Molekularni mehanizmi protutumorskog djelovanja flavonoida

Kovačević, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:481694

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

MOLEKULARNI MEHANIZMI PROTUTUMORSKOG DJELOVANJA FLAVONOIDA

(MOLECULAR MECHANISMS OF ANTICANCEROGENOUS ACTIVITY OF FLAVONOIDS)

SEMINARSKI RAD

Marija Kovačević

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Gordana Rusak

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD....1
2. BIOLOGIJA KARCINOMA....1
   2.1. Podjela karcinoma....4
      2.1.1. Karcinomi ektodermalnog porijekla....4
      2.1.2. Karcinomi mezodermalnog podrijetla....4
      2.1.3. Karcinomi endodermalnog podrijetla....4
3. UTJECAJ FLAVONOIDA NA KARCINOM....4
4. BIOKEMIJA TUMORA I UTJECAJ FLAVONOIDA....5
   4.1. Citoplazmatski / jezgrini receptori....5
   4.2. Enzimi....6
   4.3. Regulacija rasta....6
   4.4. Energijski metabolizam....7
   4.5. Detoksifikacija....7
5. ODGOVOR NA STRES....9
   5.1. Mehanizmi odgovora na stres....9
   5.2. Inhibicija HSP gena flavonoidima....10
6. UTJECAJ FLAVONOIDA NA TUMORSKE STANICE RAKA DOJKE....13
7. UTJECAJ STRUKTURNO SRODNIH FLAVONOIDA NA EKSPRESIJU HSP GENA....14
8. LITERATURA....16
9. SAŽETAK....17
10. SUMMARY....17

1. UVOD

Flavonoidi su skupina sekundarnih biljnih metabolita koji se javljaju u vaskularnim biljkama i imaju veliku važnost u ljudskoj prehrani. Ovi niskomolekularni fenilbenzopirani sintetiziraju se u fenilpropanoidnom metaboličkom putu koji započinje pretvorbom aminokiseline fenilalanina. U velikoj količini se nalaze u voću, povrću, oraščićima, sjemenkama, ali i u crvenom vinu, čaju, kavi i pivu.

Flavonoidi moduliraju aktivnosti mnogih enzima i posjeduju široki spektar biokemijskih i farmakoloških aktivnosti, od kojih neke interferiraju s kontrolnim procesima u razvijanju tumora. Zasigurno su najpoznatiji po svom antioksidativnom djelovanju, ali posjeduju još brojna druga biološka svojstva koja su bitna u antikancerogenom djelovanju, kao što su deaktivacija aktiviranih mutagena i kancerogena, utjecaj na stanični ciklus i ekspresiju gena.

Osim antikancerogene, pokazuju i antimikrobnu, te antialergenu aktivnost.

2. BIOLOGIJA KARCINOMA

Karcinom (rak) je skupina bolesti koje su uzrokovane poremećajem u metabolizmu rasta. Smatra se da nastaje kombinacijom endogenih i egzogenih faktora koji, korak po korak, vode do transformacije normalnih stanica u tumorske. Jedan od endogenih faktora je genetička dispozicija koja oslabljuje kontrolu DNA transkripcije, čime pojačava mogućnost mutacija, tako da se proizvode manje efikasne forme tumor supresorskih proteina, kao što su p53 i p16. Uloga ovih proteina je da služe kao kočnice transkripcijskim faktorima, koji osiguravaju da se stanični ciklus odvija pravilno, te da kontrolni i popravni enzim, DNA sintetaza, nadgleda i ispravlja greške u sparivanju baza (primjerice kovalentne timinske dimere ili kemijski modificirane baze).

P52 je,zapravo, transkripcijski faktor koji inducira ekspresiju p16 i p21 gena. Produkt potonjeg , Δ, je inhibitor kontrolnog enzima za staničnu diobu, fosfokinaze, u G1/S fazi ciklusa. Popravni enzim se miče duž dvostruke uzvojnice DNA, konstantno provjeravajući i osiguravajući da se spare A i T, te G i C. U slučaju da se dogodi greška, enzim se vraća i na putu nazad miče mononukleotide (jednolančani, nespareni dio DNA) koji uzrokuju grešku. Nakon toga, miče se naprijed kako bi zatvorio rupu s odgovarajućim bazama. Ova, prijeko

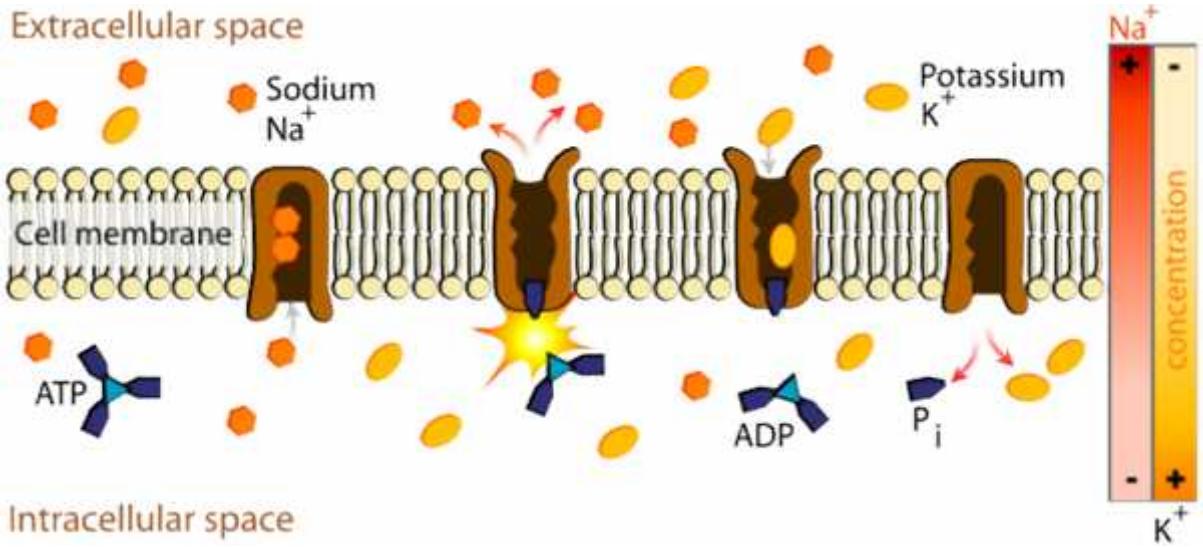
potrebna akcija zahtjeva određenu količinu vremena, i ne može se odvijati ukoliko su supresorski faktori deficijentni.

Rak dojke, retinoblastom i Wilmov tumor su jako dobro istražene bolesti u kojima je p53 supresorski gen „okrhnut“. Naime, eksprimirani protein je premalen da bi izvršio svoju zadaću. Rak je, bez sumnje, povezan i s poremećajem nekih signalnih proteina i drugih molekula koje kontroliraju metabolizam rasta stanica. Uglavnom se radi o kaskadama enzima fosfokinaza. U normalnim stanicama, većina ovih proteinskih kinaza su specifične za postrane lance serina ili treonina, dok samo par njih je specifično za fenolnu grupu tirozina. Nasuprot tome, tumorske stanice imaju snažnu tirozin - specifičnu kinaznu aktivnost, naročito na citoplazmatskom dijelu membranskih proteina, primjerice, na receptorima za hormon rasta ili transportnim ATP-azama. Na^+/K^+ transportna ATP-aza stanica HELA (tumorske stanične linije), za razliku od enzima u normalnim stanicama, je fosforilirana na tirozinu u regulatornom β lancu. HELA stanice se već godinama uzgajaju u kulturi i diljem svijeta se koriste za studije biokemije tumora.

Na^+/K^+transportna ATP-aza je ionska pumpa (Slika 1.) koja se nalazi na plazmatskoj membrani većine tipova stanica. Izbacuje tri Na^+ iona iz stanice i simultano uzima dva K^+ iona iz krvi u stanicu. Tako ta pumpa održava nisku koncentraciju Na^+ iona unutar stanice, koristeći metaboličku energiju iz ATP-a. Pumpa je elektrogena, budući da više kationa napusti stanicu nego što ih uđe. Sve transportne ATP-aze, uglavnom, imaju sličnu građu. U slučaju mitohondrijske F1- ATP-aze, aktivno mjesto se nalazi na β lancu oligomernog enzima. Ovaj lanac, koji je prisutan u tri kopije, organizirane kao prsten u ravnini membrane, je vidljiv elektronskim mikroskopom. Osigurava potrebnu energiju hidrolizom ATP-a. Energija služi mijenjanju konformacije Na^+/K^+ ATP-aze tako da se Na^+ unutar stanice može otpustiti u krv. ATP-aza se aktivira vezanjem K^+ iona na vanjskoj strani membrane. Ovaj ion može difundirati kroz membranu jedino kad Na^+ ide u suprotnom smjeru. Svaki α lanac je praćen β lancem, koji regulira translokaciju konformacijskim promjenama produciranima reakcijom fosforilacije, koja je katalizirana enzimom fosfokinazom. Inače, ova reakcija je S/T specifična (S= serin, T= treonin), ali nakon onkogene transformacije, točnije, pojave karcinoma, njenu ulogu preuzme tirozin specifična proteinska fosfokinaza, što rezultira redukcijom učinkovitosti pumpe na čak 15 % tirozinskom fosforilacijom na β lancu. Posljedica toga je da se povećava unutarstanična koncentracija Na^+, a samim time i ionska snaga u citoplazmi. Neki ioni Na^+ se, najvjerojatnije, mijenjaju za protone na plazmatskoj membrani jer pH vrijednost citoplazme naglo opada. Pad pH je pooštren zastojem oksidativne fosforilacije, čime se stvaraju velike količine ATP-a, koji je tumorskim stanicama nužno potreban za proliferaciju.

Većina enzima je inhibirana velikom koncentracijom protona i ubrzo jedini izvor ATPa je supstratna fosforilacija, koja u glikolizi proizvodi laktat, jer se koenzim NADH mora oksidirati do NAD^+,piruvatom, da regenerira NAD^+ za drugi ciklus supstratne fosforilacije na razini gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze. Pokazalo se da se u dosta tumorskih stanica javlja visoka koncentracija laktata. Budući da je supstratna fosforilacija nedostatan izvor energije, a kancerogene aktivnosti imaju prioritet, normalne stanice „gladuju“ za ATPom i prerano umiru.

Formiranje metastaza je ključno za širenje tumorskih stanica po tijelu i ključni korak u njihovoj letalnoj progresiji. Tumorske stanice postižu svoju mobilnost pojačanjem ekspresije proteinaznih gena, primjerice, onih za kolagenazu i elastazu. Ovi enzimi hidroliziraju komponente ekstracelularnog matriksa, kao što je kolagen, ali im, u normalnim uvjetima, rad ometaju endogeni proteinski inhibitori, TIMP-ovi. Tumorske stanice mogu zaustaviti aktivnost TIMP-ova mutacijom određenih gena inhibitora, a štite od djelovanja drugih inhibitora (različiti lijekovi). Samo inhibitori male molekularne mase mogu doći do aktivnog mjesta proteaza, ali su rijetko dovoljno specifični. No, istraživanja pokazuju da flavonoidi mogu povećati rezistenciju kolagena na hidrolizu kolagenazama.



Slika 1. Na / K pumpa

(www.soton.ac.uk)

2.1. Podjela karcinoma

2.1.1. Karcinomi ektodermalnog porijekla

Karcinomi koje čine stanice ektodermalnog porijekla su karcinom kože, dojke, oralnog epitela, urogenitalnog trakta i pluća.

2.1.2 Karcinomi mezodermalnog porijekla

Karcinomi koje čine stanice mezodermalnog porijekla su karcinomi krvnih stanica, kostiju i mišića.

2.1.3. Karcinomi endodermalnog porijekla

Karcinomi koje čine stanice endodermalnog porijekla su karcinomi gastrointestinalnog trakta, mliječnih žlijezda, gonada, maternice, prostate, debelog crijeva i mezenhima.

3. UTJECAJ FLAVONOIDA NA KARCINOM

Dokazano je da flavonoid kvercetin miče fosfatni ester s a fenolne grupe tirozina. Posljedica toga je da Na^+/K^+ transportna ATP-aza dosegne normalnu razinu aktivnosti i izbaci višak Na^+ iona iz HELA stanica. Oksidativna fosforilacija je oživljena i pH vrijednost citoplazme se stabilizira. Budući da regulatorni β lanac mitohondrijske protonske pumpe može zamjeniti β lanac Na^+/K^+ ATP-aze plazmatske membrane, ta dva enzima su strukturno povezana. Ta je protonska pumpa vjerojatno također regulirana reakcijama fosforilacije i defosforilacije koje su osjetljive na flavonoide.

Mogući mehanizam defosforilacije tirozin fosfata kvercetinom je praćen oslobađanjem anorganskog fosfata hidrolizom. Model je temeljen na većoj kiselosti kvercetinskih hidroksilnih grupa u odnosu na tirozinske. Fosfatni esteri su poznati po osjetljivosti na razgradnju kiselinom.

4. BIOKEMIJA TUMORA I UTJECAJ FLAVONOIDA

Obilje efekata flavonoida na metabolizam tumorskih bolesti je teško razlučiti u par osnovnih mehanizama. Flavonoidi interferiraju s velikim brojem regulatornih puteva, primjerice, puteva rasta, energijskog metabolizma, apoptoze, stanične diobe, transkripcije, popravka gena, neuralne transmisije, inflamacije i odgovora na stres. Mogu djelovati i kao antioksidansi i sakupljači slobodnih radikala, inhibitori enzima, te kao hormoni.

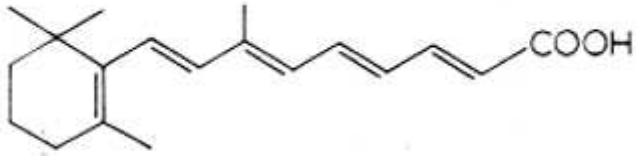
Ovi efekti se mogu podjeliti u dva razreda: elektronski i sterički. Visoka mobilnost elektrona u benzenskoj jezgri flavonoida obuhvaća njihovu antioksidativne i sakupljačke (slobodnih radikala) osobine, dok strukturna sličnost između flavonoida aglikona i mnogih supstanci svojstvenih biokemijskoj strukturi normalnih stanica , kao što su neurotransmiteri, koenzimi ili sterodini hormoni, objašnjava inhibiciju enzima, citoplazmatskih ili jezgrinih hormonskih receptora i neurotransmitera, kao i indukciju gena.

Biokemijski putevi, na koje utječu flavonoidi, se grubo mogu klasificirati prema osjetljivosti. Općenito, aktivnosti posredovane porodicom citoplazmatskih/jezgrinih hormonskih receptora su visokoosjetljive na flavonoide, dok enzimska inhibicija i slični procesi , primjerice, na sinaptičkim membranama, zahtjevaju veće koncentracije flavonoida.

4.1. Citoplazmatski/jezgrini receptori

Natporodica citoplazmatskih hormonskih receptora igra središnju ulogu u transmisiji steroidnih hormona i hormona slične strukture i funkcije. Hormoni, koji pripadaju u ovu skupinu, uključuju steroide, tiroidne hormone, vitamin D3 i retinoičnu kiselinu (Slika 2.). Većina ovih hormona stimulira procese rasta, ali neki kontroliraju i specijalizirane funkcije, kao što je elektrolitna homeostaza, metabolizam ugljikohidrata, seksualno dozrijevanje, oksidativna fosforilacija i morfogeneza. Svi citoplazmatski hormonski receptori su su jednolančani proteini, koji su skupljeni u tri domene. N-terminalna domena ima aktivirajuću funkciju, mala centralna se veže za DNA i C terminalna hidrofobna domena veže hormon. To opisuje sposobnost različitih flavonoida, kao što je silimarin, da stimuliraju akciju određenih hormona.

Budući da je afinitet za ligande hormonskih receptora vrlo visok, razumljivo je da flavonoidi, koji vrše svoju funkciju preko citoplazmatskih hormonskih receptora, imaju snažniji učinak na metabolizam stanice nego niskoafinitetni inhibitori enzima i receptora na plazmatskoj membrani.



β-retinoic acid (all–*trans* isomer)

Slika 2. Retinoična kiselina

(www.cyberlipid.org)

4.2. Enzimi

Flavonoidi utječu na velik broj enzima uključenih u onkogenezu. Većina ovih enzima je inhibirana flavonoidima, ali postoje i primjeri enzimatskih procesa koji su pobuđeni flavonoidima, kao što su reakcije nekih fosfataza i oksigenaza. U slučaju fosfataza, aktivacija ovisi o vezanju flavonoida na teškometalni faktor, primjerice cink, dok je oksigenazni efekt najvjerojatnije indirektan, uzrokovan redukcijom koenzima, posebice folične kiseline u tetrahidrofoličnu kiselinu. Budući da su citotoksični efekti flavonoida zanemarivi, čini se da ove supstance inhibiraju patološke varijante enzima favorizirajući obrambene mehanizme ili mehanizme popravka. Proučavajući ulogu flavonoida u onkogenezi, bitno je obratiti pozornost na tri grane metabolizma stanica: rast, energiju i detoksifikaciju.

4.3. Regulacija rasta

Ubrzavanje metabolizma rasta je zajednička značajka svih tipova karcinoma. Dva su znana puta transmisije okolišnih signala do gena: steroidni put pomoću citoplazmatskih receptora i kaskade proteinskih kinaza. Posljednja je započeta vezanjem proteinskih hormona i mutagena na receptore na plazmatskoj membrani. Događaj koji slijedi je vezanje hormona na receptor, te to uključuje i konformacijske promjene duž membranski aktivnih GTP-aza, adenil ciklaza i PIL-ova, te regulaciju ionskih kanala. Uloga adenil ciklaza je produkcija cAMP, koji aktivira fosfokinaze. Proteinske kinaze fosforiliraju ili fenolnu grupu tirozina, jer je tirozin fosfat visokoenergetska komponenta,ili alkoholni postrani lanac serina i treonina. Fosforilacija tirozina je jako bitna u metabolizmu rasta. Posebno je važna u onkogenezi. Proteinske fosforilacijske kaskade završavaju na transkripcijskom kompleksu gena i uzrokuju njihovu ekspresiju. Neki enzimi, transkripcijski faktori i komponente staničnog ciklusa su aktivirani fosforilacijom, uključujući i DNA polimerazu II, topoizomerazu i kontrolne proteinske kinaze u G1/S fazi ciklusa. Neki flavonoidi inhibiraju tirozin specifične proteinske kinaze, topoizomeraze I i II, kao i kontrolne proteinske kinaze bitne za staničnu diobu. Rezultat je toga je da

se metabolizam rasta, kao i stanična dioba, usporava. Takav umjereni tretman ima određenu prednost s obzirom da koncentracije toksičnih katabolita tumora ne premašuju kapacitet jetrenih detoksifikacijskih mehanizama.

Važan enzim među proteinskim kinazama je PKC. Taj enzim, koji je u dormantnom stanju vezan za plazmatsku membranu,prelazi u pobuđeno stanje pomoću proteaze aktivirane kalcijem, kalpaktinom. Enzimski aktivan dio PKC-a, PKM, se miče u jezgru stanice da bi sudjelovao u aktivaciji gena fosforilacijom transkripcijskih faktora.Dokazan je inhibitorni učinak nekih flavonoida na PKM, među kojima je i kvercetin. U ovoj fazi je stanični rast zaustavljen.

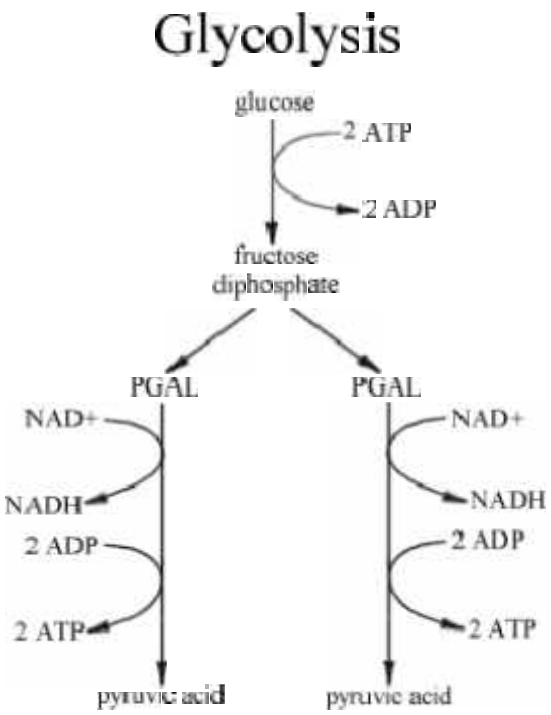
4.4. Energijski metabolizam

Potražnja za ATP-om rastućeg tumora je velika i stalno raste, te ubrzo premašuje opskrbu, koju transformirane stanice mogu dati. Glavni proizvođač ATP-a, respiratorni lanac, ubrzo prestaje raditi, moguće zbog nedostatka kisika, zamjenskih proteina ili intermedijera ciklusa limunske kiseline. No, čini se da glikoliza (Slika 3.) više odgovara onkogenim zahtjevima jer metabolički protok ovim putem je povećan nakon standardne fosforilacije nekih ključnih glikolitičkih enzima. Rezultat je visoka razina produkcije laktata što utječe na zamjetan pad pH, što potiče lizosome na rad i inhibira mnoge enzime. Također, onkogene proteinske kinaze fosforiliraju regulatorni β lanac Na^+/K^+ ATP-aze u plazmatskoj membrani, s rezultatom drastično smanjene aktivnosti iste. Dakle, koncentracija Na^+ iona u citoplazmi se povećava, a koncentracija ADP-a se smanjuje. Tako da, unos glukoze, koji je potaknut koncentracijskim gradijentom Na^+, je smanjen i učinkovitost supstratne fosforilacije je reducirana. Dodatak flavonoida, primjerice, kvercetina, uzrokuje micanje inhibitorskog fosfatnog ostatka na β lancu Na^+/K^+ pumpe i obnovu normalnih staničnih funkcija. Ovaj efekt može biti rezultat aktivacije proteinske fosfokinaze. Većina ovih pokusa su izvedeni u kulturi tumorskih stanica cervikalnog karcinoma, a nedostaju istraživanja „in vivo“. Dokazano je da flavonoidi mogu inhibirati i gastričku Na^+/K^+ ATP-azu.

4.5. Detoksifikacija

Okolišni toksini s onkogenom aktivnošću, kao što su aromatski ugljikovodici i slobodni radikali se detoksificiraju oksidacijom. Hidrofobne toksine, uglavnom, pokupe lipoproteini i odnesu do jetre, gdje dolazi do endocitoze. Hepatociti imaju sposobnost ekspresije kataboličkih enzima kao odgovor na unos ksenogeničnih supstanci. Aromatski mutageni, primjerice benzopiren, posjeduju strukturu koja upućuje na to da se mogu vezati na citoplazmatske receptore i prenijeti u staničnu jezgru, gdje mogu pokrenuti transkripciju, primjerice, citokrom P450 izozima. Taj i druge oksigenaze, započinju napad na aromatsku jezgru toksina hidroksilacijom. Ove reakcije slobodnih slobodnih radikala prolaze

kroz intermedijarnu epoksidnu fazu u kojoj toksin može dodati amino grupe nukleinskih kiselih baza, posebice gvaninskih. Takvi produkti alkilacijskih baza dostaju da zadrže reakcije kromosomske DNA, do te granice da su popravni mehanizmi nadjačani. Rezultat je mutacija, često praćena onkogenom transformacijom stanice. Flavonoidi su strukturalno dovoljno slični hidroksiliranim aromatima da induciraju oksidativne enzime, ali uzrokuju, dodatno, i ekspresiju drugih enzima, primjerice epoksidnih hidrolaza. Zadnji enzimi hidroliziraju aromatične epokside u vicinalne diole. Takve strukture su pogodne točke za napad enzima koji otvaraju prstene. Tako, flavonoidi mogu olakšati raspad opasnih, policikličkih aromata u relativno sigurne, male, dekompozicijske produkte, kao što su aromatske ugljične kiseline, koje se mogu ekskretirati zajedno s urinom.



Slika 3. Glikoliza

(library.thinkquest.org)

5. ODGOVOR NA STRES

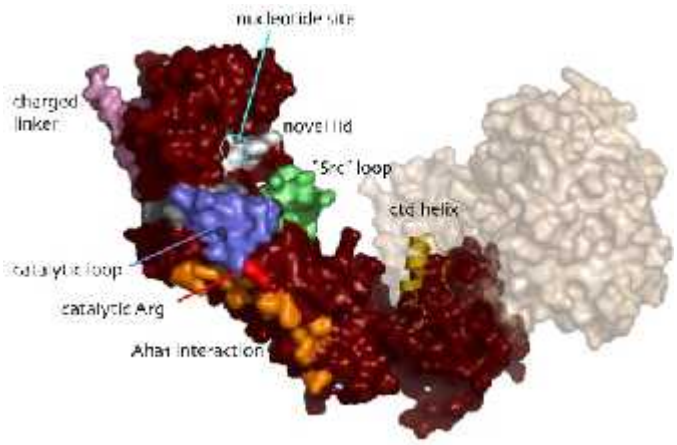
5.1. Mehanizmi odgovora na stres

Ljudi doživljavaju širok spektar stresova, što fizičkih, što kemijskih, iz okoliša. Neki od uobičajenijih fizičkih i kemijskih sresnih faktora su temperatura, koncentracija plinova, elektromagnetska radijacija, buka, antigeni (polen) i komponente prehrane koje iritiraju zbog svoje kiselosti, lužnatosti ili specifičnih interakcija s receptorima. Stres, primjerice hipertermija, se također koristi u protutumorskoj terapiji jer su neki tipovi tumorskih stanica posebno osjetljivi na toplinu, posebice kad je tretman kombiniran s ionizacijskim zračenjem i citotoksičnim lijekovima.

Odgovor na stres se događa kroz nekoliko biokemijskih puteva, koji uključuju živčanu indukciju kateholaminske sinteze, kao i otpuštanje kortikoliberina i naknadno, ACTH-a (adrenokortikotropnog hormona), koji stimulira produkciju kotikoida u adrenalnom korteksu. Ovi steroidni hormoni induciraju ekspresiju mnoštva gena, uključujući i gene za „heat shock proteine“ (hsp geni). Oni sadržavaju, između ostalog, i šaperone, inhibitore steroidnog vezanja na citoplazmatske receptore i glikolitičke enzime. Funkcija HSP-a je održavanje preživljavanja stanice usmjeravanjem ponovnog slaganja denaturiranih proteina stimulacijom lizosomalne hidrolize i povećavanjem sinteze ATP-a. Usprkos njihovom nazivu, HSP se ne produciraju samo kao odgovor na stres, nego se na njih više treba gledati kao na generalni mehanizam zaštite od stresa. Neki od istaknutijih HSPa su: HSP-90, HSP-70, HSP- 117, HSP-40 i HSP-27.

HSP-70 i HSP-90 formiraju heterodimer koji je u kompeticiji s kortizolom za citoplazmatski steroidni receptor, čime modulira odgovor na stres. HSP-70 stimulira lizosomalnu hidrolizu. HSP-90 se veže na tirozin specifičnu proteinsku kinazu, što rezultira usporavanjem staničnog ciklusa i smanjenjem termalne osjetljivosti. Tako, HSP-90 (Slika 4.) štiti tumorske stanice od hipertermičke terapije.

Budući da su flavonoidi strukturalno slični kateholaminima, očekivano je da interferiraju s biosintezom ovih tipičnih stresnih hormona. Flavonoidi zapravo utječu na ovaj proces, ali indirektno, jer bitni enzimi ovog puta su hidroksilaze. Dodatno, aktivnost ključnih enzima u kateholnom anabolizmu je regulirana reakcijama fosforilacije i defosforilacije kataliziranim proteinskim kinazama i fosfatazama. Članovi obje enzimske klase su regulirani vezivanjem flavonoida.



Slika 4. HSP- 90 protein

(www.hsp90.org)

5.2. Inhibicija HSP gena flavonoidima

U literaturi su opisani citotoksični efekti flavonoida, kao i njihova sposobnost da induciraju apoptozu. Ipak, rađena su istraživanja i suprotnih reakcija, bitnih za preživljavanje stanica u stresnim uvjetima, posebice onih u koje su uključeni HSP. HSP su, između ostalog, i šaperoni, koji opskrbljuju stanicu u krizi energijom (ATP) i katalitima za renaturaciju denaturiranih proteina. Tako da HSP, čija ekspresija nije samo uzrokovana toplinskim šokovima, nego i drugim oblicima stresa: promjenama pH, osmotskim stresom, toksinima i sl., nude stanici priliku za preživljavanje, usprkos nezahvalnim okolišnim uvjetima. Ipak, zajedničko djelovanje HSP-a i kvercetina pomaže apoptozi, a sam HSP pomaže preživljavanju stanica.

Dakle, preživljavanje stanice nakon tretmana kvercetinom u kombinaciji s toplinskim stresom je drastično smanjeno. Ovo novo otkriće otvara zanimljivu mogućnost popravljanja efikasnosti hipertermičkog tretmana kod pacijenata oboljelih od raka. Hipertermija je često jedna od komponenata u terapijskoj proceduri koja se sastoji od više koraka i uključuje preopterećenje stanica glukozom i acidifikaciju produkata hidrolize penetracijskim supstancama stanične membrane, kao što je dinitrofenilacetat.

Mehanizam inhibicije ekspresije hsp gena se još mora rasvjetliti o kraja. No, specifična inhibicija kvercetinom formacije HSP - mRNA je dokazana. Dakle, inhibicija se događa na razini transkripcije ili ranije, jer kvercetin, flavon i genistein nisu inhibirali RNA polimerazu II u svim staničnim tipovima testiranim u različitim eksperimentalnim uvjetima.

Eksperimenti sa specifičnim oligonukleotidnim sekvencama usmjerenima u suprotnom smjeru od inicijalne sekvence (F1), centralne (F2) i terminalnog dijela strukturalnog gena hsp-70 (F3)su potvrdili da stanice koje su predtretirane kvercetinom, nasuprot netretiranim stanicama, nakon toplinskog šoka (43C, 1h) jedva eksprimiraju hsp gene. U drugom eksperimentu, uključenje kvercetina u aktivaciju ljudskog hsp-70 gena, je proučavano pomoću transfektiranih stanica sa 2-4 kB sekvencom koja je sadržavala kloramfenikol acetiltransferazu (CAT), točnije, gen za nju je bio smješten uzvodno od hsp-70 gena.
Isto tako, sekvenca koja je sadržavala ljudski promotor za hsp- 70, uključujući regulatorni element (HSE) je smještena ispred strukturnog gena za HSP-70 u drugim stanicama. Kad su transfektne stanice grijane bez prisutnosti kvercetina, pokazale su visoku CAT aktivnost, no ista enzimska aktivnost nije prelazila normalnu razinu u stanicama koje nisu bile izložene toplinskom šoku, a prije toga su bile izložene kvercetinu. Ova inhibicija je proučavana mobilnošću u agaroznom gelu, koristeći ekstrakte stanica koje su grijane sa i bez prisutnosti kvercetina. HSF protein stupa u interakciju direktno sa sekvencom HSE u hsp-70 promotoru, tako inducirajući njegovu ekspresiju.

HSF je bio jako eksprimiran nakon toplinskog šoka u odsutnosti kvercetina, ali ne i ako je prethodio tretman kvercetinom. Dakle, test mobilnosti kroz gel je pokazao da je inhibicija aktivnosti hsp-70 promotora uzrokovana blokadom aktivacije ovog promotora od strane HSF-a. HSF se ne aktivira samo toplinskim šokom, nego i niskim pH-om, ureom, deterdžentima i kalcijem. Mogućnost da kvercetin inhibira vezanje HSF proteina na hse gen je testirana dodatkom kvercetina nakon toplinskog šoka dok je HSF bio u procesu vezanja za HSE. Ta procedura nije imala nikakvog efekta. Činjenica da je efikasnost kvercetina veća na 5' kraju hse gena „in vitro“ nego „in vivo“, je pripisana kompartimentizaciji stanice i vezanju kvercetina na ciljne molekule niz nekoliko odjeljaka koji su prisutni samo „in vitro“, dok se „in vivo“ kvercetin mimoilazi s većinom ovih molekula. Aktivacija HSF proteina „in vitro“ ureom je također inhibirana kvercetinom. Iako i urea i deterdženti denaturiraju proteine, to rade na različit način i izgleda da deterdžfent NP-40, a ne urea, denaturira vezno mjesto potrebno za vezanje kvercetina.

Priroda interakcije kvercetina s transkripcijskim faktorima je dodatno rasvjetljena proučavanjem aktivnosti ove komponente u njenom nativnom okolišu, u biljkama. Istraživana je modulacija ekspresije biljnih nodulacijskih gena *Rhizobiuma* transkripcijskim regulatornim faktorom u kompleksu s kvercetinom. Kinetika inhibicije vezanja HSF proteina na HSE putem kvercetina je pokazala da je efekt flavonoida počeo nakon vremenskog intervala od 15 minuta, ako je kvercetin dodan cijeloj suspenziji stanica nakon ili tijekom toplinskog stresa.

Nasuprot tome, efekt kvercetina je bio trenutačan, ukoliko su stanice ranije bile inkubirane s flavonoidom.

Ova razlika je interpretirana kao rezultat sporog transporta flavonoida preko plazmatske membrane kroz citoplazmu do steroidnog receptora i u kompleksu s njim, u transkripcijski kompleks u staničnu jezgru. Test je, također, pokazao da kvercetin nije samo sprječavao vezanje HSF-a na HSE, nego je i rastavljao i HSF-HSE komplekse koji su bili formirani prije dodatka kvercetina.

Dakle, promjenjena HSF forma, koja je inducirana kvercetinom, nije u mogućnosti vezati se na HSE. Dok je u *Saccharomyces cerevisiae* HSF protein već vezan na HSE pod nestresnim uvjetima, ali se aktivira tek u uvjetima toplinskog stresa, situacija u vrsti *Drosophila melanogaster* i u ljudskim stanicama je različita. U zadnjim stanicama, HSF se ne veže na HSE dok se nije dogodio toplinski stres.

Aktivacija HSF-a inducirana stresom se sastoji od dva koraka: konformacijske promjene HSF proteina, koji kreira speifično DNA vezno mjesto i fosforilacije. Ove osobine liče na one natporodice steroidnih receptora toliko da se nameće pitanje pripadnosti HSF-a u ovu skupinu. U tom slučaju, može čak biti reguliran hidrofobnim ligandom kao što je steroid. Budući da su flavonoidi nošeni takvim proteinima, može se predvidjeti kompeticija između liganda proizvedenog pod stresnim uvjetima i molekule flavonoida.

Drugi aspekt narušavanja HSF strukture vezanjem flavonoida je podložnost iste proteolizi. Poznato je da stanična jezgra sadrži proteazu koja probavlja cikličke molekule kad su već obilježene fosforilacijom. Budući da je HSF fosforiliran, postoji mogućnost da je i rastavljen, a vezanje flavonoida utječe na njegovu podložnost probavi. Najjednostavniji način za odgovor na to pitanje je kloniranje HSF-a i eksprimiranje dovoljne količine ovog proteina za provođenje kemijskih i kristalizacijskih eksperimenata.

Osim kvercetina, flavonoid genistein također inhibira aktivaciju HSF-a, ali ne prevencijom njihova vezanja na DNA. Umjesto toga, genistein inhibira aktivnost proteinskih fosfokinaza. Budući da su HSP-i uključeni u mnoštvo staničnih procesa, kao što su stanični ciklus, diferencijacija, apoptoza, razvoj i onkogena transformacija, studije njihove regulacije su jako bitne.

Flavonoidi, dakle, se mogu koristiti za analizu spomenutih procesa. Osim toga, imaju i praktičnu primjenu, recimo, kao unaprijeđivači termalne osjetljivosti tumorskih stanica prije hipertermičke terapije. Uloga HSP-a kao antagonista poticanjem apoptoze kvercetinom je kompleksna.

Dokazano je da protein HSP-70 antagonizira apoptozni efekt kvercetina na tumorske stanice. Budući da se HSP-70 agregira u nukleoplazmi, nukleolusu i citoplazmi nakon

toplinskog šoka, ali je to spriječeno predtretmanom kvercetinom, apoptoza inicirana kvercetinom može biti ubrzana sprječavanjem funkcije šaperona hsp-70. Tako, proteini koji se moraju translocirati intracelularno da dosegnu njihova mjesta akcije, primjerice, u mitohondriju, se ne bi mogli renaturirati nakon denaturacije da prođu kroz membranu. Posljedica je da mitohondriji ne bi imali dovoljno kromosomalno kodiranih proteina koji se unose normalno i vitalne funkcije, kao što je oksidativna fosforilacija, bi prestale.

6. UTJECAJ FLAVONOIDA NA STANICE RAKA DOJKE

Neke tumorske stanice raka dojke su okarakterizirane po svojoj sposobnosti vezanja estrogena, koji cirkuliraju u krvi, na specifične receptore plazmatske membrane i po izvođenju nekih koraka diferencijacije, koji su zakazali ili krenuli u suprotnom smjeru uslijed onkogene transformacije. Budući da ovaj proces reducira malignost takvih stanica, ili ih čak vraća u normalno stanje, sposobnost stanica raka dojke da specifično vežu estrogene se smatra osobinom koja doprinosi dobroj prognozi prilikom ozdravljenja. Osjetljivost na spolne hormone nije karakteristična za druge epitelne tumore, čak ni za karcinome reproduktivnih organa. Odatle slijedi da je ovaj mehanizam dio normalnog fiziološkog procesa koji je prekinut onkogenom transformacijom. Epitelne stanice dojke mogu eksprimirati najmanje dva receptora za estrogen: EBS I i EBS II, koji posjeduju istu vezujuću specifičnost, ali se razlikuju u afinitetu za ligand. Receptor nizeg afiniteta, EBS II, je induciran flavonoidima. Kvercetin je najefikasniji u induciranju EBS II.

Estrogeni efekt nekih flavonoida je otkriven promatranjem ovaca koje su jele fermentiranu djetelinu koja sadrži silibin. To je pripisano činjenici da steričke pozicije hidroksilnih grupa u ovom flavonoidu su skoro identične onima u estrogenima. Flavonoidi, zbog svoje nepolarnosti ili u kompleksu s albuminom mogu proći kroz plazmatsku membranu i vezati se za citoplazmatski steroidni receptor. Prema tome, flavonoidi idu u staničnu jezgru na transkripcijski kompleks gena koji kontroliraju ekspresiju estrogenih receptora, a možda i drugih proteina koji sudjeluju u rastu i funkciji mliječnih žlijezda.

Sposobnost kvercetina da inducira EBS II receptore, ovisno o dozi, je nađena u staničnim linijama i ER pozitivnih i ER negativnih tumora. Ovi posljednji su jako zanimljivi, budući da prognoze za izliječenje tumora koji nemaju EBS su loše. Vrijeme potrebno za indukciju receptora nakon tretmana kvercetinom, je bifazično jer inicijalna pojava receptora je najjača nakon 24 sata, slijedi nestajanje nakon 72 sata i ponovna pojava, te na kraju

ekspresija. Ova kinetika ekspresije, koju je teško interpretirati, je također nađena na drugim hormonskim receptorima plazmatske membrane reproduktivnih stanica.

Analiza Scatchard plotom je otkrila da specifični afinitet vezanja EBS II receptora, koji su inducirani kvercetinom, se ne razlikuje od konstitutivno eksprimiranih receptora, no prosječni broj takvih receptora po stanici je udvostručen. Indukcija EBS II receptora zahtjeva transkripciju gena i sintezu proteina, budući da je efekt spriječen aktinomicinom D i cikloheksimidom. Inhibicija proliferacije tumorskih stanica dojke kvercetinom se događa na nekoliko razina metablizma i različitim mehanizmima. Kad su stanice izložene niskim koncentracijama kvercetina, proliferacija stanica je inhibirana u većoj mjeri , ali u višim koncentracijama, predtretman kvercetinom ne utječe na osjetljivost. Izloženost stanica niskim koncentracijama flavonoida ponovno uspostavlja normalni metabolizam rasta indukcijom EBS II receptora, dok visoke koncentracije inhibiraju razne stanične enzime. Inducirajući efekt EBS II receptora je zajednički za mnoštvo flavonoida, ne samo za kvercetin, ali je manje naglašen u većini njih.

7. UTJECAJ STRUKTURNO SRODNIH FLAVONOIDA NA EKSPRESIJU HSP GENA

HSP funkcioniraju kao šaperoni, te su odgovorni za transport, skupljanje i degradaciju unutarstaničnih polipeptida. Pod utjecajem stresnih uvjeta sinteza HSP se ubrzava, a visoka razina ekspresije gena hsp-70 je nađena u malignim tumorima. Prevelika ekspresija ili hsp 27 ili hsp 70 štiti tumorske stanice od apoptozne smrti i čini stanice rezistentnima na kemoterapiju ili radijaciju kombiniranu s hipertermijom,pojačava tumorogeni potencijal stanica glodavaca ili metastatički potencijal tumorskih stanica dojke. Također, hsp-27 je zanimljiv u onkološkim istraživanjima jer „heat shock protein“ molekularne težine 27 kDa facilitira otpuštanje osnovnog faktora rasta fibroblasta iz endotelnih stanica, koji potiče vaskularizaciju tumora i njegov rast. Tako da HSP geni predstavljaju potencijalne mete za dijagnozu i liječenje tumorskih bolesti.

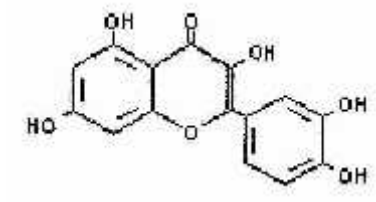
Flavonoidi, od kojih je najbolje istražen kvercetin, interferiraju s regulatornim putevima apoptoze, uzrokuju zastajanje staničnog ciklusa i suprimiraju ekspresiju heat shock gena.

U istraživanju koje su provodili Rusak i suradnici (2002.) se istraživao učinak različitih, ali strukturno srodnih flavonoida (kvercetin, kemferol, metilkvercetagetin, miricetin, taksifolin i isorhamnetin) na ekspresiju hsp gena (hsp 90, hsp 70A, hsp 60 i hsp 27) u ljudskim promijeloidnim leukemijskim stanicama pod i bez utjecaja toplinskog šoka. Pokazalo se da

kvercetin i taksifolin, u odnosu na ostale, najviše inhibiraju ekspresiju hsp 90 gena,suprimirajući ekspresiju za 30 % i 25%. Upravo je taj protein, prema istraživanjima, odgovoran za proliferaciju tumorskih stanica raka dojke. Među testiranim flavonoidima, kvercetin (Slika 5.) je bio najučinkovitiji inhibitor hsp 70 gena, dok se taksifolin (Slika 6.) pokazao induktorom ekspresije hsp 60 gena. HSP 70 ima ulogu u zaštiti stanice i popravku, te je jedan od bitnijih faktora odgovornih za termotoleranciju tumorskih stanica. Dakle, specifični inhibitori hsp 70 na razini genske ili proteinske sinteze mogu biti moćni agensi u liječenju raka. HSP 60 je bitna molekula u infektivnim i autoimunim bolestima. Prisutnost flavonoida je najviše utjecala na ekspresiju hsp 27 gena.

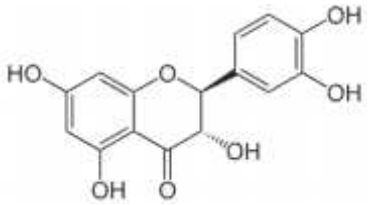
Budući da su taksifolin i kvercetin pokazali inhibitorni efekt na ekspresiju hsp 90, a ostali nisu, ta pojava ukazuje na činjenicu da dvostruka veza između C-2 i C-3 nije esencijalna za ovu aktivnost, a rezlutati dobiveni na hsp 70 genu sugeriraju da C-3' hidroksilna grupa skupa s dvostrukom vezom između C-2 i C-3 nije važna za ovu aktivnost, dok je dodatna C-5' ili C-6 hidroksilna grupa inhibira. Među testiranim flavonoidima je jedino taksifolin bio bitniji induktor ekspresije hsp 6O.Tako da se smatra da je jednostruka veza između C-2 i C-3 esencijalna za ovu indukciju. Kvercetin i kemferol su potentni inhibitori ekspresije hsp 27 u stanicama pod utjecajem toplinskog šoka. Nedostatak suprimirajuće aktivnosti taksifolina indicira da je dvostruka veza između C-2 i C-3 potrebna za supresiju ekspresije „heat shock proteina“ nakon toplinskog šoka. Neučinkovitost metilkvercetagetina i isorhamnetina ukazuje na činjenicu da metilna grupa na C-3 inhibira ovu aktivnost.

Ovo istraživanje ukazuje na važnost položaja, broja i supstitucije hidroksilnih grupa na prstenu B, te na zasićeni vez C-2 I C-3 u utjecaju flavonoida na ekspresiju hsp gena. Specifičnost i snaga inhibitorne aktivnosti ovisi o kemijskoj strukturi komponenata. U zadnje vrijeme se upravo flavonoidi intenzivno proučavaju u nadi da će se moći koristiti u kombinaciji s kemoterapijom kao tretman protiv raka.



Slika 5. Kvercetin

(www.benbest.com)



Slika 6. Taksifolin

(commons.wikimedia.org)

8. LITERATURA

Havsteen, B. H. (2002.): Pharmacology & Therapeutics, str. 130 - 140

Rusak,G., Gutzeit O. H., Ludwig- Miller, J. (2002.): Effects of Structurally Related Flsvonoids on hsp Gene Expression in Human Promyeloid Leukaemia Cells

commons.wikimedia.org

hr.wikipedia.org

library.thinkquest.org

www.benbest.com

www.cactusbotanics.com

www.cyberlypid.org

www.hsp90.org

www.soton.ac.uk

www.topharmon.com

www.wikipedia.org

zprojekti.mzos.hr

9. SAŽETAK

Uvriježeno je mišljenje da nutrijenti koji potječu iz voća i povrća sa svojim antioksidativnim djelovanjem pomažu u borbi protiv raka i kardiovaskularnih bolesti, kao i kod starenja. Flavonoidi su zasigurno najpoznatija, ali još uvijek nedovoljno istražena skupina prirodnih spojeva s pozitivnim učinkom na ljudski organizam. Nalaze se u namirnicama koje svakodnevno koristimo u prehrani, nesvjesni njihovog blagotvornog djelovanja.

Ovaj rad je imao tri cilja: prvi je bio rasvjetliti procese koji se događaju na molekularnoj razini, u samoj stanici, nakon što unesemo neki od tih spojeva u organizam.

Rak se često naziva bolešću modernog doba, budući da je u današnje, vrlo stresno doba, puno učestaliji nego u prošlosti, tako da je drugi cilj bio pojasniti djelovanje oviih biljnih metabolita na tumorske stanice.

Treći i zadnji cilj je popularizacija i upoznavanje s alternativnim metodama (jer se „pravilna prehrana“ još uvijek smatraju takvom) kojima se možemo boriti protiv raka.

10. SUMMARY

It is widely believed that nutrients from fruit and vegetables, with their antioxidant activity, help in struggle with cancer and cardiovascular diseases, as well as ageing. Flavonoids are, for sure, the most recognizable, but still not enough researched group of natural compounds with positive effect on human organism. They can be found in victuals which we use in everyday life, unaware of their good effect.

This work had three goals: first one was to enlight processes which happen on a molecular level, in a cell, after we take some of those compounds.

Cancer is often called a modern disease, since it is today, in a very stressful age, more frequent than it used to be in the past. Thus the second goal was to clear the effect of these plant metabolites, on tumor cells.

Third and the last goal was to popularize and present alternative methods (because proper diet is still considered like that) with which we can fight against cancer.