (Slika 7) (11). Povećanje koncentracije ciklinskih proteina potaknuto je i vanjskim i unutarnjim signalima. Ciklini reguliraju stanični ciklus samo kada su čvrsto vezani za CDK te taj kompleks mora biti fosforiliran da bi bio aktivan (11).



Slika 7. Ekspresijski ciklus ciklina. Razine četiri ciklina D, E, A, B fluktuiraju kroz G1, S, G2 fazu i mitozu staničnog ciklusa (11).

Negativne regulatorne molekule su retinoblastoma protein (Rb) te proteini p53 i p21 koji prvenstveno djeluju na G1 kontrolnoj točki. Ako se otkrije oštećena DNK, p53 zaustavlja stanični ciklus i aktivira enzime za popravak DNK. Ako se DNK ne može popraviti, p53 može potaknuti apoptozu ili smrt stanice, kako bi se spriječilo dupliciranje oštećenih kromosoma. P21 zaustavlja ciklus vezanjem i inhibiranjem aktivnosti CDK/ciklin kompleksa. Rb prati veličinu stanica te se veže na proteine nazvane transkripcijski čimbenici, najčešće E2F. Kao rezultat toga, proizvodnja proteina potrebnih za prijelaz u novu fazu se zaustavlja (11).

#### 1.4. Rak i stanični ciklus

Osim prethodno spomenute definicije raka, može se reći da je on u osnovi zapravo neuspjeh kontrole stanične diobe, odnosno dijeljenja stanica (12). Geni koji kodiraju proteine pozitivnih regulatora staničnog ciklusa nazivaju se protoonkogenima koji kad mutiraju nazivaju se onkogenima (11).

Djelovanje protoonkogenično često se odnosi na signalizaciju faktora rasta, a njihova mutacija može dovesti do gubitka kontrole rasta (12). Osim toga, mutaciju gena može uzrokovati i promjena

koja povećava aktivnost pozitivnog regulatora. Na primjer, mutacija koja omogućuje aktiviranje CDK bez ciklina, koji bi mogao gurnuti stanični ciklus pored kontrolne točke prije nego što su svi potrebni uvjeti ispunjeni (11). Tumor supresorski geni su segmenti DNK koji kodiraju proteine negativnih regulatora Rb, p53 i p21 i ako stanica nosi mutirani oblik možda neće moći zaustaviti stanični ciklus. Jedan od primjera je stanica s neispravnim p53 koja ne može otkriti pogreške prisutne u genomskoj DNK, signalizirati potrebne popravke enzima DNK ili potaknuti apoptozu (11).

### **1.5. Rak debelog crijeva**

Rak debelog crijeva jedna je od najčešćih zloćudnih novotvorina među stanovništvom razvijenog svijeta, te prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, predstavlja drugi najčešći rak. Kod muškaraca je zastupljen oko 15 % (iza raka pluća) i češći je nego kod žena koje su zahvaćene u 13 % slučajeva nakon raka dojke. Postoje brojni čimbenici za nastanak raka debelog crijeva, a među njima najvažnija je dob. Najčešći je oko 75. godine života te je u 5 % do 10 % moguća ponovna pojavnost i nakon operacije raka debelog crijeva (13). U ostale rizike za rak debelog crijeva pripadaju polipi debelog crijeva, učestalost pojavnosti u obitelji, upalne bolesti kao što su ulcerozni kolitis i Crohnova bolest te nepravilna prehrana (14). Histološki, zloćudni karcinomi debelog crijeva uglavnom su adenokarcinomi koji mogu biti dobro diferencirani, umjereno ili slabo diferencirani. Ostali oblici kao što su limfomi i karcinoidi su manje zastupljeni. Brzina rasta i metastaziranje raka debelog crijeva direktno utječe na prognozu, odnosno preživljavanje oboljelih. Početak rasta i ishodište širenja predstavlja mukoza debelog crijeva. Rak dalje može prodirati kroz sve slojeve sve do stjenke crijeva. Počinje se širiti hematogenim i limfnim putem i metastazirati u druge organe, najčešće su to jetra i pluća. Budući da mu je incidencija vrlo visoka uz mogućnost recidiva, težina operativnih zahvata koji ovise o tome koji dio debelog crijeva je zahvaćen i koliko je duboko prodirao kroz stjenku crijeva, teži se za otkrivanjem novih lijekova koji bi utjecali na njegovu smanjenu pojavnost i mogućnost izlječenja (13).

## **2. HIPOTEZA**

Polifenoli izolirani iz groždanog tropa utječu na normalno odvijanje staničnog ciklusa tumorskih staničnih linija karcinoma debelog crijeva *in vitro*.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- ispitati utječu li polifenoli izolirani iz groždanog tropa na odvijanje staničnog ciklusa tumorskih staničnih linija *in vitro*.
- utvrditi mijenja li se učinkovitost polifenolnih komponenti na stanični ciklus nakon djelovanja mikroorganizama koji potiču razgradnju groždanog tropa.
- utvrditi povezanost između biološke aktivnosti sirovog polifenolnog ekstrakata i ekstrakta pripremljenog nakon djelovanja mikroorganizama

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

#### 4.1.1. Ispitivani spojevi

U istraživanju je upotrijebljen ekstrakt čistih polifenolnih komponenti (PP) i ekstrakti polifenola dobiveni nakon djelovanja mikroorganizma: *Phanerochaete chrysosporium* (PC) i *Trametes gibbosa* (TG) u koncentracijama koje odgovaraju IC<sub>50</sub> vrijednostima. IC<sub>50</sub> je koncentracija koja rezultira s 50 % inhibicijom rasta tumorskih stanica nakon provedenog MTT (test citotoksičnosti *in vitro*) testa. U tablici 3 prikazane su koncentracije za svaku staničnu liniju (SW620 i Caco-2) s obzirom na tretman koji je trajao 48 sati.

Tablica 3. Koncentracije koje odgovaraju IC<sub>50</sub> vrijednosti za stanične linije SW620 i Caco-2 s obzirom na tretman PP, TG i PC (t = 48 h)

Stanična linija	Tretman	Koncentracija (mg/ml)
SW620	PP	1,45
	TG	1,16
	PC	0,98
CaCo-2	PP	1,13
	TG	0,91
	PC	1,08

*Trametes gibbosa* (TG) je gljiva koja pripada bazidiomicetama, te je u mnogim istraživanjima izazvala interes zbog posjedovanja brojnih oksidoreduktaza, odnosno lignolitičkih enzima kao što su mangan i lignin peroksidaza koji se trenutno ne koriste samo za degradaciju lignina, nego i za bioremedijaciju, odnosno sposobnosti da razgradi štetne tvari u tlu i vodi kao i fenolne spojeve. Zahvaljući tome ona može razgraditi neke prehrambene tvari kao što je pšenica (15).

*Phanerochaete chrysosporium* (PC) je bijela bazidiomicetna gljiva koja također posjeduje mangan i lignin peroksidazu, enzime kojima potiče degradaciju lignina te su zabilježeni podaci da može katalizirati degradaciju širokog spektra organskih spojeva. Genom PC je sekvencioniran i pokazuje genetički potencijal proizvodnje više od 100 citokrom P450 monooksigenaza (16,17).

#### 4.1.2. Stanične linije

U ispitivanju učinka polifenola izoliranih iz groždanog tropa na odvijanje staničnog ciklusa tumorskih stanica *in vitro* korištene su dvije humane tumorske stanične linije:

- SW620 (ATCC® CCL-227™) je stanična linija koja je izolirana iz limfnog čvora 51-godišnjeg bijelca kao metastaza raka debelog crijeva, te je epitelne morfologije. Utvrđena stanična linija sastoji se od malih kuglastih i bipolarnih stanica sličnih mikrovilima. Koristi se kao *in vitro* model za proučavanje ključnih staničnih procesa tijekom nastanka metastaza (18,19).
- Caco-2 (ATCC® HTB-37™) je stanična linija izolirana iz kolorektalnog adenokarcinoma epitelne morfologije. Imaju sposobnost da prilikom kultiviranja pod specifičnim uvjetima, stanice postaju diferencirane tako da njihov fenotip, morfološki i funkcionalno, podsjeća na enterocite koji se nalaze u tankom crijevu. Caco-2 stanice izražavaju čvrste spojeve, mikrovilije i brojne enzime i transportere koji su karakteristični za takve enterocite: peptidaze, esteraze, P-glikoproteine, transportere za uzimanje uzorka za aminokiseline, žučne kiseline, karboksilne kiseline (20,21,22).

#### 4.1.3. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela istraživanja korišteni su reagensi i kemikalije različitih proizvođača:

- 0.25 % Tripsin/EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina) s kalcijem i magnezijem (PAN-Biotech, Njemačka)
- DMEM HG (Dulbecco modificirani Eagleov medij s visokom koncentracijom glukoze: 4.5 g/l i L-glutaminom) (Capricorn scientific)
- fetalni goveđi serum
- PBS (fosfatom puferirana otopina soli) (Capricorn scientific)
- propidij jodid (PI)
- 70 %-tni etanol
- RNase
- Tripan plavilo

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Uzgoj stanica *in vitro*

- Stanice su uzgojene u bocama za uzgoj aktivne površine rasta u CO<sub>2</sub> inkubatoru (Jouan IGO150 CELLlife, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) u uvjetima 37 °C i 5 % uz visoku vlažnost atmosfere. Medij za uzgoj je DMEM HG s visokom koncentracijom glukoze: 4.5 g/l i L-glutaminom, 10 % seruma, bez antibiotika. Uslijedilo je uklanjanje medija, ispiranje stanica PBS-om i dodatak tripsina s ciljem odvajanja stanica od podloge za rast. Stanična suspenzija pripremljena je prikupljanjem stanica s 5 ml svježeg medija.

### 4.2.2. Brojanje stanica

- Broj živih i mrtvih stanica određivan je pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Njemačka) i brojan pomoću Bürker-Türk-ove komorice.. Za brojanje stanica uzima se 50 µL prethodno resuspendiranih stanica i 100 µL tripan plavila koji specifično boji mrtve stanice u plavo zbog njihove oštećene membrane. Broj živih stanica određen je po formuli:

$$\text{broj stanica} = \frac{N}{4} \times 3 = X \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

gdje je: N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

### 4.2.3. Protočna citometrija

- Protočni citometar se sastoji od tri međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak. Osnovni koncept protočne citometrije je korištenje načela laminarnog protoka čija brzina iznosi 100 – 5000 stanica u sekundi, ali se može i prilagođavati. Stanice prolaze kroz sustav uske kapilare, dolaze do snopa laserskog svjetla koje s lećama, filtrima i osjetnicima čine optički sustav. Stanice se obasjavaju laserskim svjetlom, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica: veličine i zrnatosti. Svjetlost koja se raspršila pod malim kutom pripada veličini stanice, a pod pravim kutom zrnatosti. Fluorokromima obilježavamo stanice koje, obasjane laserskom svjetlošću, emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je detektori protočnog



citometra. Sve svjetlosne signale elektronski sustav pretvara u digitalne signale koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu. Može se analizirati između 1000 i 10 000 stanica unutar nekoliko sekundi. Protočna citometrija je prva metoda u kliničkoj primjeni. Ona daje uvid u dvije, biološki važne informacije: sadržaj DNK u stanicama i procjenu faze staničnog ciklusa na osnovu sadržaja DNK (23,24).

### **POSTUPAK:**

U ploče za uzgoj stanica sa 6 jažica (Falcon® 6-well Multiwell Plate, Durham, NC, USA) nasadene su stanice u koncentraciji  $1 \times 10^5$  st/ml i ostavljene 24 sata u CO<sub>2</sub> inkubatoru kako bi se prihvatile za podlogu. Nakon 24 sata na stanice su dodani polifenolni ekstrakti u definiranim koncentracijama (Tablica 3), kojima su stanice bile izložene sljedećih 48 sati. U istim uvjetima uzgojene su i kontrolne, netretirane stanice. Po isteku vremena tretmana, medij u kojem su stanice uzgojene i tretirane, prenosi se u Falcon epruvetu od 15 ml, stanice se ispiru sa 1 ml PBS-a, i odvajaju od podloge dodatkom 1ml tripsina. Stanice se prikupe s odgovarajućim medijem koji je prethodno prikupljen u označenu Falcon epruvetu. Slijede koraci centrifugiranja (1100 okretaja /5 min) i ispiranja stanica s PBS-om što se ponavlja dva puta. Stanice se resuspendiraju u 200 µl PBS-a, fiksiraju s 3 mL hladnog 70 %-tnog etanola uz lagano, stalno miješanje i ostavljaju na -20 °C do trenutka analiziranja. Prije analiziranja stanice se centrifugiraju, ispiru s 1 mL PBS-a pa ponovno centrifugirane i promiješane s 350µl PBS-a. Nakon dodavanja PBS-a dodano je 30µL RNase kojoj je potrebno pet minuta da djeluje. Nakon djelovanja RNase u svaki je uzorak dodano 150µL propidij jodida. Uzorci su ostavljeni u mraku 30 minuta na hladnom do analize. Analiza je provedena na protočnom citometru FACSSanto II (Becton Dickinson Bioscience, New Jersey, SAD). Analizirano je minimalno 20000 stanica. Propidi jodid (PI) je fluorescentna crvena boja koja se ugrađuje u dvostruki lanac molekule DNK i njezin intenzitet emisijskog spektra je razmjerni količini ugrađene boje koja je pak proporcionalna količini DNK u stanicama, koja je jednaka 2n u GO/G1 fazi i 4n u G2/M fazi. U S fazi količina DNK ovisit će o stupnju replikacijskog ciklusa. Podaci su analizirani i obrađeni primjenom programa FlowJo verzija 10.2. implementacijom Watson modela. Rezultat se prikazuje u obliku histograma ili tablično i izražava u postotku (%) nakon provedene statističke analize (23,24).

#### 4.2.4. Statistika

- Analiza staničnog ciklusa je provedena za svaki uzorak u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost dva uzorka (%). Podaci su statistički obrađeni u statističkom programu STATISTICA 13.0 za Windows operativne sustave primjenom student t-testa ( $p < 0,05$ ).

## 5. REZULTATI

U istraživanju je praćen učinak ekstrakata polifenola dobivenih iz tropa grožđa na stanični ciklus dviju tumorskih staničnih linija, SW620 i Caco-2. Primijenjen je ekstrakt čistih polifenolnih komponenti (PP) i ekstrakti polifenola grožđanog tropa dobivenih nakon djelovanja mikroorganizma: *Phanerochaete chrysosporium* (PC) i *Trametes gibbosa* (TG). Analiziran je učinak ekstrakata u odnosu na kontrolne stanice nakon 48 sati izloženosti. Rezultati su prikazani tablično (Tablica 4 i 5) i histogramski (Slika 8 i 9).

Tretman PP, odnosno ekstrakt čistih polifenola na staničnu liniju SW620 pokazuje značajan učinak. U kontroli je prisutno 47,7 % stanica u G1 fazi, a nakon tretmana se primjećuje pad na 27,8 %. U S fazi se udio stanica smanjio za 6,6 %, dok je G2 faza u tretiranim stanicama zastupljena s 30,0 % u ukupnom udjelu stanica, što čini značajni porast za 17,3 % u odnosu na kontrolu. Na staničnu liniju Caco-2 se također primjećuje inhibitorni učinak na rast stanica te sa 55,9 % u kontrolnoj G1 fazi se smanjio broj stanica na 41,95 % nakon tretmana. U S fazi se broj stanica smanjio za 3,6 %, a u G2 fazi se primjećuje porast stanica za 5,0%.

TG tretman pokazao je manje značaju promjenu u fazama staničnog ciklusa s obzirom na kontrolu. U G1 fazi u staničnoj liniji SW 620 može se primijetiti porast stanica za 7 % u odnosu na kontrolu, a u G2 fazi za 6,8 %. U S fazi se primjećuje smanjenje broja stanica za 9,8 % u odnosu na kontrolu. Promjena broja stanica u S i G2 fazi su statistički značajne. Na Caco-2 staničnoj liniji promjene u staničnom ciklusu su male i statistički neznačajne u usporedbi s kontrolnim stanicama. Tako je G1 faza smanjena za 6,8 %, S faza povećana za 3,9 %, dok je najmanja promjena u G2 fazi koja je smanjena za 0,6 %.

PC tretman na staničnu liniju SW 620 uzrokuje povećani broj stanica u G1 fazi sa 47,7 % na 57,8 %. U G2 fazi dogodio se mali porast za 0,7 %, dok se u S fazi uočava smanjeni broj stanica za 5,8 %. Za staničnu liniju Caco-2 zabilježene su sljedeće promjene: porast udjela stanica za 2,5 % u G1 fazi, dok je u fazama G2 i S smanjenje stanica za 2,3 %, odnosno 6,8 %.

Tablica 4. Udio živih stanica u fazama staničnog ciklusa u SW620 staničnoj liniji s obzirom na tretman polifenolima.

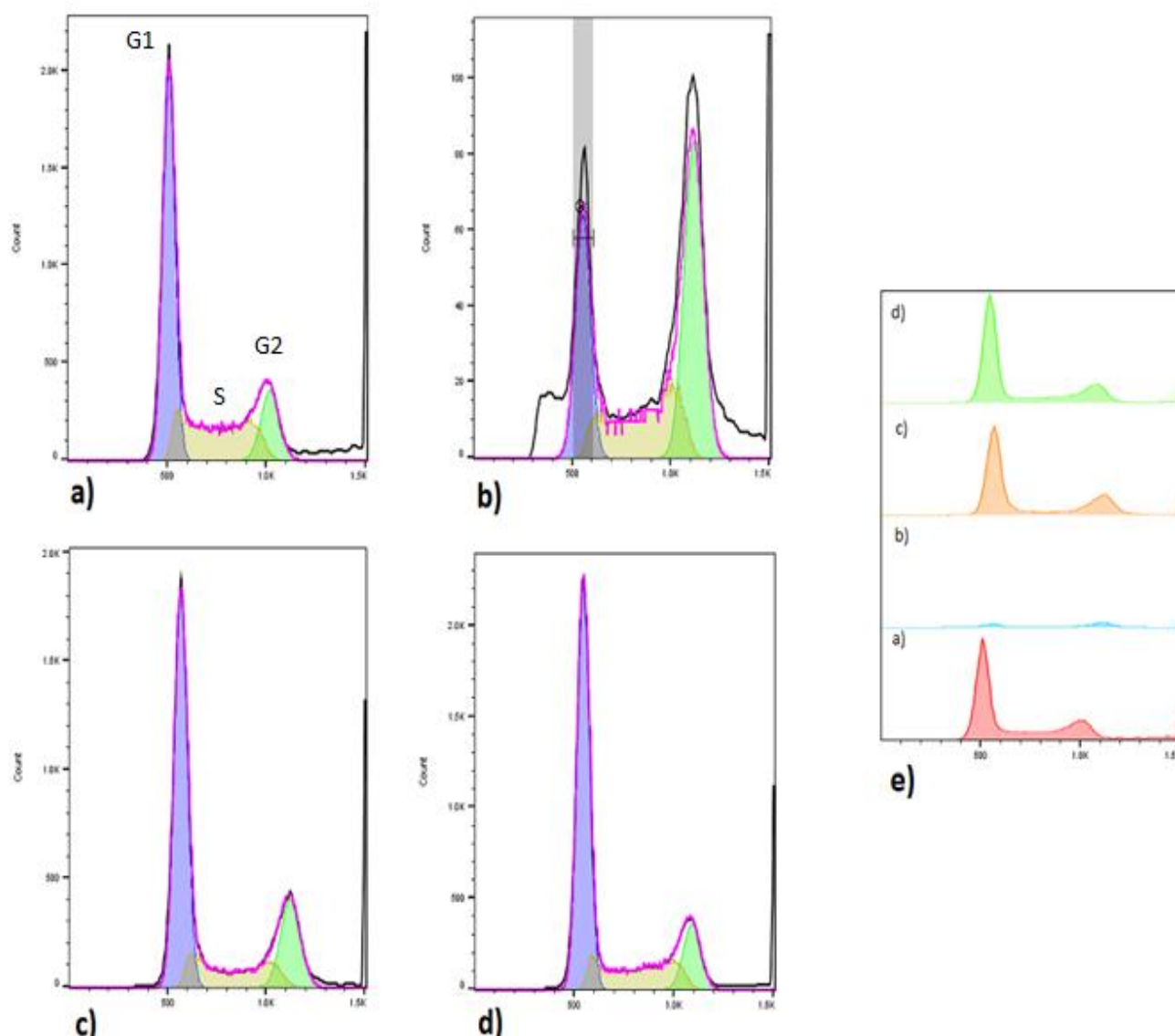
Stanična linija	Tretman	Žive stanice u G1 fazi (%)	Žive stanice u S fazi (%)	Žive stanice u G2 fazi (%)
SW620	kontrola	47,7	26,7	12,7
	PP	27,8 *	20,5	30,0*
	TG	54,7	16,9*	19,5*
	PC	57,8*	20,9	13,4

(\*) – statistička značajnost na razini  $p < 0,05$

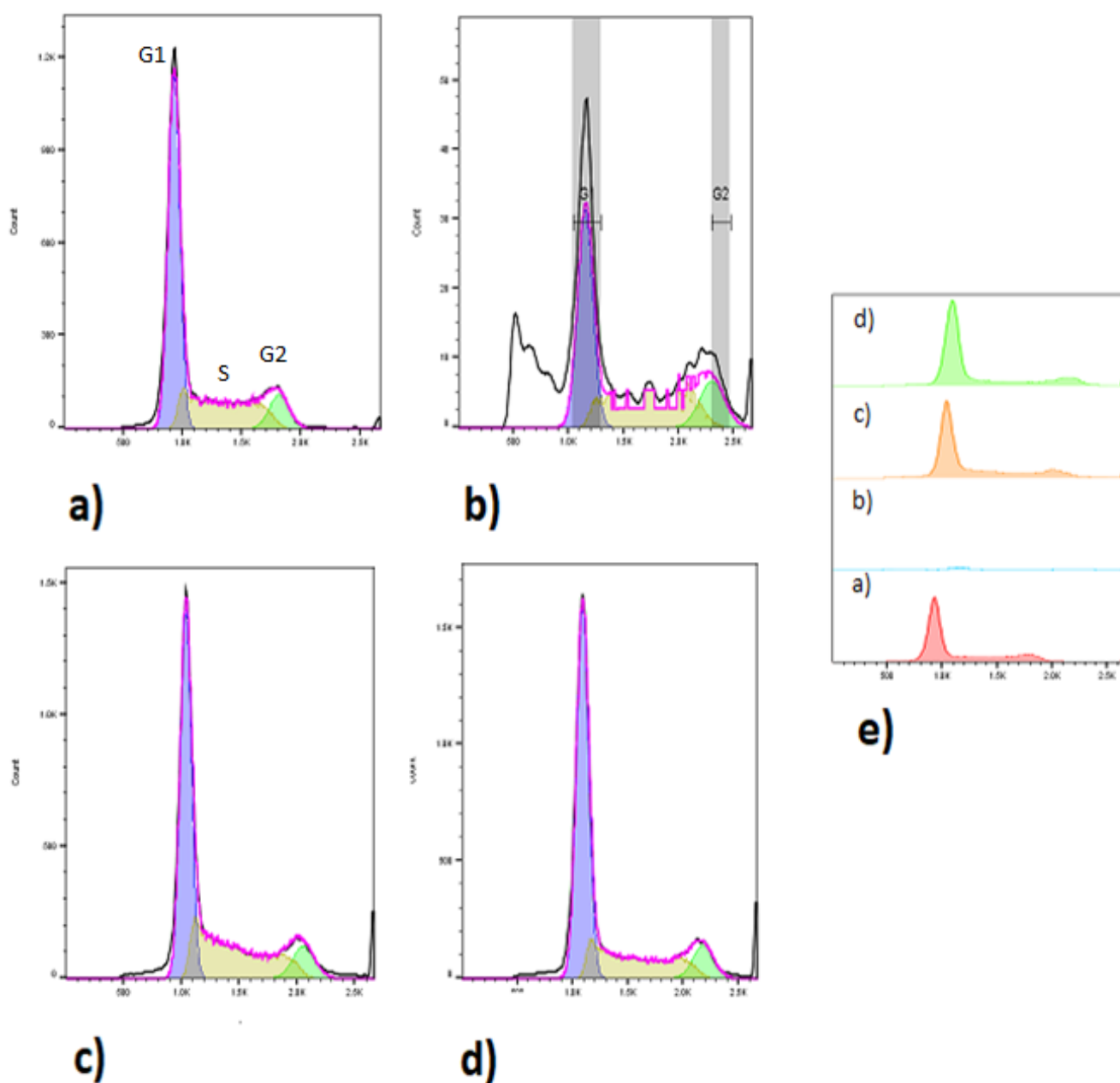
Tablica 5. Udio živih stanica u fazama staničnog ciklusa u Caco-2 staničnoj liniji s obzirom na tretman polifenolima.

Stanična linija	Tretman	Žive stanice u G1 fazi (%)	Žive stanice u S fazi (%)	Žive stanice u G2 fazi (%)
Caco-2	kontrola	55,9	30,1	9,4
	PP	42,0*	26,5	14,5*
	TG	49,1	34	8,8
	PC	58,3	23,3	11,7

(\*) – statistička značajnost na razini  $p < 0,05$



Slika 8. Učinak polifenolnih ekstrakata na stanični ciklus SW620. Ispitivana stanična linija izložena je djelovanju ekstrakta u vremenu od 48 sati i pri određenim vrijednostima koncentracija kako slijedi: a) kontrola; b) PP (1,45 mg/ml); c) TG (1,16 mg/ml); d) PC (0,98 mg/ml), e) usporedba aktivnosti ekstrakata. Histogrami prikazuju učinak polifenolnih ekstrakata na G1, S i G2/M faze ciklusa u odnosu na kontrolu (a)



Slika 9. Učinak polifenolnih ekstrakata na stanični ciklus Caco-2. Ispitivana stanična linija izložena je djelovanju ekstrakta u vremenu od 48 sati i pri određenim vrijednostima koncentracija kako slijedi: a) kontrola; b) PP (1,13 mg/ml); c) TG (0,91 mg/ml); d) PC (1,08 mg/ml), e) usporedba aktivnosti ekstrakata. Histogrami prikazuju učinak polifenolnih ekstrakata na G1, S i G2/M faze ciklusa u odnosu na kontrolu (a).

## 6. RASPRAVA

Rak je danas jedna od najčešćih bolesti u svijetu i ima vrlo kompleksan mehanizam nastanka te prema tome i otežano liječenje uz posljedicu visoke smrtnosti. Zbog toga je težnja za pronalaskom antitumorskih lijekova sve veća. Rak debelog crijeva je treći po broju malignih oboljenja u odrasloj populaciji i odgovoran je za 9 % smrtnih slučajeva u svijetu koji su nastupili kao rezultata malignog oboljenja (25). Međutim, rak debelog crijeva se može donekle spriječiti. Promjena u načinu prehrane i životnog stila ima značajan utjecaj na smanjenje rizika od pojave kolorektalnog tumora. Posebice, značajnu ulogu imaju polifenoli iz grožđa i čaja, koji pokazuju kemoprotektivna i terapijska svojstva u zaštiti od tumora debelog crijeva, ali i drugih malignih oboljenja (25). Zainteresiranost za polifenole kao takve je velika, te se oni danas ispituju na različite načine *in vivo* i *in vitro*, odnosno konzumiranjem ekstrahiranih polifenola ili pak učinkom na tumorske stanične linije. Mogu se izdvojiti četiri glavna mehanizma kojima polifenoli djeluju i zaustavljaju stanični ciklus tumorskih stanica: antioksidativna aktivnost, regulacija proteina p53, inhibicija aktivnosti protein kinaza i apoptoza (26). Prema dobivenim rezultatima u ovom istraživanju može se reći da ekstrakt čistih polifenola (PP) iz groždanog tropa na staničnu liniju SW 620 i Caco-2 pokazuje značajnu promjenu u sve tri analizirane faze staničnog ciklusa (G1, S, G2/M). Polifenoli mogu djelovati moduliranjem ciklina, Cdk ili APC/C (kompleks koji stimulira anafazu/ciklosom) koji uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa (27). Na primjer, polifenol epigalokatehin galata (EGCG) inhibira aktivnost CDK induciranjem inhibitora ciklin-ovisne kinaze p21 i ekspresije p27. Osim toga, EGCG smanjuje aktivnost telomeraze u stanicama raka dojke, čime se povećava stanična apoptoza i inhibira stanična proliferacija (27). Resveratrol (3,5,4'-trihidroksitrans-stilben), jedan od najzastupljenijih groždanih polifenola, prisutan je samo u grožđu, već i u crnom vinu, pokazuje potencijal u prevenciji razvoja raka debelog crijeva (25). Inhibira proliferaciju tumorskih stanica zaustavljajući stanični ciklus u različitim fazama ciklusa, ovisno o staničnoj liniji (28). Prvo, inducira zaustavljanje staničnog ciklusa pri prijelazu faza S-G2 preko pretjerane ekspresije ciklina A i E bez ekspresije p21 u stanicama leukemije HL60 (29). Drugo, u stanica humanog raka debelog crijeva inducira apoptozu pojačavanjem aktivacije tumorskog supresora p53 i aktivira kaspase 3 i 8 kroz reaktivne kisikove radikale, što konačno dovodi do aktivacije apoptoze (30). Također je utvrđeno da resveratrol smanjuje proliferaciju stanične linije A431 (humani epidermidni karcinom) i staničnih linija karcinoma debelog crijeva djelujući na smanjenje ekspresije ciklina D1, D2, E2 i proteina CDK-2, -4, -6 i povećanje količine CDKN1A

i 1B proteina (28). Apigenin, flavonoid prisutan u voću i povrću, pokazuje gotovo identičan način djelovanja na navedene cikline i proteine te zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi staničnog ciklusa što je utvrđeno na dvije p-53 mutirane stanične linije, HT-29 i MG63 (stanična linija osteosarkoma) (28), pri čemu je HT-29 stanična linija panela tumorskih linija debelog crijeva. Rezultati studije Schneidera i sur. iz 2000. godine pokazali su da resveratrol, kao jedan od groždanih polifenola, uglavnom ima inhibitorni učinak na stanični rast, ne djeluje toksično, te zaustavlja stanični ciklus Caco-2 stanica u S/G2 fazi (31). Njihovi rezultati su u skladu s našim istraživanjima i povećanju udjela stanica u G2/M fazi što se može objasniti prisutnošću ukupnih polifenola, a ne djelovanju samog resveratrola. Studija Hakimuddina o utjecaju ukupnih groždanih polifenola na stanični ciklus MCF-7 (stanična linija karcinoma dojke) stanica, navodi da je stanični ciklus bio zaustavljen u G2/M fazi praćen smanjenjem staničnog udjela u S fazi (32), što je u skladu s našim rezultatima koji su pokazali statistički značajno povećanje udjela stanica u G2/M fazi i na Caco-2 i SW620 stanicama. Pri tome je SW620 stanična linija pokazala veću osjetljivost na prisutnost polifenola od Caco-2 linije.

Smanjenje broja stanica može se povezati i s antocijaninom, polifenolom koji je u prethodnim istraživanjima značajno smanjio proliferaciju Caco-2 stanica, inducirao apoptozu aktiviranjem cijepanja kaspase 3 i ekspresijom inhibitora kinaze 1 ovisne o ciklinu te akumuliranjem reaktivnih kisikovih radikala (33). Osim toga, oni demetiliziraju tumor supresorske gene kroz inhibiciju enzima DNK metil-transferaza koji su odgovorni za točno repliciranje DNK u S fazi staničnog ciklusa u stanicama raka debelog crijeva (34).

Osim navedenih polifenola, kao uzrok zaustavljanja staničnog ciklusu može biti i kvercetin koji smanjuje rast stanica razbijanjem vezanja  $\beta$ -katenina na TCF-4 (transkripcijskom faktoru 4) i inducira zaustavljanje G2/M staničnog ciklusa kroz smanjenje ekspresije gena survivina (BIRC5) i ciklina D (30).

Prema rezultatima u ovom istraživanju, polifenoli dobiveni nakon djelovanja mikroorganizma: *Phanerochaete chrysosporium* (PC) i *Trametes gibbosa* (TG) ne doprinose povećanju polifenolne aktivnosti na stanični ciklus SW620 i Caco-2 stanica. Učinak na SW620 staničnu liniju ima isti trend odnosno povećanje broja stanica u G1 i G2/M fazi, te smanjenje u S fazi u odnosu na kontrolne stanice. Međutim, u usporedbi s PP ekstraktom, iako smanjuju broj stanica u S fazi i povećavaju G2/M fazu kao i sam PP ekstrakt, ta promjena je znatno manja od očekivane. Rezultati na Caco-2 staničnoj liniji su još slabije izraženi i ne postoji jedinstveni trend ponašanja između ekstrakata TG i PC koji se uočava na SW620 stanicama. Učinkovitost



zaustavljanja staničnog ciklusa je još manja. Stoga, možemo reći da pred tretman groždanog tropa s ova dva mikroorganizma ne doprinosi učinkovitosti polifenolnih komponenti na zaustavljanje staničnog ciklusa tumorskih staničnih linija ispitivanih u ovom istraživanju.

Rezultati ovog istraživanja upotpunjavaju dosadašnje spoznaje o polifenolima, te se može reći da polifenoli izolirani iz groždanog tropa crnog grožđa pa čak i iz drugog voća i povrća, imaju veliku pozitivnu ulogu u očuvanju zdravlja čovjeka i u mnogim bolestima. Na njihovom istraživanju trebalo bi se puno više raditi, jer su pokazali iznimne antiproliferativne učinke na tumorske stanice, te ovisno o količinama, vrsti polifenola i vrsti raka trebali bi se proučiti i u konačnici u kombinacijama s drugim lijekovima početi shvaćati kao mogući lijekovi protiv raka u budućnosti.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata dolazi se do sljedećih zaključaka:

- Ekstrakt čistih polifenolnih komponenti (PP) pokazuje najbolju učinkovitost u zaustavljanju staničnog ciklusa i SW620 i Caco-2 stanične linije, tako da smanjuje G1 i S fazu uz povećanje udjela stanica u G2/M fazi.
- U učinkovitosti zaustavljanja staničnog ciklusa, ekstrakti TG i PC razlikuju se u odnosu na PP ekstrakt i sami među sobom u ovisnosti o staničnoj liniji.
- Nešto bolju učinkovitost na stanični ciklus imaju polifenoli dobiveni nakon djelovanja PC mikroorganizma u odnosu na TG mikroorganizam.
- Polifenoli dobiveni nakon mikrobiološke aktivnosti (TG i PC) ne pokazuju značajno povećanje biološke aktivnosti na stanični ciklus .
- SW620 stanična linija je osjetljivija u odnosu na CaCco-2 na primijenjene polifenolne ekstrakte PP, TG i PC.
- S obzirom na rezultate istraživanja, potrebno je ispitati moguće mehanizme zaustavljanja staničnog ciklusa SW620 i Caco-2 stanica posredovanih ekstraktom PP.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji su u brojnim istraživanjima pokazali svoje bioaktivne značajke kao što su antioksidacijsko, antimikrobno, antiproliferativno djelovanje te zaštitu od UV zračenja. Ubrajaju se u fitokemikalije. Nastaju kao derivati fenilalanina s aromatskim prstenom ili hidroksilnom skupinom. Prema najnovijoj klasifikaciji, polifenole dijelimo u dvije glavne skupine: flavonoidi i neflavonoidi (fenolne kiseline, stilbene i lignane). Polifenoli inhibiraju proliferaciju tumora, potiču apoptozu, sprječavaju angiogenezu i imaju antioksidacijska svojstva čime sprječavaju DNK oksidaciju i smanjuju rizik od nastanka raka.

**Cilj:** Ciljevi ovog istraživanja su ispitati utječu li polifenoli izolirani iz groždanog tropa na odvijanje staničnog ciklusa *in vitro* i utvrditi mijenja li se učinkovitost polifenolnih komponenti nakon djelovanja mikroorganizama koji potiču razgradnju groždanog tropa.

**Materijali i metode:** U istraživanju je upotrijebljen ekstrakt čistih polifenolnih komponenti (PP) i ekstrakti polifenola dobiveni nakon djelovanja mikroorganizma: *Phanerochaete chrysosporium* (PC) i *Trametes gibossa* (TG) u koncentracijama koje odgovaraju IC<sub>50</sub> vrijednostima na humanim tumorskim staničnim linija SW620 i Caco-2. Stanice su uzgojene u standardnim uvjetima kultivacije (37 °C / 5 % CO<sub>2</sub>) u DMEM-u bez antibiotika. Nakon 48 sati izloženosti ekstraktima, primijenjena je metoda protočne citometrije za analizu staničnog ciklusa.

**Rezultati:** Od tri analizirana polifenolna ekstrakta najbolju efikasnost u zaustavljanju staničnog ciklusa Caco-2 i SW620 stanica pokazao je PP ekstrakt, koji je djelovao na sve tri faze staničnog ciklusa smanjivanje G1 i S faze uz povećanje G2/M faze. Učinak ekstrakata TG i PC na stanični ciklus slabiji je od PP ekstrakta. TG ekstrakt rezultirao je porastom udjela stanica u G1 i G2/M praćeno smanjenjem S faze kod SW620 stanica. Na istu staničnu liniju PC ekstrakt uzrokovao je povećanje G1 faze i smanjenje S faze. Utjecaj na stanični ciklus Caco-2 stanica ova dva ekstrakta manji je u odnosu na PP ekstrakt.

**Zaključak:** Polifenolne komponentne uzrokuju promjene u staničnom ciklusu Sw620 i Caco-2 tumorskih stanica zaustavljajući ga u G2/M fazi uz smanjivanje udjela S faze. Utjecaj na G1 fazu je različit što je vjerojatno ovisno o sastavu polifenola i tipu stanica.

**Ključne riječi:** polifenoli, stanični ciklus, antiproliferativan učinak, tumorske stanice

## 9. SUMMARY

**Introduction:** Polyphenols are secondary plant metabolites that have shown numerous bioactivity features in many researches, such as antioxidant, antimicrobial, antiproliferative activity and protection from UV radiation. They are phytochemicals and formed as phenylalanine derivatives with an aromatic ring or a hydroxyl group. According to the most recent classification system, polyphenols are divided into two main groups: flavonoids and non-flavonoids (phenolic acids, stilbenes and lignans). Polyphenols inhibit tumor proliferation, induce apoptosis, prevent angiogenesis, and have antioxidant properties that prevent DNA oxidation and reduce the risk of cancer.

**Objective:** The aim of this study is to explore the effect that polyphenols isolated from grapes have on the *in vitro* cell cycle and to determine the extent to which the efficiency of polyphenolic components changes after the treatment of microorganisms that stimulate the degradation of grape pomace.

**Materials and Methods:** In the research the following materials were used: an extract of pure polyphenolic components and extracts of polyphenols formed after the treatment of microorganisms (*Phanerochaete chrysosporium* (PC) and *Trametes gibossa* (TG) in the adequate concentrations corresponding to the IC50 values on the human tumor cell line and CaCo-2. The cells were cultivated under standard cultivation conditions (37°C / 5% CO<sub>2</sub>) in DMEM without the usage of antibiotics. After 48 hours of exposure to the extracts, the method of flow cytometry for cell cycle analysis was applied.

**Results:** Of the three analyzed polyphenolic extracts, the best results in terms of efficiency in stopping the cell cycle of CaCo-2 and SW620 cells were traced in a PP extract that effected all three phases of the cell cycle; G1 and S phase reduction cycle with G2 / M increase. The effect of TG and PC extracts on the cell cycle are lesser than that of the PP extract. The TG extract resulted in an increase in G1 cell portion and G2 / M phase followed by S phase reduction in SW620 cells. PC extraction caused an increase in the G1 phase and reduction of S phase on the same cell line. The effect on the cell cycle of CaCo-2 cells of these two extracts is lower than that of the PP extract.

**Conclusion:** Polyphenolic components cause changes in the cell cycle of SW620 and CaCo-2 tumor cells by stopping it in the G2 / M phase and reducing the S phase proportion. The effect on the G1 phase is different, possibly depending on the composition of polyphenols and cell types.

**Key words:** polyphenols, cell cycle, antiproliferative effect, tumor cells

## 10. LITERATURA

1. Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi I, Modesti A, i sur. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. *Int J Mol Sci.* 2015;16: 9236–9282.
2. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010; 2(12): 1231–1246.
3. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2: 270–278.
4. Watson RR, Preedy R.V, Zibadi S. Polyphenols in human health and disease. 1. izdanje. New York: Elsevier; 2014.
5. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-47.
6. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005; 45:287–306.
7. Čepelak I, Čvorišćec D. Štausova Medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
8. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM and Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients.* 2014; 6:6020-6047.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-674.
10. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
11. Rye C, Wise R, Jurukovski V, DeSaix J, Choi J, Avissae Y. Biology. 1. izdanje. Houston: Rice University; 2017.
12. Mason KA, Losos JB, Singer SR. Biology, 9.izdanje. New York: McGraw-Hill; 2010.
13. Lončar B. Poremećaj funkcije gena FHIT u karcinomima debelog i završnog crijeva. (doktorska disertacija) Zagreb. 2008; 12-18.
14. Web 1: Onkologija.hr. Rak debelog crijeva. Dostupno na adresi: <http://www.onkologija.hr/rak-debelog-crijeva/>. Datum pristupa: 24.8.2018.

15. Knežević A, Stajić M, Vukojević J, Milovanović I. The effect of trace elements on wheat straw; degradation by *Trametes gibbosa*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014;152-156.
16. Yadav JS, Doddapaneni H, Subramanian V. P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters. *Biochem Soc Trans*. 2006;34 6):1165-9.
17. Dan-Lian Huang DL, Cong Wang C, Xu P, Zeng GM, Lu BA, Li NJ i sur. A coupled photocatalytic-biological process for phenol degradation in the *Phanerochaete chrysosporium*-oxalate-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> system. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2015; 115-123.
18. Web 2: ATCC: The Global Bioresource Center. SW620 [SW-620] (ATCC® CCL-227™). Dostupno na adresi: [https://www.lgcstandardsatcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/By\\_Tissue/Lymph\\_Node/CCL-227.aspx?geo\\_country=hr#characteristics](https://www.lgcstandardsatcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Lymph_Node/CCL-227.aspx?geo_country=hr#characteristics). Datum pristupa: 8.5.2018.
19. Web 3: Sigma-Aldrich. SW 620 Cell Line human. Dostupno na adresi: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_87051203?lang=en&region=HR](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_87051203?lang=en&region=HR). Datum pristupa: 8.5.2018.
20. Web 4: ATCC: The Global Bioresource Center. Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB-37™). Dostupno na adresi: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx#characteristics>. Datum pristupa: 8.5.2018.
21. Web 5: Sigma-Aldrich. CACO-2 Cell Line human. Dostupno na adresi: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_86010202?lang=en&region=HR](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_86010202?lang=en&region=HR). Datum pristupa: 8.5.2018.
22. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989;96(3):736-749.
23. Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. *Paediatr Croat* 2006; 50:176-182.
24. Kurec A. Flow cytometry: principles and practices. *MLO Med Lab Obs*. 2014;46(5):28, 30-1.

25. Valenzuela M, Bastias L, Montenegro I, Werner E, Madrid A, Godoy P i sur. Autumn royal and ribier grape juice extracts reduced viability and metastatic potential of colon cancer cells. *eCAM (Hindawi)*. 2018.
26. Cedilak A. Antioksidacijska svojstva vina. (završni rad) Zagreb. 2016;17-18.
27. Losada-Echeberría ML, Herranz-López M, Micol V and Barrajon-Catalán E. Polyphenols as promising drugs against main breast cancer signatures. *Antioxidants (Basel)*. 2017; 6(4).
28. Bailon-Moscoso N, Cevallos-Solorzano G, Romero-Benavides JC, and Ramirez Orellana MI. Natural compounds as modulators of cell cycle arrest: application for anticancer chemotherapies. *Current Genomics*. 2017; 18:106-131.
29. Shin SY, Yoon H, Ahn S, Kim DW, Bae DH, Koh D i sur. Structural properties of polyphenols causing cell cycle arrest at G1 phase in HCT116 human colorectal cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14:16970-16985.
30. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Potential targets for colorectal cancer prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(9), 17279-17303.
31. Schneider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C i sur. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Letters*. 2000; 158, 85-91.
32. Hakimuddin F, Paliyath G, Meckling K. Treatment of MCFf-7 breast cancer cells with a red grape wine polyphenol fraction results in disruption of calcium homeostasis and cell cycle arrest causing selective cytotoxicity. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54, 7912–7923.
33. Anwar S, Fratantonio D, Ferrari D, Saija A, Cimino F, Speciale A. Berry anthocyanins reduce proliferation of human colorectal carcinoma cells by inducing caspase-3 activation and p21 upregulation. *Mol Med Rep*. 2016;14(2):1397-403.
34. Wang LS, Kuo CT, Cho SJ, Seguin C, Siddiqui J, Stoner K i sur. Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. *Nutr Cancer*. 2013;65(1):118-25.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Ena Pešut

Datum i mjesto rođenja: 25. 5.1996., Slavonski Brod

### OBRAZOVANJE

2003. – 2011. – Osnovna škola Ivana Brlić-Mažuranić

2011. – 2015. – Opća gimnazija, Gimnazija Matija Mesić, Slavonski Brod

2015. – 2018. – Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike