

# Potencijalno bioaktivno djelovanje ksantohumola - preniliranog flavonoida hmelja (*Humulus lupulus* L.)

---

**Mišković, Paula**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:138166>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2022.

Paula Mišković

**POTENCIJALNO BIOAKTIVNO  
DJELOVANJE KSANTOHUMOLA  
– PRENILIRANOG FLAVONOIDA  
HMELJA (*Humulus lupulus* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Teute Murati, te uz pomoć prof. dr. sc. Ivane Kmetič i dr. sc. Marine Miletić.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za toksikologiju

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

POTENCIJALNO BIOAKTIVNO DJELOVANJE KSANTOHUMOLA – PRENILIRANOG  
FLAVONOIDA HMELJA (*Humulus lupulus* L.)

Paula Mišković, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0125156160

**Sažetak:** Biljka *Humulus lupulus* L., odnosno njene šišarice, izlučuju lupulin, cvjetni prah bogat različitim bioaktivnim kemijskim spojevima te karakterističnom skupinom spojeva, preniliranim flavonoidima. Najvažniji i najzastupljeniji prenilirani halkan je bioaktivni spoj ksantohumol (KSN). U ovom radu dan je pregled mehanizama djelovanja KSN-a koja uključuju imunomodulatorno, antiproliferativno, citotoksično, antiangiogeno, antioksidacijsko, antigenotoksično, antimikrobno i antiviralno djelovanje. KSN uspješno inhibira rast tumora i angiogenezu te inducira apoptozu tumorskih stanica u *in vitro* i *in vivo* modelima. Bioaktivnost KSN-a i snažno antitumorsko djelovanje ukazuju na mogući terapijski potencijal ovog spoja te potrebu za daljnjim istraživanjima.

**Ključne riječi:** ksantohumol, hmelj, bioaktivni spojevi, tumor, mehanizam djelovanja

**Rad sadrži:** 42 stranice, 4 slike, 1 tablicu, 120 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Teuta Murati

**Pomoć pri izradi:** prof. dr. sc. Ivana Kmetič, dr. sc. Marina Miletić, asistent

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ivana Kmetič (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Teuta Murati (mentor)
3. prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević (član)
4. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (zamjenski član)

**Datum obrane:** 01. travnja 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Toxicology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### POTENTIAL BIOACTIVE EFFECT OF XANTHOHUMOL – PRENYLATED FLAVONOID FROM HOPS (*Humulus lupulus* L.)

*Paula Mišković*, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0125156160

**Abstract:** The hop cones of the plant *Humulus lupulus* L. secrete lupulin, a resinous powder rich in various bioactive compounds with characteristic group of compounds, prenylflavonoids. The most important prenylated chalcone is bioactive compound xanthohumol (XN). This review shows mechanisms of actions of XN including immunomodulatory, antiproliferative, cytotoxic, antiangiogenic, antioxidant, antigenotoxic, antimicrobial and antiviral activity. XN successfully inhibits tumor growth and angiogenesis and induces tumor cell apoptosis in *in vitro* and *in vivo* models. Bioactivity and strong antitumor activity of XN indicate a possible therapeutic potential of this compound and the need for further studies.

**Keywords:** xanthohumol, hops, bioactive compounds, tumor, mode of action

**Thesis contains:** 42 pages, 4 figures, 1 table, 120 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Teuta, Murati, PhD, Assistant professor

**Technical support and assistance:** Ivana, Kmetič, PhD, Full professor; Marina, Miletić, PhD, Scientific Assistant

#### Reviewers:

1. Ivana, Kmetič, PhD, Full professor (president)
2. Teuta, Murati, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Irena, Landeka Jurčević, PhD, Full professor (member)
4. Kristina, Radošević, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** April 1<sup>st</sup>, 2022

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. TAKSONOMIJA I MORFOLOGIJA VRSTE <i>Humulus lupulus</i> L. (HMELJ).....	2
2.2. PREGLED KEMIJSKOG SASTAVA I BIOAKTIVNIH KOMPONENTI HMELJA ...	3
2.3. KSANTOHUMOL – PRENILIRANI FLAVONOID HMELJA .....	6
2.3.1. Biosinteza ksantohumola.....	6
2.3.2. ADMET ksantohumola .....	8
2.3.3. Bioraspoloživost ksantohumola .....	9
2.4. MEHANIZMI DJELOVANJA KSANTOHUMOLA .....	10
2.4.1. Imunomodulatorno djelovanje ksantohumola .....	10
2.4.2. Antiproliferativno i citotoksično djelovanje ksantohumola .....	10
2.4.3. Antiangiogeno djelovanje ksantohumola .....	11
2.4.4. Antioksidacijsko djelovanje ksantohumola.....	13
2.4.5. Antigenotoksično djelovanje ksantohumola .....	14
2.4.6. Antimikrobno i antiviralno djelovanje ksantohumola.....	15
2.5. POTENCIJALNO ANTITUMORSKO DJELOVANJE KSANTOHUMOLA NA POJEDINE ORGANE I ORGANSKE SUSTAVE .....	16
2.5.1. Ksantohumol i rak pluća .....	16
2.5.2. Ksantohumol i leukemije .....	17
2.5.3. Ksantohumol i maligne bolesti probavnog sustava.....	18
2.5.3.1. Rak jetre .....	18
2.5.3.2. Rak gušterače .....	19
2.5.3.3. Rak debelog crijeva.....	20
2.5.4. Ksantohumol i maligne bolesti reproduktivnog sustava .....	21
2.5.4.1. Rak dojke .....	21
2.5.4.2. Rak grlića maternice .....	23
2.5.4.3. Rak jajnika .....	23
2.5.4.4. Rak prostate .....	24
2.5.5. Ksantohumol i maligne bolesti glave i vrata.....	25
2.5.5.1. Glioblastom.....	25
2.5.5.2. Rak štitnjače.....	26
2.5.5.3. Rak grkljana .....	26
2.5.6. Ksantohumol i melanom .....	27
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>29</b>
<b>4. LITERATURA</b> .....	<b>30</b>

# 1. UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je višegodišnja biljka koja se koristi u pivarskoj industriji za postizanje karakterističnih senzorskih svojstava piva. Ženske cvati (šišarice) hmelja dodaju se pivu u svrhu postizanja gorčine te specifične arome i okusa. Osim poželjne gorčine i osvježavajuće hmeljne arome piva, kiseline prisutne u hmelju također doprinose ukupnoj mikrobiološkoj stabilnosti piva, a hmeljne smole pozitivno utječu na stabilizaciju pivske pjene (Almaguer i sur., 2014).

S obzirom na veliki postotak konzumacije piva i povijesti ljekovitih svojstava hmelja, specifični spojevi hmelja koji utječu na kvalitetu piva postali su predmet brojnih istraživanja. Posljednjih godina posebno se istražuju fenolni spojevi hmelja, s naglaskom na prenilirane flavonoide i njihovo potencijalno antioksidacijsko djelovanje. Najzastupljeniji prenilirani flavonoid hmelja je ksantohumol (KSN) koji postaje predmet sve više istraživanja izvan pivarske industrije, posebno u farmaceutskoj industriji.

Cilj ovog rada bio je prikazati biološke učinke i mehanizme djelovanja KSN-a na staničnoj razini. Ovim diplomskim radom obuhvaćen je pregled literature o potencijalnom blagotvornom učinku ovog jedinstvenog bioaktivnog spoja, izoliranog iz hmelja kao jedinog prirodnog izvora, na zdravlje ljudi.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. TAKSONOMIJA I MORFOLOGIJA VRSTE *Humulus lupulus* L. (HMELJ)

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je višegodišnja dvodomna biljka penjačica iz porodice konoplje (*Cannabinaceae*), reda koprivolika (*Urticales*), međutim 2003. godine uvršten je u red ružolika (*Rosales*) (Bremer i sur., 2003). U tablici 1 prikazan je taksonomski pregled roda *Humulus* L. Ova biljka najvjerojatnije potječe iz područja Kine, da bi se tijekom godina proširila na područje Europe i SAD-a (Alonso-Esteban i sur., 2019).

**Tablica 1.** Taksonomski pregled roda *Humulus* L. (prema ITIS, 2022)

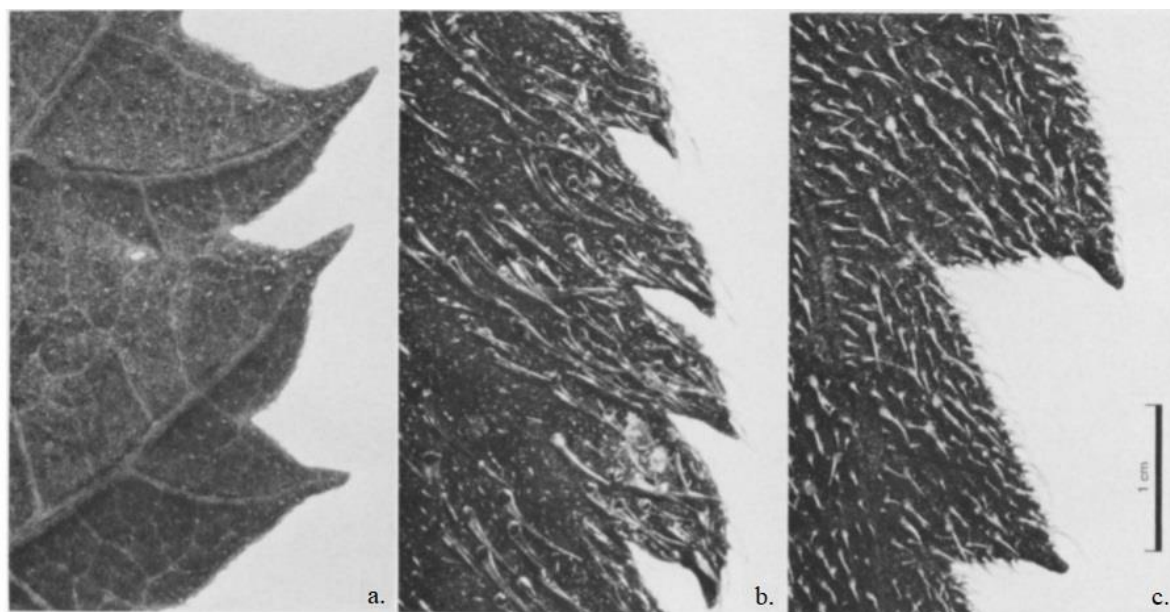
Carstvo	<i>Plantae</i>
Odjeljak	<i>Tracheophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred	<i>Rosanae</i>
Red	<i>Rosales</i>
Porodica	<i>Cannabinaceae</i>
Rod	<i>Humulus</i> L.

Rod *Humulus* L. uključuje tri različite vrste (slika 1) (Small, 1978):

- *Humulus japonicus* L. (japanski ili divlji hmelj)
- *Humulus yunnanensis* L.
- *Humulus lupulus* L. (obični hmelj) – dijeli se na pet podvrsta koje su određene različitim morfološkim obilježjima i zemljopisnom području uzgoja (ITIS, 2022; Small, 1978):
  - *Humulus lupulus* var. *lupulus*,
  - *Humulus lupulus* var. *cordifolius*,
  - *Humulus lupulus* var. *lupuloides*,
  - *Humulus lupulus* var. *neomexicanus*,
  - *Humulus lupulus* var. *pubescens*.

Hmelj je industrijska biljka koja se u velikim količinama upotrebljava u pivarskoj industriji, u svrhu očuvanja i aromatizacije piva (Karabin i sur., 2015). Višegodišnja je biljka, a prezimljuje pomoću podzemnih organa (višegodišnjim korijenom i dijelovima stabljike), te zatim svake godine tvori nadzemne vegetativne organe (cvijet, cvat, plod, sjeme). U prirodi se razmnožava vegetativno i generativno (sjemenom), dok se za proizvodnju razmnožavaju isključivo ženske biljke, i to vegetativno (reznicama, sadnicama, rizomima te zelenim dijelovima). Muška i ženska biljka morfološki se razlikuju jedino u građi generativnih organa, diferenciranim muškim i ženskim cvjetovima, koji se razvijaju na odvojenim biljkama. Uzgaja se prvenstveno kako bi se proizvele ženske neoplođene cvati – šišarice (*strobilus lupuli*), a njihove brakteje

(*glandulae lupuli*) s unutrašnje strane imaju mnogo žutih žlijezda, koje u vrijeme sazrijevanja izlučuju žuti cvjetni prah – lupulin (Alonso-Esteban i sur., 2019).



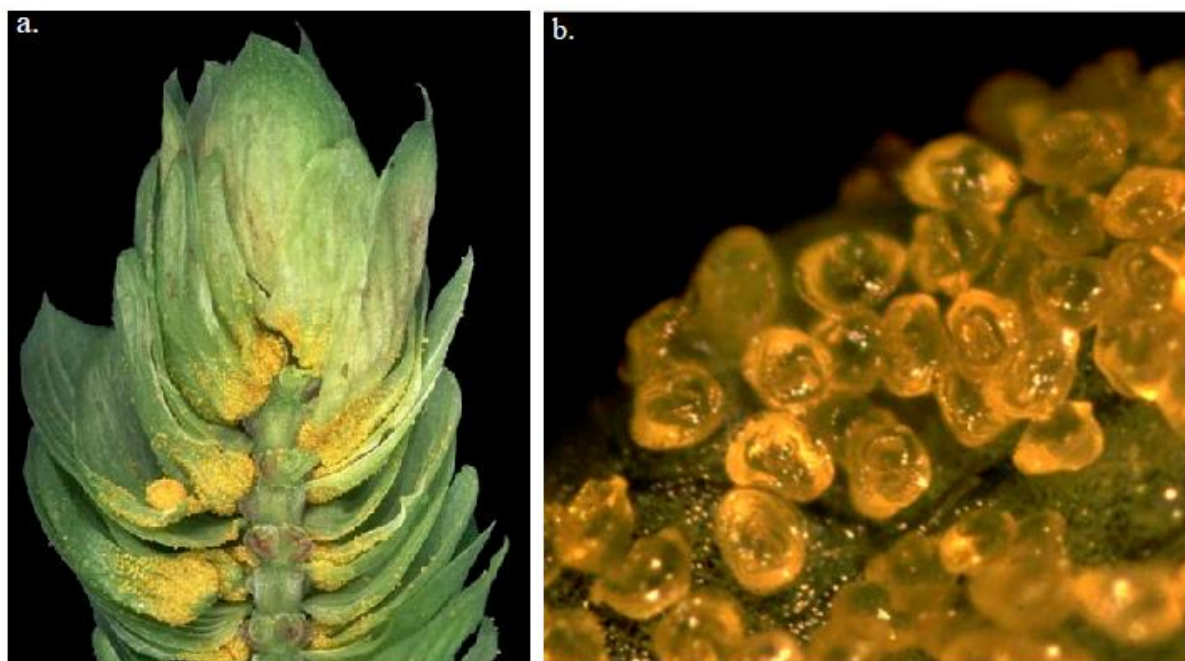
**Slika 1.** Prikaz adaksijalnih završetaka mladih listova tri vrste roda *Humulus*: (a.) *H. lupulus*, (b.) *H. japonicus* i (c.) *H. yunnanensis* (Small, 1978)

Prinos hmelja procjenjuje se na oko 2000 – 2500 kg/ha, što ga svrstava među najunosnije ratarske kulture. Osim u pivarskoj industriji, šišarice hmelja koriste se u manjoj količini i u farmaceutskoj industriji te u tradicionalnoj medicini za ublažavanje grčeva i upala, a hmeljne smole upotrebljavaju se kao blagi sedativ (Chattopadhyay, 2010). Istraživanje hmelja i njegovih sekundarnih metabolita znatno se ubrzalo tijekom posljednjih deset godina zbog sposobnosti ove biljke da biosintetizira prenilirane fenolne spojeve (derivati floriglucina poznati kao gorke kiseline, halkoni, flavanoni). Hmelj je važan izvor fenolnih sastojaka u pivu. Osušene šišarice hmelja sadrže 4 – 14 % polifenola, uglavnom fenolnih kiselina, halkona, preniliranih flavonoida, katehina i proantocijanidina (Bohr i sur., 2005). Neki od njih pokazali su širok spektar bioloških i farmakoloških aktivnosti. Zdravstveni učinci i bioaktivnost flavonoida hmelja su brojni, a ističu se antioksidacijsko, protuupalno, antikarcinogeno i antimikrobno djelovanje (Karabin i sur., 2015; Stevens i Page, 2004).

## **2.2. PREGLED KEMIJSKOG SASTAVA I BIOAKTIVNIH KOMPONENTI HMELJA**

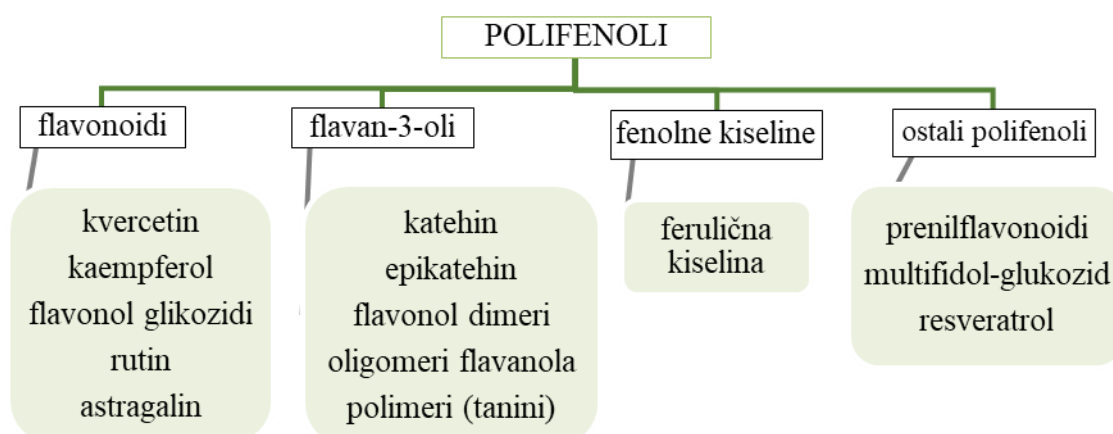
Unutar šišarica hmelja nalaze se lupulinske žlijezde (*glandulae lupuli*) u kojima se sintetiziraju sekundarni metaboliti u obliku žutog cvjetnog praha lupulina (slika 2). Lupulin sadrži velik broj

različitih kemijskih spojeva od kojih su najznačajnije  $\alpha$ -kisljine, eterična ulja i polifenoli. Kemijski sastav šišarica ovisi o genotipu kultivara i agroekološkim uvjetima. Prosječan sastav šišarica čini: celuloza i lignin (40 – 50 %), proteini (15 %), voda (8 – 12 %), pektin (2 %), pepeo (10 %), ulja, masti i voskovi (0 – 25 %), eterična ulja (0,5 – 1,5 %), polifenoli (2 – 5 %),  $\alpha$ -kisljine (2 – 12 %) i  $\beta$ -kisljine (1 – 10 %) (Verzele, 1986). Gorke kisljine su prenilirani derivati floriglucina i obično se klasificiraju kao  $\alpha$ - i  $\beta$ -kisljine. Najvažniji spojevi uključuju humulon koji čini 35 – 70 % ukupnog broja  $\alpha$ -kisljina, odnosno lupulon koji čini 35 % ukupnog broja  $\beta$ -kisljina koje karakterizira dodatni prenilirani lanac u odnosu na  $\alpha$ -kisljine (Zanoli i Zavatti, 2008). Osim gorkih sastojaka u hmelju, postoje i aromatske tvari ili eterična ulja. Njihov udio u suhoj tvari šišarica hmelja u prosjeku iznosi 0,5 – 1 %. Eterična ulja su terpeniski ugljikovodici, među kojima su najzastupljeniji mircen, humuleni i kariofileni. Oni čine oko 80 – 90 % ukupne količine eteričnih ulja. U aromatičnim kultivarima hmelja poželjni sastojci hmeljne arome su  $\beta$ -kariofilen, humulen i  $\beta$ -farnezen.  $\beta$ -kariofilen i humulen ubrajaju se u grupu seskviterpena. Udio  $\beta$ -kariofilena u ukupnim uljima hmelja iznosi do 15 %, a humulena do 40 % (Srećec, 2006). Polifenoli hmelja čine do 4 % ukupne mase osušenih šišarica hmelja te su vrlo značajan sekundarni metabolit ove biljke (Roberts i Wilson, 2006). Polifenolna frakcija predstavlja velik broj spojeva različitih karakteristika, iako kemijski dijele zajednički strukturni element – aromatski prsten s najmanje dvije hidroksilne skupine.



**Slika 2.** Presjek šišarice hmelja (a.) i prikaz lupulina na lupulinskim žlijezdama (b.) (Stevens i Page, 2004)

Većina polifenola u hmelju sastoji se od spojeva veće molekulske mase kao što su tanini, a tek oko 20 % polifenola hmelja sastoji se od niskomolekularnih tvari poput katehina ili proantocijanidina, fenolnih kiselina (npr. ferulična kiselina) i flavonola (kvercetin, kaempferol) koji su glikozidno vezani za razne šećere (Biendl, 2009). Polifenole hmelja općenito možemo podijeliti na flavonole, flavan-3-ole, fenole karboksilne kiseline i druge polifenole, uključujući prenilflavonoide i multifidol glukozide (slika 3) (Almaguer i sur., 2014). Nadalje, neki polifenoli gotovo su isključivi za hmelj. Svaka biljka ima tipičan polifenolni uzorak, a hmelj se pokazao bogatim izvorom specifičnih preniliranih polifenola (prenilflavonoida) kao što su ksantohumol (KSN), desmetilksantohumol, 6-prenilnaringenin i 8-prenilnaringenin (Magalhães i sur., 2009). Prenilirani flavonoidi, posebno halkoni i flavanoni, akumuliraju se na vanjskom dijelu lupulinskih žlijezdi olakšavajući njihovu ekstrakciju (Nagel i sur., 2008). Prevladavajući i najvažniji prenilirani halkon u hmelju je KSN koji predstavlja do 1 % suhe mase šišarica. Prisutnost slobodnih hidroksilnih skupina na strukturi halkona može dovesti do njihove izomerizacije u flavanone. KSN izomerizira u izoksantohumol, koji je prisutan u vrlo malim koncentracijama u hmelju, ali vrlo visokim u pivu gdje nastaje uslijed toplinske obrade (Karabin i sur., 2015). Zbog svoje dvije slobodne hidroksilne skupine, desmetilksantohumol izomerizira u smjesu 6-prenilnaringenina i 8-prenilnaringenina. Ova dva flavanona, posebno 8-prenilnaringenin, snažni su fitoestrogeni (Zanoli i Zavatti, 2008). Do sada je iz hmelja izolirano oko 30 preniliranih, geraniliranih, oksidiranih i/ili cikliziranih manjih halkona (Stevens i Page, 2004). Povećanjem broja prenilnih skupina u tim molekulama može se povećati njihova lipofilnost, vezanje za staničnu membranu i transmembranski transport (Pafiti i Vlasίου, 2019).

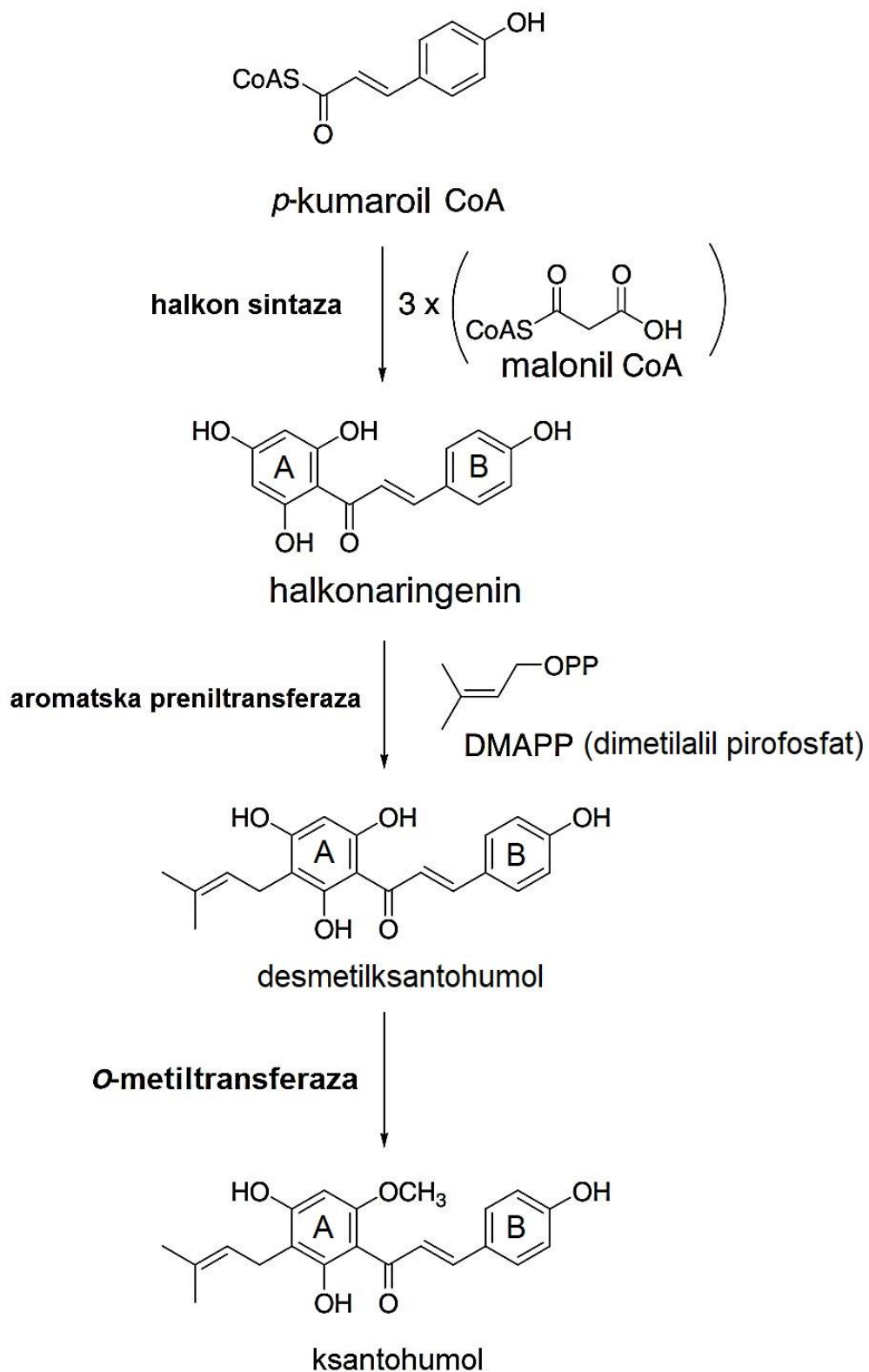


**Slika 3.** Polifenoli u hmelju (prema Almaguer i sur., 2014)

## 2.3. KSANTOHUMOL – PRENILIRANI FLAVONOID HMELJA

### 2.3.1. Biosinteza ksantohumola

KSN nastaje u lupulinskim žlijezdama (trihomima) šišarica hmelja. Budući da hmelj sadrži i glikozide (kaempferol i kvercetin), enzimi koji sudjeluju u biosintezi KSN-a preusmjeravaju biosintezu flavonoida u prenilflavonoidni put isključivo u lupulinskim žlijezdama (Stevens i Page, 2004). Biosinteza KSN-a ograničena je na vrstu *H. lupulus*. KSN se luči kao dio hmeljne smole (lupulin) na trihomima koji se nalaze na adaksijalnim površinama listova šišarica, a nalazi se i na trihomima s donje strane mladog lišća. KSN je glavni prenilirani flavonoid hmelja (0,1 – 1 % na suhu masu), a uz njega je identificirano najmanje 13 srodnih halkona (Stevens i Page, 2004). Biosinteza KSN-a i drugih biljnih terpenofenola nije u potpunosti razjašnjena. Ovi spojevi imaju višestruko podrijetlo i sastoje se od jezgre izvedene iz poliketida te modificirane prenilnim bočnim lancima dobivenim iz izoprenoida (Nagel i sur., 2008). Prvi korak u biosintezi KSN-a (slika 4) je kondenzacija *p*-kumaroil CoA s tri molekule malonil CoA kako bi se dobio halkonaringenin (naringenin halkon). Reakciju katalizira halkon sintaza. Biosinteza mnogih flavonoida odvija se enzimskom pretvorbom ovog tetrahidroksihalkona u flavanon, (2S)-naringenin, djelovanjem halkon izomeraze (Stevens i Page, 2004). Međutim, u slučaju KSN-a, čini se da naknadna prenilacija i metilacija A prstena inhibiraju stvaranje flavanona i preusmjeravaju biosintezu flavonoida u specifični metabolički put (Stevens i Page, 2004). Djelovanjem aromatske preniltransferaze prenilacijom A prstena halkonaringenina s dimetilalil pirofosfatom (difosfatom) nastaje desmetilksantohumol, koji se zatim metilira do KSN-a vjerojatno djelovanjem *O*-metiltransferaze ovisno o *S*-adenozil-L-metioninu (slika 4). Moguć je i obrnuti redoslijed za ove dvije reakcije, ali prisutnost desmetilksantohumola u šišaricama hmelja i odsutnost *O*-metilhalkonaringenina sugeriraju da se prvo odvija prenilacija (Nagel i sur., 2008).



**Slika 4.** Biosinteza ksantohumola (prema Stevens i Page, 2004)

### 2.3.2. ADMET ksantohumola

Izloženost KSN-u obično uključuje oralnu primjenu. Zbog konverzije KSN-a u izoksantohumol toplinskom obradom tijekom procesa kuhanja, općenito je koncentracija KSN-a u pivu vrlo niska (0,03 – 0,08 mg/L), a osim što ovisi o procesu kuhanja ovisi i o postupku obogaćivanja piva hmeljem nakon procesa kuhanja (Hussong i sur., 2005). U istraživanju Wolffa i sur. (2011) apsorpcija i unutarstanična raspodjela KSN-a određivana je kvantitativno i vizualno na staničnim kulturama HuH7 (humana linija raka jetre), HSC (hematopoetske matične stanice) i Caco-2 (stanice humanog kolorektalnog adenokarcinoma) te primarnoj staničnoj liniji hepatocita pomoću fluorescentne mikroskopije. Već nakon 40 – 70 min (ovisno o tipu stanica) došlo je do potpunog ulaska KSN-a u sve tipove stanica. Unutarstanične koncentracije bile su, ovisno o tipu stanica, do 60 puta veće od prisutnih koncentracija u okolnom mediju. Ovi podaci ukazuju na snažno nakupljanje KSN-a unutar stanica, što može biti objašnjeno vezanjem KSN-a na citosolne proteine što dovodi do visoke akumulacije u stanicama jetre i crijeva. Stoga je KSN u stanicama uglavnom vezan za stanične proteine (Wolff i sur., 2011). U istraživanju kojeg su proveli Nookandeh i sur. (2004) biotransformacija KSN-a istraživana je na ženka Sprague Dawley (SD) štakora. Štakori su tretirani KSN-om u dozama od 1000 mg/kg.t.m. suspendiranog u 4 %-tnoj otopini škroba putem sonde. Kromatografijom uzoraka fecesa pronađena su 22 metabolita KSN-a, te je u najvećem omjeru bio prisutan nepromijenjeni KSN, dok su ostali metaboliti izolirani u višestruko nižim količinama. Nakon što je KSN uklonjen iz uzorka, rezultati istraživanja izoliranih metabolita pokazali su sljedeće transformacije: hidrosilacija, *O*-metilacija, *O*-acetilacija, epoksidacija i ciklizacija koja uključuje bočni lanac te glukuronidacija na hidroksilnoj skupini (položaj 40). Ostali metaboliti zadržali su skelet halkona s nepromijenjenim ili modificiranim prenilnim dijelovima (Nookandeh i sur., 2004). Istovremeno je provedeno istraživanje akutne toksičnosti KSN-a. Promatranjem ovih životinja do 48 sati nisu otkriveni štetni učinci primjene KSN-a. Sukladno navedenom, utvrđena je najveća podnošljiva doza (engl. *maximum tolerated dose*, MTD) veća od 1000 mg/kg.t.m./dan. Rezultati istraživanja također su pokazali da je izlučeni KSN uglavnom ostao nepromijenjenog oblika, odnosno više od 80 % primijenjenog KSN-a izlučilo se fecesom i urinom, što ukazuje da je bioraspoloživost KSN-a nakon oralne primjene niska (Nookandeh i sur., 2004). Kasnije su Vanhoecke i sur. (2005) proveli ispitivanje sigurnosti primjene KSN-a na ženka C3H miševa tijekom 4 tjedna. Dnevna doza iznosila je oko 23 mg/kg.t.m. te nisu uočeni znakovi toksičnosti u koštanoj srži, jetri, egzokrinom gušterači, bubrezima, mišićima, štitnjači, jajnicima i nadbubrežnom korteksu. Nadalje, nisu zabilježene niti razlike u metabolizmu proteina, lipida,



ugljikohidrata i mokraćne kiseline, kao ni u koncentraciji iona. Hussong i sur. (2005) su također proveli ispitivanje subkronične toksičnosti KSN-a na ženama SD štakora, ali u visokim dnevnim dozama do 1000 mg/kg.t.m. tijekom 4 tjedna. Primjena je rezultirala smanjenjem relativne veličine jetre tretiranih životinja, što ukazuje na blagu hepatotoksičnost, dok relativne težine bubrega, pluća, srca, želuca i slezene kao i prosječne tjelesne težine nisu promijenjene u usporedbi s kontrolnom skupinom. Budući da jetra ima sposobnost regeneracije, uočeni znakovi blage hepatotoksičnosti mogu biti reverzibilni. Općenito, vrlo je mala vjerojatnost da će ljudi ili životinje biti izloženi dozama KSN-a u dozama od 1000 mg/kg.t.m./dan. Osim ispitivanja subkronične toksičnosti, Hussong i sur. (2005) proveli su i test reproduktivne toksičnosti. Deset tjedana stari mužjaci i ženke SD štakora tretirani su KSN-om putem vode za piće u dozama od 100 mg/kg.t.m. tijekom 4 tjedna prije parenja. Primjena KSN-a na ženama SD štakora prije ili tijekom parenja, gestacije i dojenja nije izazvala nikakve štetne učinke na reproduktivnost ženke i razvoj potomstva. Primjena KSN-a na mužjake štakora prije parenja značajno je povećala omjer spolova muškog i ženskog potomstva u korist muških potomaka. Rezultati istraživanja nisu pokazali nikakve štetne učinke na reprodukciju, a primjena doze od 100 mg/kg.t.m./dan u studiji na dvije generacije nije uzrokovala značajan utjecaj na razvoj štakora (Hussong i sur., 2005).

### 2.3.3. Bioraspoloživost ksantohumola

*In vivo* istraživanjem kojeg su proveli Nookandeh i sur. (2004) dobiveni su jasni pokazatelji o vrlo niskoj bioraspoloživosti KSN-a prilikom oralne primjene. Rezultati farmakokinetike kod ljudi pokazali su da nakon oralne primjene KSN pokazuje linearni odgovor s povećanjem oralne doze, te je uočen jasan dvofazni obrazac apsorpcije KSN-a. Spora apsorpcija nakon oralne primjene i enterohepatička recirkulacija doprinose dugom poluvremenu izlučivanja KSN (Liu i sur., 2015). Nadalje, Pang i sur. (2007) su proveli *in vitro* istraživanje o unosu i akumulaciji KSN-a koristeći Caco-2 staničnu liniju. Otprilike 70 % apliciranog KSN-a nakupilo se unutar stanica, dok je 93 % intracelularnog KSN-a bilo lokalizirano u citosolu. Rezultati upućuju na to da specifično vezanje KSN-a na citosolne proteine u stanicama crijevnog epitela doprinosi slaboj bioraspoloživosti uočenoj *in vivo*. Tijekom inkubacije Caco-2 kulture stanica s KSN-om, otkriveno je da KSN brzo ulazi u stanice bez pomoći transportera, međutim pokazuje ekstremno nisku bioraspoloživost (Pang i sur., 2007). S obzirom da specifično vezanje KSN-a na citosolne proteine u stanicama crijevnog epitela može doprinijeti slaboj bioraspoloživosti *in vivo*, provedena su i istraživanja o interakcijama KSN-a sa staničnom membranom. Rezultati su pokazali da se KSN ubacuje u lipidni dvosloj i utječe na organizaciju i biofizička svojstva



dvosloja, što može pridonijeti brzom transportu kroz staničnu membranu (Liu i sur., 2015).

## 2.4. MEHANIZMI DJELOVANJA KSANTOHUMOLA

### 2.4.1. Imunomodulatorno djelovanje ksantohumola

Sposobnost utjecaja na promjenu funkcije imunskog sustava, odnosno djelovanja određenih sastavnica imunskog sustava predstavlja imunomodulatorni učinak. Najveći učinak ostvaruje se utjecajem na djelovanje limfocita (B i T), imunoglobulina (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA) i citokina. U dvije studije (Cho i sur., 2008; Zhao i sur., 2003) dokazano je da KSN inhibira ekspresiju proupalnih iNOS (engl. *inducible nitric oxide synthase*), IL-1 $\beta$  (engl. *interleukin-1 $\beta$* ) i TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) u aktiviranim makrofagima RAW 264.7 inhibicijom NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) ili aktivacijom STAT-1 $\alpha$  (engl. *signal transducer and activator of transcription-1 $\alpha$* ) i IRF-1 (engl. *interferon regulatory factor-1*). Gao i sur. (2009) ispitali su učinak KSN-a na imunosni odgovor posredovan T limfocitima, te pratili proliferaciju T stanica izazvanu mitogenom/aloantigenom i proizvodnju citokina kao glavnih faktora patogeneze kroničnih upalnih poremećaja i tumora. Primjena KSN-a u koncentracijama 10 – 40  $\mu$ M učinkovito je inhibirala proliferaciju T limfocita miša induciranu aloantigenom. Gao i sur. (2009) također su ispitali učinak KSN-a na stvaranje ubilačkih stanica aktiviranih limfokinima (engl. *lymphokine activated killer cells*, LAK) i citotoksičnih T limfocita (engl. *cytotoxic T lymphocytes*, CTL). Primjena KSN-a u koncentraciji 10 – 40  $\mu$ M značajno je smanjila stvaranje LAK stanica te uzrokovala inhibiciju lučenja citokina IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  primjenom KSN-a (Gao i sur., 2009). KSN je uspješno inhibirao upalne odgovore u LPS-induciranim BV2 stanicama djelovanjem na produkciju upalnih medijatora (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). Primjena KSN-a uzrokovala je pojačanu regulaciju transkripcije i povećnu razinu endogenog antioksidansa, te aktivaciju NRF2 puta i NF- $\kappa$ B signalizacije. Rezultati ukazuju na potencijalnu primjenu KSN-a u prevenciji neurodegenerativnih bolesti povezanih s upalom te značajnu ulogu u smanjenju napredovanja bolesti (Lee i sur., 2011).

### 2.4.2. Antiproliferativno i citotoksično djelovanje ksantohumola

Procesi karakteristični za fazu progresije tumorskih stanica uključuju nekontroliranu staničnu proliferaciju neovisnu o stimulaciji hormonima ili faktorom rasta te oštećenje mehanizama poput apoptoze (programirana stanična smrt) i terminalne stanične diferencijacije, koji su ključni u regulaciji homeostaze tkiva. Gerhäuser i sur. (2002) istraživali su potencijalni antiproliferativni učinak KSN-a koristeći stanice adenokarcinoma dojke MDAMB-435.

Antiproliferativni mehanizmi KSN-a u sprječavanju karcinogeneze u fazi progresije uključuju inhibiciju sinteze DNA i indukciju zaustavljanja staničnog ciklusa u S fazi, apoptoze i diferencijacije stanica. Rezultati su pokazali da KSN inhibira aktivnost ljudske DNA polimeraze, jedine eukariotske polimeraze koja može inicirati sintezu DNA *de novo*. Nakon tretmana MDAMB-435 stanica s 25  $\mu\text{M}$  KSN-om tijekom 48 sati, ugradnja timidina u novosintetiziranu DNA smanjena je na 59,6 %. Analiza protočnom citometrijom pokazala je značajno nakupljanje stanica u S fazi staničnog ciklusa primjenom 5 – 20  $\mu\text{M}$  KSN-a tijekom 24 sata. Postotak stanica u  $G_0$ - $G_1$  fazi smanjio se sa  $48,7 \pm 2,1$  % u kontrolnoj skupini na  $36,6 \pm 4,1$  % i  $30,0 \pm 5,9$  % nakon tretmana s 10 odnosno 20  $\mu\text{M}$  KSN-a, dok se postotak stanica u S fazi povećao sa  $45,0 \pm 3,4$  % u kontrolnoj skupini na  $58,9 \pm 4,3$  % i  $65,8 \pm 5,3$  % nakon primjene KSN-a. Nakon tretmana stanica s 25  $\mu\text{M}$  KSN-a tijekom 48 sata udio stanica u apoptozi je iznosio 14,9 %. Mendes i sur. (2008) istraživali su proliferaciju preadipocita 3T3-L1 inkubiranih s KSN-om tijekom 24, 48 i 72 sati. Primjena KSN-a rezultirala je smanjenjem stanične proliferacije. Usporedbom kulture prije i nakon tretmana KSN-om utvrđeno je da je tijekom primjene kroz 48 i 72 sata sadržaj proteina niži u usporedbi s početkom tretmana što osim inhibicije rasta ukazuje na citotoksičnost. Nakon primjene KSN-a tijekom 24 sata preadipociti su pokazali morfološka i biokemijska obilježja karakteristična za apoptozu, a slična obilježja su zabilježena i u zrelim adipocitima (npr. povećanje citoplazmatskog citokroma c, odcjepljenje poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP), aktivacija efektorskih kaspaza-3 i -7). Utvrđeno je da KSN pokazuje slične učinke na preadipocite i adipocite kao i ostali polifenoli (epigalokatehin-3-galat, genistein, procijanidini, resveratrol), uključujući smanjenje proliferacije preadipocita i adipocita, indukciju apoptoze u zrelim adipocitima te inhibiciju diferencijacije. Mehanizmi njihovog djelovanja bili su u mnogim slučajevima usko povezani s njihovim antioksidacijskim potencijalom (Rayalam i sur., 2008).

#### 2.4.3. Antiangiogeno djelovanje ksantohumola

Biološki učinci halkona ovise o njihovoj kemijskoj strukturi, a supstitucije na molekulskoj strukturi imaju značajan utjecaj na njihove antitumorske učinke (Albini i sur., 2006). Osnovni koraci u angiogenezi i metastazama tumora su migracija i invazija kroz barijere ekstracelularnog matriksa. Provedena istraživanja antiangiogene aktivnosti pokazala su da je KSN potencijalna antiangiogena kemopreventivna tvar čiji je mehanizam djelovanja usmjeren na sprečavanje migracije endotelih stanica i invazije te u manjoj mjeri na smanjenje proliferacije stanica. U istraživanju kojeg su proveli Albini i sur. (2006) za praćenje učinaka KSN-a na stanične odgovore jakih angiogenih faktora korišteni su testovi kemotaksije i

kemoinvazije. Uočena je laka migracija i invazija endotelnih stanica kao odgovor na NIH-3T3 kondicioniran medij (korišten kao kemoatraktant) *in vitro*. Primjena KSN-a inhibirala je kemotaksiju endotelnih stanica i invaziju pri koncentracijama od čak 5  $\mu\text{M}$ , s potpunom inhibicijom pri 10  $\mu\text{M}$  ili više. Slični učinci zabilježeni su kao rezultat inhibicije i invazije KS-IMM (stanična linija Kaposijevog sarkoma) stanica, primjenom kojih je potpuna inhibicija postignuta tek pri 25  $\mu\text{M}$  KSN-u (Albini i sur., 2006). Drugi korak u modulaciji endotelnih stanica tijekom angiogeneze je diferencijacija i reorganizacija s ciljem stvaranja novih krvnih žila. Sposobnost KSN-a da interferira s tim procesom ispitana je na Matrigelu, mediju u kojem endotelne stanice spontano tvore strukture koje podsjećaju na razgranate kapilare u procesu koji predstavlja završnu fazu angiogeneze. Dodavanjem KSN-a inhibirano je stvaranje mreže kapilara HUVEC (engl. *human umbilical vein endothelial cells*, humane endotelne stanice umbilikalne (pupčane) vene) stanica na Matrigelu, s učincima vidljivim pri koncentracijama 5 – 10  $\mu\text{M}$  (Albini i sur., 2006). Potencijalna angiopreventivna svojstva KSN-a ispitana su na miševima oralnom primjenom KSN-a u vodi za piće. Kvantifikacija opsega angiogeneze pokazala je da doze KSN-a od samo 2  $\mu\text{M}$  u vodi za piće izazivaju značajnu inhibiciju angiogeneze. Isto djelovanje KSN-a bez štetnih učinaka zabilježeno je pri dozama od čak 200  $\mu\text{M}$ , što ukazuje na nisku toksičnost (Albini i sur., 2006). Brojni genski produkti regulirani NF- $\kappa\text{B}$  utječu na invaziju tumora, a ovaj nuklearni faktor također regulira aspekte upale i ekspresiju brojnih kemokina i angiogenih faktora rasta. Albini i sur. (2006) dokazali su da KSN interferira s višestrukim signalnim putevima uključenim u aktivaciju endotelnih stanica kao odgovor na angiogene čimbenike. Uočeno djelovanje KSN-a da inhibira kemotaksiju endotelnih stanica i invaziju *in vitro* upućuje na potencijalni učinak KSN-a na staničnu pokretljivost. U istraživanju koje su proveli Henderson i sur. (2000), KSN je u dozama 2 – 10  $\mu\text{M}$  učinkovito inhibirao enzime koji aktiviraju karcinogene, a dokazana je i potencijalna aktivnost u prevenciji raka uzrokovanog kemijskim karcinogenima (Miranda i sur., 2000). Također je zabilježeno da KSN značajno inhibira produkciju dušikovog oksida (NO), slobodnog radikala uključenog u karcinogenezu i angiogene procese, smanjenjem ekspresije iNOS-a (Zhao i sur., 2003). Gerhäuser i sur. (2006) dokazali su potencijalni angiostatski učinak KSN-a *in vitro* pomoću antiangiogenog testa zacjeljivanja rana. Rezultati istraživanja kojeg su proveli Saito i sur. (2018) pokazuju inhibiciju angiogeneze kod raka gušterače *in vitro* i *in vivo* primjenom KSN-a u koncentracijama višim od 10  $\mu\text{M}$ . U staničnim linijama raka gušterače (BxPC-3 i AsPC-1) KSN je inaktivirao NF- $\kappa\text{B}$  te je inhibirao ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i interleukina 8 (IL-8). Djelovanje KSN-a

uzrokovalo je inhibiciju stvaranja cjevčica u *in vitro* modelu angiogeneze raka gušterače što je posljedično uzrokovalo inhibiciju rasta tumora. Primjena KSN-a *in vivo* također je rezultirala smanjenjem veličine tumora. Benelli i sur. (2012) svojim su istraživanjem pokazali da primjena KSN-a inhibira angiogenezu kod akutne i kronične leukemije. Primjena KSN-a u drugim vrstama raka (uključujući leukemiju, mijelom, sarkom i rak kože) također je uzrokovala inhibiciju angiogenih markera (Girisa i sur., 2021). Kombinirana inhibicija faktora rasta i signalnih događaja citokina pokazuje snažno antiangiogeno djelovanje KSN-a, a navedena svojstva svrstavaju ga u potencijalne angiopreventivne tvari.

#### 2.4.4. Antioksidacijsko djelovanje ksantohumola

Antioksidansi imaju važnu ulogu u uklanjanju reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen substance*, ROS) i drugih radikala. Povećana proizvodnja ROS-a u uvjetima oksidacijskog stresa dovodi do oštećenja DNA i doprinosi inicijaciji tumora. Povišene razine ROS-a povezane su s promicanjem tumora i mogu u konačnici dovesti do karcinogeneze. Također, smatra se i da prekomjerna proizvodnja reaktivnih dušikovih radikala tijekom infekcije i kronične upale uzrokuje oštećenje stanica i karcinogenezu (Ohshima i Bartsch, 1994). Provedeno je nekoliko različitih istraživanja odnosno procjena antioksidacijskog djelovanja KSN-a. KSN je pokazao visoko antioksidacijsko djelovanje u inhibiciji oksidacije lipoproteina niske gustoće – LDL-a (engl. *low density lipoprotein*). Uspješno je uklonio reaktivne radikale uključujući hidroksilne i peroksilne radikale, te je uspio inhibirati proizvodnju superoksidnog aniona i dušikovog oksida (Gerhäuser i sur., 2002). Rezultati istraživanja kojeg su proveli Gerhäuser i sur. (2002) pokazali su da je KSN pokazao jače djelovanje od spoja s potvrđenom antioksidacijskom aktivnošću – troloxa u koncentraciji od 1  $\mu$ M, u uklanjanju hidroksilnih i peroksilnih radikala. KSN se također pokazao djelotvornim u uklanjanju superoksidnih anionskih radikala nastalih ksantin oksidazom, bez izravne inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze (Gerhäuser i sur., 2002). KSN je uspješno inhibirao proizvodnju NO induciranu lipopolisaharidom (engl. *lipopolysaccharide*, LPS) i INF- $\gamma$  u staničnoj liniji mišjih makrofaga RAW 264.7 (Nowakowska, 2007). Također, dokazano je da KSN inhibira ekspresiju gena koji kodiraju za iNOS, ciklooksigenazu 2 (COX-2), interleukine 6 (IL-6) i IL-1 $\beta$ . Pretpostavljeno je da bi glavni inhibitorni mehanizam mogao biti inaktivacija NF- $\kappa$ B (Nowakowska, 2007). Rezultati istraživanja potvrđuju da prenilacija predstavlja ključnu strukturnu modifikaciju KSN-a te u velikoj mjeri utječe na kemopreventivni potencijal ovog spoja (Magalhães i sur., 2009).

#### 2.4.5. Antigenotoksično djelovanje ksantohumola

S obzirom da brojna provedena istraživanja ukazuju na antioksidacijsku aktivnost KSN-a, uključujući sposobnost uklanjanja slobodnih radikala te indukciju enzima za detoksikaciju, u istraživanju Plazar i sur. (2007) proučavani su i potencijalni antigenotoksični učinci KSN-a. Dokazano je inhibitorno djelovanje KSN-a na aktivnost različitih enzima citokroma P450 (CYP) uključenih u aktivaciju karcinogena *in vitro* u mikrosomima jetre, što ukazuje da KSN može inhibirati stvaranje genotoksičnih metabolita (Miranda i sur., 2000). Također, dokazano je da KSN inducira aktivnost kinon reduktaze (QR), važnog enzima uključenog u detoksikaciju reaktivnih metabolita, u staničnoj liniji mišjeg hepatoma (Hep1c1c7) (Miranda i sur., 2000). Plazar i sur. (2007) proveli su *in vitro* istraživanje o mogućem protektivnom djelovanju KSN-a koristeći stanice humanog hepatokarcinoma (HepG2) na genotoksične učinke inducirane prokarcinogenima (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolina (IQ) i benzo(a)pirena (BaP)) koji su ovisni o metaboličkoj aktivaciji posredovanoj citokromom P450. Također, praćeno je i djelovanje KSN-a na genotoksične učinke koje inducira tert-butil hidroperoksid (tBOOH). Ovi toksikanti uzrokuju oštećenje DNA pomoću dva različita mehanizma koji uključuju stvaranje adukata nakon metaboličke aktivacije prokarcinogena i oksidacijsko oštećenje koje može biti rezultat spontanog stvaranja ROS-a ili metabolizma prokarcinogena. S obzirom da je tBOOH snažni organski peroksid, djeluje na indukciju ROS-a i tako izravno uzrokuje oksidacijsko oštećenje DNA, dok se BaP i IQ metaboliziraju djelovanjem CYP1A u nukleofilne intermedijere koji tvore DNA adukte. Rezultati su pokazali da KSN učinkovito štiti HepG2 stanice inhibirajući genotoksične učinke IQ-a i tBOOH već pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji (0,01  $\mu$ M). KSN je također u potpunosti zaštitio HepG2 stanice od oštećenja DNA uzrokovanih BaP, inhibicijom metaboličkih reakcija potrebnih za stvaranje DNA-reaktivnih metabolita (Plazar i sur., 2007). Isti autori 2008. godine proveli su slično istraživanje *in vivo*, a rezultati su pokazali da KSN u potpunosti inhibira oštećenje DNA izazvano djelovanjem IQ-a i BaP-a (Plazar i sur., 2008). Zaštitni učinci KSN-a na oštećenja DNA izazvanih s tBOOH bili su manje učinkoviti. Ispitano je i potencijalno zaštitno djelovanje KSN-a na oksidacijski stres. Rezultati mjerenja ekspresije mRNA pokazali su da nije došlo do povećanja ekspresije QR gena te je zaključeno da indukcija enzima ključnih u detoksikaciji nije mehanizam kojim KSN štiti DNA od genotoksičnih ksenobiotika (Plazar i sur., 2008). Iako mehanizam antigenotoksičnog djelovanja KSN-a nije u potpunosti razjašnjen, podaci ukazuju da pokazuje antigenotoksične učinke.

#### 2.4.6. Antimikrobno i antiviralno djelovanje ksantohumola

Antimikrobno i antiviralno djelovanje ekstrakata dobivenih iz biljnog materijala uglavnom se pripisuje sadržaju biološki aktivnih fenolnih spojeva prisutnih u biljci. Stoga, osim što imaju ulogu antioksidansa, polifenoli (posebno flavonoidi) imaju i antimikrobna svojstva (Arsene i sur., 2015). Zbog značajne biološke aktivnosti posebno su proučavani prenilirani flavonoidi (halkoni i flavanoni) uključujući i KSN. U istraživanju kojeg su proveli Wang i sur. (2004) KSN je uspješno inhibirao citopatske učinke izazvane virusom humane imunodeficijencije tipa 1 (engl. *human immunodeficiency virus-1*, HIV-1) te se pokazao kao potencijalno kemoterapijsko sredstvo protiv HIV-a. Antiviralno djelovanje KSN-a također je potvrđeno i protiv dva tipa herpes simpleks virusa (HSV-1 i HSV-2) (Buckwold i sur., 2004) te je uspješno inhibirao virus hepatitisa C (Lou i sur., 2014). Rozalski i sur. (2013) izvijestili su o učinkovitom antimikrobnom djelovanju KSN-a na bakterije *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus mutans*. Antimikrobna aktivnost KSN-a potvrđena je i primjenom sojeva bakterije *Escherichia coli*, kvasaca *Candida albicans* i *Rhodotorula rubra* te nitaste gljive *Alternaria sp.* (Stompor i Žarowska, 2016). KSN je pokazao antimikrobno djelovanje i na bakterije *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* i *Clostridium difficile* ukazujući na potencijalnu primjenu u liječenju i prevenciji infekcija uzrokovanih rezistentnim sojevima, posebno u bolničkim uvjetima (Cermak i sur., 2017). Ekstrakt hmelja pokazao je antibakterijsko djelovanje na gram-pozitivne bakterije *Enterococcus*, *Bacillus subtilis* te antifungalni učinak na *Trichophyton interdigitale* (Lin i sur., 2019). Iako KSN pokazuje značajna antimikrobna svojstva, u istraživanju kojeg su proveli Hanske i sur. (2005) nije zabilježen antimikroban učinak na mikrobiotu crijeva štakora primjenom KSN-a *in vivo*. Provedena istraživanja ukazuju na antiviralna svojstva KSN-a *in vitro* i *in vivo* (Caplin i Chen, 2020). Antimikrobna svojstva KSN-a pripisuju se interferenciji prenilne skupine s plazmatskom membranom bakterijskih stanica (Bartmanska i sur., 2018). Osim poželjnih terapijskih djelovanja, zanimanje za biljni otpad kao izvor spojeva s antimikrobnim djelovanjem značajno se povećalo iz ekoloških i ekonomskih razloga. Antimikrobni biljni spojevi koriste se kao djelatne tvari u razvoju antimikrobnih proizvoda, a kemijski spojevi dobiveni iz hmelja dobar su izvor biološki aktivnih tvari koje pokazuju potencijalnu primjenu u razvoju antimikrobnih proizvoda (Arsene i sur., 2015).

## 2.5. POTENCIJALNO ANTITUMORSKO DJELOVANJE KSANTOHUMOLA NA POJEDINE ORGANE I ORGANSKE SUSTAVE

### 2.5.1. Ksantohumol i rak pluća

Rak pluća trenutno je vodeći uzrok smrtnosti uzrokovane rakom, sa stopom preživljavanja od 15 % (Harish i sur., 2021). Postoje dvije osnovne vrste primarnog raka pluća: rak pluća malih stanica (SCLC) koji uključuje 15 – 20 % ukupnih slučajeva raka pluća, i rak pluća ne-malih stanica (NSCLC) koji čini 80 – 85 % svih slučajeva raka pluća. Godišnje umire oko 1,4 od ukupno 1,6 milijuna pacijenata oboljelih od raka pluća. Potreba za razvojem učinkovitijih terapija sve je veća, a razvoj novih vrsta ciljanih terapija temelji se na specifičnim mehanizmima uključenim u karcinogenezu i progresiju tumora (Sławinska-Brych i sur., 2016). Yong i sur. (2015) istraživali su antitumorsko djelovanje KSN-a koristeći staničnu liniju humanog adenokarcinoma pluća (A549) te proučavali učinak na proliferaciju stanica, indukciju apoptoze, učinak na stanični ciklus i aktivnost kaspaza. Rezultati su pokazali da KSN inhibira staničnu proliferaciju i smanjuje preživljavanje A549 stanica ovisno o primijenjenoj dozi i vremenu izloženosti, a vrijednosti  $IC_{50}$  nakon 24 sata iznosile su  $74,06 \pm 1,98 \mu M$ , nakon 48 sati  $25,48 \pm 0,30 \mu M$  i nakon 72 sata  $13,50 \pm 0,82 \mu M$ . Izračunate  $IC_{50}$  vrijednosti uspoređene su s vrijednostima dobivenim primjenom stanične linije humanih fetalnih plućnih fibroblasta (MRC-5), te su one određene za KSN na MRC-5 stanicama bile mnogo veće od vrijednosti  $IC_{50}$  KSN-a na A549. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da je KSN manje toksičan za normalne stanice u usporedbi sa stanicama raka *in vitro*. A549 stanice tretirane KSN-om proučavane su fazno-kontrastnim mikroskopom, te je uočeno da stanice tretirane KSN-om pokazuju svojstva karakteristična za stanice koje prolaze kroz apoptozu. Povećanje koncentracije KSN-a rezultiralo je povećanjem postotka stanica u sub- $G_1$  fazi (stanice u apoptozi). Tretman A549 stanica KSN-om rezultirao je povećanjem aktivnosti kaspaza-3, -8 i -9. Sukladno dobivenim rezultatima istraživanja, Yong i sur. (2015) zaključili su da bi KSN mogao imati selektivnu toksičnost za stanice raka pluća. Sławinska-Brych i sur. (2016) ispitivali su učinak KSN-a na dvije stanične linije humanog adenokarcinoma pluća – A549 i H1563. Ispitano je djelovanje KSN-a na preživljavanje stanica i inhibiciju stanične proliferacije. Rezultati su pokazali veću osjetljivost A549 stanica u odnosu na H1563 stanice. Autori su utvrdili da je smanjenje preživljavanja stanica nakon primjene KSN-a izravno povezano s inhibicijom stanične proliferacije i sinteze DNA. Najizraženija aktivnost ovog spoja zabilježena je pri dozi od  $50 \mu M$ , što je rezultiralo gotovo potpunom inhibicijom rasta A549 stanica (Sławinska-Brych i sur., 2016). Uz navedena istraživanja koja ukazuju na potencijal KSN-a kao aktivne tvari

antikarcinogenog učinka, pojedine znanstvene studije usmjerene su na poboljšanje učinaka postojećih terapeutika koji se koriste u liječenju raka pluća (npr. cisplatina) tako da ih se primjenjuje u kombinaciji s pojedinim polifenolima. Long i sur. (2019) svojim su istraživanjima pokazali da kotretman H1299 stanica s cisplatinom i KSN-om dovodi do potenciranja njihovog pojedinačnog antikarcinogenog učinka. Ovo novo polje znanstvenih istraživanja otvara mogućnost razvoja učinkovitijih terapijskih pristupa u liječenju karcinoma pluća.

### 2.5.2. Ksantohumol i leukemije

Leukemije su zloćudni tumori ovisni o angiogenezi koja je striktno ovisna o Akt/NF- $\kappa$ B aktivaciji. Angiogeneza je povezana s rastom i metastaziranjem solidnih tumora, a povećane razine angiogenih molekula mogu se koristiti kao pokazatelji karcinogeneze (Verstovsek i sur, 2002). Mi i sur. (2017) dokazali su potencijalno antitumorsko djelovanje KSN-a *in vitro* koristeći humane stanice akutne mijelocitne leukemije (HL-60) tretirane KSN-om (1 – 50  $\mu$ M) tijekom 48 sati te je uočeno da KSN ovisno o dozi smanjuje preživljavanje stanica HL-60. Eliminacija tumorskih stanica obično ovisi o indukciji apoptoze. Zabilježeno je više dokaza da i neki od neapoptotičkih puteva mogu doprinijeti smrti tumorskih stanica izazvanoj lijekovima protiv raka. Dell'Eva i sur. (2007) istraživali su učinke KSN-a *in vitro* na staničnim linijama kronične mijelocitne leukemije (MM6 i U937) te na izoliranim HUVEC stanicama pacijenata oboljelih od akutne i kronične mijelocitne leukemije. Rezultati su pokazali da KSN u mikromolarnim koncentracijama inhibira *in vitro* proliferaciju, te je uočena značajna apoptotička aktivnost. Primjena KSN-a značajno je inhibirala proliferaciju MM6, U937 i HUVEC stanica *in vitro* u koncentracijama od čak 2,5  $\mu$ M. Tretman stanica MM6 i U937 tijekom 5, 15 ili 30 minuta s 10 ng/mL TNF- $\alpha$  doveo je do snažne aktivacije NF- $\kappa$ B. Predinkubacija tijekom 6 sati u prisutnosti 5  $\mu$ M KSN-a značajno je inhibirala ovu TNF- $\alpha$  induciranu aktivaciju NF- $\kappa$ B. Pod istim uvjetima, KSN je također inhibirao Akt fosforilaciju. Šesnaest sati primjene KSN-a značajno je smanjilo razine VEGF- $\alpha$  u staničnim linijama na oko 50 % kontrolnih (mišja monoklonalna anti- $\beta$ -tubulin protutijela) vrijednosti. Sukladno dobivenim rezultatima, smatra se da bi KSN mogao inhibirati angiogene procese smanjenjem izlučivanja VEGF- $\alpha$  u leukemijskim stanicama. Harikumar i sur. (2008) istraživali su učinke KSN-a na različite stupnjeve u procesu aktivacije NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B regulacije genskih produkta i NF- $\kappa$ B reguliranih staničnih odgovora na stanicama kronične mijelocitne leukemije (KBM-5) i stanicama multiplog mijeloma (U266). KSN je uspješno inhibirao TNF- $\alpha$  induciranu invaziju tumorskih stanica, a put aktivacije NF- $\kappa$ B povezan je s preživljavanjem tumorskih stanica,



proliferacijom, invazijom i angiogenezom (Harikumar i sur., 2008). S obzirom da KSN pokazuje izravna i neizravna antiangiogena svojstva te istovremeno izravno inducira apoptozu tumorskih stanica, postoji temelj za daljnja istraživanja kliničke učinkovitosti. Najnovija istraživanja upućuju na KSN-om induciranu paraptozu kao dominantni put odumiranja stanica leukemije (Mi i sur., 2017) te se, uz apoptotski put koji je često predmetom znanstvenih istraživanja, treba obuhvatiti i druge oblike stanične smrti potaknute KSN-om.

### 2.5.3. Ksantohumol i maligne bolesti probavnog sustava

#### 2.5.3.1. Rak jetre

Hepatocelularni karcinom (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC), odnosno primarni rak jetre, jedan je od najčešćih malignih tumora u svijetu. HCC nastaje u uvjetima bolesti i ciroze jetre, kada je oslabljena funkcija jetre. Pacijenti često ne mogu podnijeti operaciju ili konvencionalne kemoterapeutike u dovoljno jakim dozama (Zhao i sur., 2016), a zbog česte neosjetljivosti HCC-a na kemoterapeutike potrebno je istražiti nova potencijalna sredstva (Dorn i sur., 2010a). Ho i sur. (2008) zabilježili su inhibiciju proliferacije stanica humanog HCC-a uzrokovanu apoptozom tumorskih stanica. Stanične linije humanog HCC-a ( $IC_{50}$  za HA22T/VG iznosi  $166 \pm 3 \mu\text{M}$ , a  $IC_{50}$  za Hep3B iznosi  $108 \pm 5 \mu\text{M}$ ), pokazale su veću osjetljivost na KSN od stanične linije normalnih hepatocita miša ( $IC_{50}$  za AML12 iznosi  $211 \pm 6 \mu\text{M}$ ). U koncentraciji od  $25 \mu\text{M}$  KSN je uspješno inducirao apoptozu u dvije HCC stanične linije (HepG2 i Huh7) dok primarni hepatociti nisu bili osjetljivi na djelovanje KSN-a *in vitro* u koncentracijama do  $100 \mu\text{M}$ . Uspješno je inhibirao proliferaciju i migraciju, kao i TNF induciranu aktivnost NF- $\kappa$ B i ekspresiju interleukina-8 u obje HCC stanične linije (Dorn i sur., 2010a). Kunnimalaiyaan i sur. (2015a) dokazali su antiproliferativne učinke KSN-a na HCC staničnim linijama (HepG2, Hep3B) te staničnoj liniji humanog adenokarcinoma jetre (SK-Hep-1). Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da KSN inhibira Notch signalni put, što posljedično uzrokuje inhibiciju proliferacije i indukciju apoptoze stanica. Antitumorsko djelovanje KSN-a potvrđeno je primjenom koncentracija od  $200 \mu\text{M}$  tijekom 24 sata. Primjena KSN-a uzrokovala je inhibiciju stanične proliferacije i apoptozu stanica, a ekspresija NF- $\kappa$ B i citokroma c bila je značajno inhibirana sa  $100 - 150 \mu\text{M}$  KSN-a (Zhao i sur., 2016). Potencijalni hepatoprotektivni učinci KSN-a uključuju djelovanje na aktivaciju zvjezdastih stanica jetre (HSC) koje imaju značajnu ulogu u razvoju fibroze jetre, a ciroza kao završni stadij fibroze jetre, glavni je klinički problem u liječenju HCC-a (Weiskirchen i sur., 2015). KSN je uspješno inhibirao aktivaciju humanih HSC *in vitro* pri koncentraciji od  $5 \mu\text{M}$  KSN-a, a otkriveno je da KSN inhibira fibrozu jetre u eksperimentalnim modelima ozljede jetre (Dorn i sur., 2010b). Dorn i sur. (2012) dokazali su

da oralna primjena KSN-a (500 mg/kg.t.m.) značajno inhibira ekspresiju proupalnih i profibrogenih jetrenih gena. Podaci dobiveni *in vitro* i *in vivo* istraživanjima ukazuju na potencijal KSN-a u sprječavanju razvoja kronične bolesti jetre (uključujući upalu jetre i fibrozu), nastanka i napredovanja HCC-a. Znanstvenim istraživanjima također su dokazani terapijski učinci KSN-a u patogenezi akutne i kronične ozljede jetre (Weiskirchen i sur., 2015). Drugi primarni tumori jetre poput fibrolamelarnog karcinoma, kolangiokarcinoma, hepatoblastoma i angiosarkoma su neuobičajeni ili rijetki. Kolangiokarcinom (engl. *cholangiocarcinoma*, CCA) ili rak epitela žučnih kanala sporo napreduje bez specifičnih simptoma i većina pacijenata kojima je otkriven CCA obično ima uznapredovali neizlječivi stadij. Iako je relativno rijetke incidencije u ukupnoj pojavnosti tumora, po učestalosti se nalazi na drugom mjestu od svih tumora jetre, odmah iza HCC-a. Ovu bolest karakterizira neregulirana proliferacija intrahepatičnih ili ekstrahepatičnih epitelnih stanica koje oblažu žučne kanale. Postoji potencijal za razvoj terapija kroz razumijevanje unutarstaničnih puteva koji će doprinijeti poboljšanju preživljavanja pacijenata oboljelih od CCA (Chung, 2015). KSN je pokazao potencijalno antitumorsko djelovanje *in vitro* na humanim staničnim linijama CCA (M214 i M139) te *in vivo* na modelu atimičnih BALB/c golih miševa. Proliferacija CCA stanica bila je inhibirana pri 20  $\mu$ M i 50  $\mu$ M KSN-a, a oralna primjena 50  $\mu$ M KSN-a u vodi za piće miševima inokuliranim s CCA dovela je do smanjenja rasta tumora (Dokduang i sur., 2016). Walden i sur. (2017) dokazali su da KSN inhibira proliferaciju humanih CCA stanica (CCLP-1, SG-231, CC-SW-1) i inducira apoptozu u modelima *in vitro* i *in vivo*. Inhibicija Notch1 signalizacije značajan je faktor u smanjenju rasta stanica humane stanične linije CCA, a inhibicija Notch-a primjenom KSN-a izazvala je smanjenje fosforilacije Akt već nakon 12 sati tretmana pri koncentracijama KSN-a od 5, 10 i 15  $\mu$ M. Pokazalo se da KSN smanjuje razvoj CCA, a Thongchot i sur. (2019) svojim istraživanjem dokazali su da hiperindukcija autofagije izazvane djelovanjem KSN-a može dovesti do apoptoze HCC stanica.

#### 2.5.3.2. Rak gušterače

Rak gušterače (engl. *pancreatic cancer*, PC) jedna je od najsmrtonosnijih zloćudnih bolesti s ograničenim mogućnostima liječenja. Provedena istraživanja ukazuju na uključenost većeg broja signalnih puteva u razvoj, napredovanje i metastaziranje PC-a. Avila i Kissil (2013) dokazali su da Notch1 signalizacija igra važnu ulogu u staničnoj diferencijaciji, proliferaciji i preživljavanju stanica PC-a. Antiproliferativni učinak KSN-a na humane stanične linije PC-a (AsPC-1, PANC-1 i MIA PaCa-2) uočen je pri koncentracijama 5 – 30  $\mu$ M tijekom 48 sati, a također je zabilježeno da KSN uspješno inhibira Notch1 signalni put (Kunnimalaiyaan i sur.,

2015b). Jiang i sur. (2015) istraživali su učinke KSN-a na proliferaciju i tumorigenezu PC-a *in vitro* na humanim staničnim linijama PC-a (PANC1 i BxPC-3) te *in vivo*. Primjena KSN-a u dozama 10 – 50  $\mu\text{M}$  uzrokovala je inhibiciju proliferacije obje stanične linije, a morfološke promjene PC stanica uočene su pri visokim dozama KSN-a (50 – 100  $\mu\text{M}$ ). *In vivo* istraživanje provedeno na modelu miša kojem su subkutano injektirane PANC-1 stanice, a koji su zatim tretirani sa KSN-om u dozi od 25 mg/kg.t.m./dan, rezultiralo je inhibicijom proliferacije PANC-1 stanica. Sukladno rezultatima KSN ima značajan potencijal da postane terapijsko rješenje u borbi protiv PC-a (Jiang i sur., 2015). Saito i sur. (2018) proučavali su ulogu NF- $\kappa$ B u angiogenezi PC-a, ključnog transkripcijskog faktora uključenog u proces rasta i metastaziranje tumora, te utjecaj KSN-a na aktivaciju NF- $\kappa$ B. Najprije su ispitali potencijalne antiproliferativne učinke KSN-a *in vitro* na humanim staničnim linijama PC-a (BxPC-3, AsPC-1 i MIA PaCa-2), a pri koncentracijama KSN-a < 10  $\mu\text{M}$  došlo je do značajne inhibicije proliferacije u sve tri stanične linije. Za određivanje učinaka KSN-a primjenom *in vivo*, Saito i sur. (2018) razvili su model BxPC3 potkožnog ksenotransplantata na golim miševima. Nakon što su se tumori razvili, KSN (10 mg/kg.t.m./tjedan) je apliciran intraperitonealnom injekcijom tijekom 5 tjedana te je značajno inhibirao rast tumora 21 dan nakon tretmana. KSN je uspješno inhibirao angiogenezu PC-a inhibicijom aktivacije NF- $\kappa$ B *in vitro* i *in vivo*, a supresija NF- $\kappa$ B signalizacije uzrokovala je smanjenje produkcije glavnih angiogenih čimbenika VEGF i IL-8 (Saito i sur., 2018).

#### 2.5.3.3. Rak debelog crijeva

Rak debelog crijeva (engl. *colorectal cancer*, CRC) pokazuje visok stupanj oboljelih i veliku smrtnost, a s obzirom na oralni unos KSN-a, odnosno izravnu izloženost gastrointestinalnog trakta, ovaj spoj predstavlja veliki interes u liječenju raka debelog crijeva (Sastre-Serra i sur., 2019). Antiproliferativno djelovanje KSN-a na humanu staničnu liniju CRC-a (HCT 116) *in vitro* potvrđeno je aktivacijom kaspaza te indukcijom ekspresije obitelji Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) proteina (Pan i sur., 2005). KSN je uspješno inhibirao proliferaciju stanične linije CRC-a ovisno o dozi i trajanju izloženosti, odnosno vrijednosti  $\text{IC}_{50}$  smanjivale su se povećanjem vremena inkubacije ( $\text{IC}_{50}$  iznosio je 4,1  $\mu\text{M}$ , 3,6  $\mu\text{M}$  i 2,6  $\mu\text{M}$  nakon 24, 48 odnosno 72 sata). Rezultati ukazuju da indukcija apoptoze uzrokovana smanjenjem razine Bcl-2 proteina i aktivacijom kaskade kaspaza može doprinijeti kemopreventivnom i terapijskom potencijalu KSN-a (Pan i sur., 2005). Hudcová i sur. (2014) istraživali su učinke KSN-a na humanim staničnim linijama CRC-a (HT-29 i SW620) te je potvrđeno da KSN inhibira

proliferaciju stanica. Sastre-Serra i sur. (2019) također su potvrdili antiproliferativno djelovanje KSN-a na SW620 staničnu liniju. Primjenom KSN-a pri koncentracijama 1 – 10  $\mu\text{M}$  uspješno je inhibirana stanična proliferacija, a primjenom tijekom 48 sati došlo je do značajnog povećanja proizvodnje ROS-a (Sastre-Serra i sur., 2019). Deregulacija glikolize česta je pojava u humanom CRC-u, a Liu i sur. (2019) izvijestili su o prekomjernoj ekspresiji heksokinaze 2 (HK2) u humanim CRC tkivima i staničnim linijama (HT29 i HCT116) te pretpostavili da blokiranje HK2 inhibira staničnu proliferaciju i rast tumora ksenografta. Primjena KSN-a u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$  uzrokovala je inhibiciju proliferacije CRC staničnih linija, a antiproliferativno djelovanje potvrđeno je i smanjenjem rasta tumora *in vivo* na modelu atimičnih golih miševa kojima su subkutano ubrizgane HT29 i HCT116 stanice. Rezultati su pokazali da je prosječna veličina tumora u kontrolnoj skupini bila  $442 \pm 102 \text{ mm}^3$ , dok je prosječna veličina tumora u skupini liječenoj KSN-om bila  $278 \pm 53 \text{ mm}^3$  (Liu i sur., 2019). Supresija HK2 pokazala se kao glavni mehanizam djelovanja KSN-a, te je samim time potencijalna molekularna meta u kliničkoj prevenciji i liječenju CRC-a. Scagliarini i sur. (2020) dokazali su da KSN uzrokuje apoptozu u humanim staničnim linijama CRC-a (SW480, SW620 i HT29), na način ovisan o vremenu i koncentraciji te da bi koncentracije KSN-a ispod vrijednosti  $\text{IC}_{50}$  mogle inducirati apoptozu i pojačati odgovor na oštećenje DNA.

#### 2.5.4. Ksantohumol i maligne bolesti reproduktivnog sustava

##### 2.5.4.1. Rak dojke

Rak dojke jedna je od najčešćih neoplazmi među ženama, s visokim stupnjem oboljelih i smrtnosti, te je povezan s djelovanjem hormonalnih disruptora kao relevantnih čimbenika rizika za razvoj raka dojke. Modaliteti liječenja raka dojke uključuju operaciju, kemoterapiju te hormonsku terapiju i terapiju zračenjem. Neuspješnost izlječenja raka dojke uzrokovana je razvojem rezistentnosti stanica raka na apoptozu izazvanu lijekovima, što uzrokuje progresiju raka u invazivne i metastatske fenotipove (Kang i sur., 2013). Identificirani su potencijalni mehanizmi antikarcinogenog djelovanja KSN-a, uključujući inhibiciju inicijacije i razvoja karcinogeneze, indukciju apoptoze i inhibiciju angiogeneze raka dojke, te potencijalna upotreba KSN-a kao senzibilizatora kemoterapije i radioterapije (Kang i sur. 2013). Soares i sur. (2003) istraživali su ulogu  $17\beta$ -estradiola (E2), predominantnog estrogena u regulaciji nekoliko signalnih puteva u staničnim linijama raka dojke, te je zaključeno da je alkalna fosfataza (ALP) jedan od gena koji može biti moduliran posredstvom E2. ALP defosforilira proteine uključene u rast i diferencijaciju stanica, apoptozu i migraciju stanica (Guerreiro i sur., 2007), a estrogeni djeluju na ekspresiju ALP gena u staničnim linijama raka vrata maternice i dojke, modulirajući

transkripciju ciljnih gena. Povećana ekspresija ALP-a u stanicama raka sugerira da bi ovaj enzim mogao biti uključen u karcinogenezu (Yager i Davidson, 2006). Djelovanje KSN-a na humanu staničnu liniju raka dojke (MCF-7) ovisnu o estrogenu, uzrokovalo je smanjenje proliferacije stanica. Utjecaj KSN-a na modulaciju ALP-a može biti relevantan za razvoj terapijskih i preventivnih strategija protiv raka dojke (Guerreiro i sur., 2007). Monteiro i sur. (2008) dokazali su antiproliferativne učinke KSN-a *in vitro* koristeći MCF-7 staničnu liniju, te *in vivo* oralnom primjenom KSN-a koristeći ksenotransplantate raka dojke u golim miševima. KSN je inhibirao proliferaciju MCF-7 stanica primjenom u koncentracijama 1 – 100  $\mu\text{M}$  tijekom 24 i 72 sata, ovisno o dozi i vremenu izloženosti. Pri koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  KSN-a tijekom 24 sata došlo je do smanjenja sinteze DNA. Oralno apliciran KSN miševima koji su prethodno inokulirani MCF-7 stanicama rezultirala je središnjom nekrozom unutar tumora, smanjenim brojem upalnih stanica, povećanim postotkom apoptotičkih stanica i smanjenom gustoćom mikrožila, te je otkriveno značajno smanjenje ekspresije i aktivnosti NF- $\kappa\text{B}$  u tumorima dojke kod miševa tretiranih KSN-om (Monteiro i sur., 2008). Kim i sur. (2013) dokazali su inhibicijsko djelovanje KSN-a na rast i invazivnost tumorskih stanica na humanim staničnim linijama MDA-MB-231 ( $\text{IC}_{50}$  iznosi 6,7  $\mu\text{M}$ ) i Hs578T ( $\text{IC}_{50}$  iznosi 4,78  $\mu\text{M}$ ). Yoo i sur. (2014) promatrali su učinak KSN-a na stanični rast MDA-MB-231 stanica tijekom 48 sati. Došlo je do smanjenja staničnog rasta, a udio preživjelih stanica tretiranih s 10 i 20  $\mu\text{M}$  KSN-a značajno se smanjio za  $64,7 \pm 1,8 \%$  odnosno  $40,1 \pm 1,8 \%$ . Jedna od klinički učinkovitih strategija liječenja raka dojke uključuje kemoterapiju primjenom doksorubicina (DOX), međutim učinkovitost DOX-a ograničena je njegovim nuspojavama i stvaranjem rezistencije, što je glavni razlog neuspjeha liječenja raka dojke (Tang i sur., 2016). Liu i sur. (2016) istraživali su osjetljivost humane stanične linije raka dojke MCF-7 i MCF-7/ADR-linije rezistentne na DOX primjenom KSN-a. Ispitan je učinak KSN-a na inhibiciju rasta, a dobiveni rezultati pokazuju da je primjena KSN-a u koncentracijama 5 – 25  $\mu\text{M}$  smanjila staničnu proliferaciju i vijabilnost obje stanične linije ovisno o koncentraciji i vremenu. Sposobnost KSN-a da inhibira proliferaciju stanica raka dojke, zaustavi stanični ciklus te inducira apoptozu *in vitro* potvrđena je na MCF-7 i MDA-MB-231 staničnim linijama (Sun i sur., 2018). U usporedbi s drugim obećavajućim fenolnim spojevima, kao što su resveratrol ( $\text{IC}_{50}$  iznosi 100  $\mu\text{M}$ ) ili kurkumin ( $\text{IC}_{50}$  iznosi 35  $\mu\text{M}$ ), KSN pokazuje mnogo veći antiproliferativni učinak na MCF-7 stanice (Roehrer i sur., 2019).

#### 2.5.4.2. *Rak grlića maternice*

Prema dostupnim podacima, 99,7 % svih tumora grlića maternice nastaje kao posljedica infekcije humanim papiloma virusom (HPV), posebice HPV-16 i HPV-18, koje je Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) identificirala kao visokorizične karcinogene agense. HPV utječe na tjelesne stanice integracijom s genomom domaćina i inducirajući staničnu deregulaciju (npr. povećana sinteza DNA, proliferacija stanica i stanični odgovor na faktore rasta i diferencijacije) što na kraju dovodi do razvoja raka grlića maternice (Gómez i Santos, 2007). Yong i Malek (2015) dokazali su potencijalno antitumorsko djelovanje KSN-a koristeći humanu staničnu liniju raka grlića maternice – CaSki. Rezultati su pokazali inhibiciju vijabilnosti stanica povećanjem doze KSN-a i vremenom tretmana stanica. KSN je inducirao apoptozu i smanjio staničnu proliferaciju CaSki stanica. Rezultati su pokazali da stanična smrt uzrokovana KSN-om može uključivati intrinzične i ekstrinzične apoptotske putove kao i zaustavljanje stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa te dokazuju da je KSN moćan kemoterapijski kandidat za liječenje raka grlića maternice.

#### 2.5.4.3. *Rak jajnika*

Rak jajnika najsmrtonosniji je ginekološki malignitet. Zbog nemogućnosti ranog otkrivanja, većina slučajeva raka jajnika otkriva se tek u visokom stadiju što rezultira niskom stopom izlječenja od samo 15 – 20 %, stoga je ključno identificirati alternativne strategije liječenja (Watts i sur., 2008). Antiproliferativno djelovanje flavonoida hmelja, uključujući KSN, dokazano je na humanoj staničnoj liniji raka jajnika (A-2780), a KSN je uspješno inhibirao proliferaciju A-2780 stanica pri koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  (Miranda i sur., 1999). Drenzek i sur. (2011) proveli su istraživanje potencijalnog antitumorskog djelovanja KSN-a na humanim staničnim linijama raka jajnika (SKOV3 i OVCAR3). Tijekom šest dana SKOV3 stanice tretirane su KSN-om, a 4. i 6. dana uočena je značajna inhibicija stanične proliferacije pri 20  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$  KSN-a. Tretman OVCAR3 stanica KSN-om rezultirao je značajnom inhibicijom rasta 4. i 6. dana pri 10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$ . Otkrivena je visoka ekspresija Notch1 u tumorima jajnika, a pokazalo se da KSN inhibira rast i smanjuje transkripciju Notch1 i ekspresiju proteina. Dobiveni rezultati pokazali su da primjenom KSN-a dolazi do aktivacije apoptotičkih mehanizama, a s obzirom da je Notch1 signalizacija aktivna kod raka jajnika, predstavlja obećavajući put za definiranje novi terapijskih meta u liječenju raka jajnika (Drenzek i sur., 2011).

#### 2.5.4.4. Rak prostate

Rak prostate (engl. *prostate cancer*, CaP) predstavlja značajan zdravstveni problem za muškarce diljem svijeta zbog slabog napretka u smanjenju stope oboljenja, a sve važniji cilj istraživanja je identifikacija i upotreba novih spojeva za prevenciju raka. Koristeći humanu staničnu liniju adenokarcinoma prostate (PC-3) Colgate i sur. (2007) dokazali su antitumorsko djelovanje KSN-a u koncentraciji od 20  $\mu\text{M}$ . Pri istoj koncentraciji zabilježena je i inhibicija stanične proliferacije stanica benigne hiperplazije prostate (BPH-1). Utvrđeno je da KSN značajno inhibira vijabilnost i proliferaciju stanica, te da inhibicija NF- $\kappa$ B i indukcija apoptoze mogu biti mehanizam kojim KSN djeluje antiproliferativno u hiperplaziji prostate, te kemopreventivno u liječenju ranih stadija CaP-a (Colgate i sur., 2007). Deeb i sur. (2010) dokazali su antitumorsko djelovanje KSN-a. Primjenom 40  $\mu\text{M}$  KSN-a dokazali su inhibiciju proliferacije i indukciju apoptoze u humanoj CaP staničnoj liniji osjetljivoj na hormone (LNCaP) te hormonsko-refraktornim (neosjetljivim na hormone) humanim CaP staničnim linijama (C4-2, PC-3 i DU-145). Vene i sur. (2012) također su proveli istraživanje djelovanja KSN-a *in vitro* koristeći DU-145 i PC-3 stanice, te *in vivo* na modelu adenokarcinoma prostate TRAMP transgenih miševa. Primjenom KSN-a u koncentracijama od 5 i 10  $\mu\text{M}$  došlo je do inhibicije stanične proliferacije nakon 96 sati ( $\text{IC}_{50}$  za KSN-a na DU-145 iznosio je 6,9  $\mu\text{M}$ , dok je za PC-3 stanice iznosio 9,8  $\mu\text{M}$ ). Antitumorsko djelovanje KSN-a uključuje inhibiciju staničnog rasta i pokretljivosti stanica, a *in vivo* primjena rezultirala je utjecajem na smanjenje prosječne težine urogenitalnog trakta, odgađanjem napredne progresije tumora i inhibicijom rasta slabo diferenciranog CaP-a. Kratkotrajnom primjenom KSN-a *in vitro* došlo je do smanjenja fosforilacije Akt i aktivnosti NF- $\kappa$ B, koji *in vivo* može specifično inhibirati proliferaciju uznapredovalih tumora prostate. Aktivacija Akt puta daje stanicama raka prednost u preživljavanju i rastu putem pozitivne regulacije NF- $\kappa$ B, povećane invazivnosti i interferencije s apoptozom. Provedenim istraživanjem *in vitro* otkriveno je da bi KSN kao inhibitor Akt/NF- $\kappa$ B mogao postati novo terapijsko sredstvo za inhibiciju razvoja, progresije i metastaziranja raka prostate (Vene i sur., 2012). Apoptotičko i citotoksično djelovanje KSN-a na CaP dokazali su Klosek i sur. (2016) koristeći androgen osjetljivu humanu LNCaP staničnu liniju. Rezultati su pokazali da KSN pojačava citotoksične i apoptotske učinke TRAIL-a (engl. *tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand* TRAIL) *in vitro* te sugeriraju da je KSN spoj koji ima potencijal za upotrebu u kemoprevenciji raka prostate zbog njegove senzibilizacije stanica raka na apoptozu posredovanu TRAIL-om.

## 2.5.5. Ksantohumol i maligne bolesti glave i vrata

### 2.5.5.1. Glioblastom

Glioblastom (engl. *glioblastoma*, GBM) najčešći je tumor središnjeg živčanog sustava kod ljudi. Pokazuje izraženu proliferaciju, otpornost na apoptozu i robusnu angiogenezu, što ga čini vrlo agresivnim i invazivnim. Trenutne mogućnosti liječenja uključuju operaciju, terapiju zračenjem i kemoterapiju, ali nemaju značajan doprinos povećanju stope izlječenja (Sathornsumetee i Rich, 2008). Glavna ograničenja kemoterapije za liječenje GBM-a su nemogućnost mnogih lijekova da prođu krvno-moždanu barijeru i njihova niska učinkovitost u indukciji apoptoze. Stoga je izbor učinkovitih lijekova ograničen, a hitno su potrebne nove terapijske strategije. Sve je više dokaza da nekoliko prirodnih spojeva iz biljaka mogu biti korisni kemoterapeutski ili kemopreventivni agensi protiv raka, te postoje jasni dokazi da strukturno različiti flavonoidi mogu proći krvno-moždanu barijeru (Youdim i sur., 2004). Pokazalo se da je KSN potencijalni kandidat za regulaciju upalnih odgovora u mozgu, pokazujući protuupalno djelovanje u mikroglialnim BV2 stanicama (Lee i sur., 2011). Festa i sur. (2011) proučavali su mehanizam kojim KSN-a inducira apoptozu u stanicama humanog GBM-a. Dokazali su da KSN inhibira staničnu proliferaciju koristeći dvije stanične linije humanog GBM-a (T98G i U-87 MG) primjenom KSN-a u različitim koncentracijama tijekom 48 sati, a 70 %-tno smanjenje vijabilnosti stanica obje stanične linije zabilježeno je pri 50  $\mu\text{M}$  KSN-a. Također, pokazali su da KSN inducira depolarizaciju mitohondrija inhibirajući ekspresiju Bcl-2 i posljedično uzrokujući otpuštanje citokroma c u citosol. KSN je uzrokovao povećanje proizvodnje ROS-a, što se pokazalo značajno u induciranju apoptoze i aktiviranju mitohondrijskog puta (Festa i sur., 2011). U dodatnom istraživanju KSN je pokazao izraženiji učinak na T98G stanice visokog stupnja malignosti, u odnosu na U-87 MG stanice (Festa i sur., 2013). Deregulacija aerobne glikolize i visoka ekspresija HK2 karakteristične su za velik broj tumorskih stanica, uključujući GBM, što dovodi do olakšane proliferacije, migracije i invazije tumorskih stanica (Smith, 2000). Dokazano je da GBM stanice energiju proizvode prvenstveno procesom glikolize umjesto oksidacijskom fosforilacijom, a inhibicija glikolize se predlaže kao obećavajuća opcija liječenja GBM-a (Masui i sur., 2013). Yuan i sur. (2020) istraživali su potencijalno antitumorsko djelovanje KSN-a *in vitro* koristeći GBM stanice (U-87 MG, T98G i LN-229) putem izravne inhibicije glikolize te *in vivo* koristeći mišji model ksenografta. KSN je inhibirao staničnu proliferaciju GBM stanica već pri 2  $\mu\text{M}$ , smanjio razine HK2 u mitohondrijskim frakcijama primjenom 5  $\mu\text{M}$  KSN-a, te djelovao na inhibiciju glikolize. Antitumorsko djelovanje KSN-a *in vivo* dokazali su koristeći mišji model ksenografta



subkutanom primjenom LN-229 i U-87 stanica u desni bok atimičnih ženskih miševa. Kada je veličina tumora dosegla oko 100 mm<sup>3</sup>, subkutano je primijenjen KSN (10 mg/kg.t.m./dan). Primjena KSN-a značajno je smanjila veličinu tumora. KSN pokazuje antitumorsko djelovanje na način da smanjuje razinu HK2 i povećava apoptozu u GBM stanicama djelovanjem na proces glikolize (Yuan i sur., 2020).

#### 2.5.5.2. Rak štitnjače

Medularni rak štitnjače (engl. *medullary thyroid cancer*, MTC) predstavlja neuroendokrini tumor (NET) koji potječe od C stanica štitnjače koje proizvode kalcitonin i čini 3 – 5 % svih slučajeva raka štitnjače (Hahm i sur., 2001). Cook i sur. (2010) zabilježili su značajnu inhibiciju proliferacije humane MTC stanične linije primjenom 20 i 30 μM KSN-a nakon 4 dana primjene, te pri svim dozama KSN-a nakon 6 dana, ukazujući na potencijalno antitumorsko djelovanje KSN-a. S obzirom na relativnu netoksičnost, KSN se pokazao kao dobar kandidat za dodatna pretklinička istraživanja liječenja MTC-a (Cook i sur., 2010). Papilarni rak štitnjače (engl. *papillary thyroid carcinoma*, PTC) najčešći je tip raka štitnjače koji čini približno 80 % svih tumora štitnjače. TPC-1 je visoko proliferativna stanična linija izvedena iz PTC-a, s visokim stupnjem diferencijacije (Trovisco i sur., 2007) koja se pokazala kao izvrstan model za analizu signalnih puteva uključenih u karcinogenezu štitnjače (Pilli i sur., 2009). Carvalho i sur. (2018) istraživali su antiproliferativno i citotoksično djelovanje KSN-a *in vitro*, koristeći staničnu liniju TPC-1, a do značajne inhibicije proliferacije stanica došlo je primjenom KSN-a u koncentraciji od 10 μM tijekom 48 sati, dok je citotoksični učinak zabilježen pri 100 μM KSN-a. Smanjenjem postotka stanica u G<sub>1</sub> fazi i povećanju stanica u S fazi dokazano je da KSN djeluje na zaustavljanje staničnog ciklusa te da može inducirati aktivnost kaspaze-3 i kaspaze-7 u TPC-1 stanicama, što je ključan faktor u inhibiciji proliferacije stanica raka štitnjače (Carvalho i sur., 2018).

#### 2.5.5.3. Rak grkljana

Rak pločastih stanica grkljana (engl. *laryngeal squamous cell carcinoma*, LSCC) najčešći je maligni tumor glave i vrata u svijetu (Lionello i sur., 2012). Učinkoviti tretmani raka imaju za cilj uništiti većinu diferenciranih tumorskih stanica, kao i tumorskih matičnih stanica, koje imaju potencijal za proliferaciju i diferencijaciju. Međutim, tradicionalne terapije, uključujući radioterapiju, kemoterapiju i imunoterapiju, uništavaju diferencirane tumorske stanice, ali ne i tumorske matične stanice, što rezultira razvojem otpornosti tumorskih stanica na liječenje i vraćanjem bolesti (Yu i sur., 2013). Sławińska-Brych i sur. (2015) ispitivali su moguće učinke

i molekularne mehanizme antitumorskog djelovanja KSN-a na rak pločastih stanica grkljana. Rezultati su pokazali da je KSN inducirao apoptozu u RK33 stanicama primjenom 1  $\mu\text{M}$  KSN-a, a u RK45 stanicama pri koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$  nakon 48 sati inkubacije. Također su ispitali utjecaj KSN-a na proliferaciju nemalignih fibroblasta ljudske kože (HSF) i oligodendrocita štakora (OLN93), a te su stanice bile manje osjetljive na djelovanje KSN-a u usporedbi sa tumorskim stanicama. Selektivno djelovanje na stanice pokazalo se kao bitno svojstvo u prepoznavanja KSN-a kao potencijalnog antitumorskog sredstva (Sławińska-Brych i sur., 2015). Zabilježeno je da KSN inhibira staničnu proliferaciju i inducira promjene u distribuciji stanica u staničnom ciklusu LSCC stanica što sugerira da bi učinak KSN-a mogao biti povezan s inhibicijom progresije staničnog ciklusa. Li i sur. (2016) dokazali su inhibiciju stanične proliferacije primjenom KSN-a u koncentracijama 30 – 50  $\mu\text{M}$  tijekom 24, 48 i 72 sata koristeći humanu staničnu liniju SCC-4 (rak pločastih stanica jezika). Rezultati su pokazali da je tretman sa 30 i 40  $\mu\text{M}$  KSN-a tijekom 48 sati značajno inducirao apoptozu stanica SCC-4 u usporedbi s kontrolom. Zatim su istraživali učinak KSN-a na aktivnost kaspaze u LSCC stanicama. Rezultati su pokazali da se aktivnost kaspaze-3, -8 i -9 značajno povećala nakon tretmana sa 30 i 40  $\mu\text{M}$  KSN-a. Dokazano je da KSN može uzrokovati inhibiciju proliferacije i indukciju apoptoze, ali su potrebna opsežnija istraživanja koja će pokazati stvarni potencijal KSN-a u liječenju raka grkljana (Li i sur., 2016).

#### 2.5.6. Ksantohumol i melanom

Melanom je zloćudni tumor melanocita, stanica koje stvaraju melanin, a koje su prisutne u koži, oku te epitelu sluznica i moždanih ovojnica. Pripada skupini najagresivnijih i najrezistentnijih humanih tumora te je najbrže rastuća vrsta solidnog raka koji je obično uzrokovan prevelikim izlaganjem sunčevom ultraljubičastom zračenju (Schadendorf i sur., 2018). Melanin je jedinstveni pigmentirani biopolimer koji sintetiziraju melanociti, a pokazalo se da ima značajnu ulogu u progresiji melanoma. Koo i sur. (2008) istraživali su melanogenezu izazvanu izobutylmetilksantinom (IBMX) koristeći stanice melanoma B16, a KSN je inhibirao melanogenezu. Značajna inhibicija stanica uočena je pri 0,5  $\mu\text{M}$  KSN-a, uz nisku citotoksičnost pri učinkovitim koncentracijama. KSN je smanjio ekspresiju proteina i mRNA transkripcijskog faktora povezanog s mikroftalmijom (MITF), glavnog regulatora transkripcije ključnih melanogenih enzima. KSN bi mogao djelovati kao hipopigmentirajući agens kroz smanjenje MITF-a u cAMP-ovisnom melanogenom putu (Koo i sur., 2008). Zhang i sur. (2020) istraživali su potencijalno antitumorsko djelovanje KSN-a koristeći staničnu liniju mišjeg melanoma B16-F10. Otkrili su da KSN inducira apoptozu putem aktivacije ER-stresa te inhibira staničnu

proliferaciju, zajedno s regulacijom proteinske kinaze aktivirane mitogenom. Agresivnost melanoma veže se uz njegov visoki metastatski potencijal, a jetra je jedno od najčešćih mjesta za visceralne metastaze. Unatoč nedavnom napretku u terapiji melanoma, prognoza za metastazirani melanom i dalje je loša (Tas, 2012). Seitz i sur. (2021) istraživali su funkcionalne učinke KSN-a koristeći humane stanične linije melanoma (Mel Ju i Mel Im) te *in vivo* koristeći singenični model metastaza melanoma u jetri C57/BL6 miševa. Citotoksične učinke *in vitro* KSN je pokazao u rasponu doza 40 – 60  $\mu\text{M}$ , te je inhibirao procese ključne za rast tumora i metastaze. Makroskopska analiza pokazala je manje metastaza na površini jetre miševa tretiranih sa KSN-om. Težina jetre bila je značajno niža kod tretiranih miševa. Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da KSN djeluje antiproliferativno *in vitro* na stanice melanoma te da značajno inhibira *in vivo* rast metastaza melanoma u jetri, čineći ga potencijalnim sredstvom u liječenju melanoma (Seitz i sur., 2021).

### 3. ZAKLJUČAK

Brojni biljni metaboliti prepoznati su kao potencijalno bioaktivni spojevi, a posljednjih nekoliko godina KSN je postao predmetom brojnih istraživanja koja su potvrdila njegov pozitivan učinak na ljudsko zdravlje.

1. Bioraspoloživost oralno primijenjenog KSN-a pokazala se niskom, a MTD za KSN iznosi više od 1000 mg/kg.t.m./dan. *In vivo* i *in vitro* studije nisu zabilježile štetne učinke KSN-a.
2. Bioaktivno djelovanje KSN-a se povezuje uz njegov visoki antioksidacijski potencijal, odnosno sposobnost uklanjanja i inhibiciju proizvodnje slobodnih radikala.
3. Djelovanjem na aktivaciju, migraciju i invaziju endotelnih stanica, KSN se pokazao kao snažna antiangiogena tvar u *in vitro* te *in vivo* studijama.
4. KSN može inhibirati stvaranje genotoksičnih metabolita te inducirati detoksikaciju reaktivnih metabolita. Ističu se antivirusna i antifungalna svojstva KSN-a, a interferencijom prenilne skupine s plazmatskom membranom stanica KSN pokazuje antibakterijska svojstva.
5. Antitumorsko djelovanje KSN-a dokazano je primjenom različitih tumorskih stanica *in vitro* te u *in vivo* modelima. KSN inhibira proliferaciju i vijabilnost tumorskih stanica, angiogenezu te invaziju i metastaziranje različitih tumorskih stanica. Uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa i inducira apoptozu u tumorskim stanicama modulacijom različitih onkogenih signalnih puteva.
6. Iako KSN pokazuje visoki terapijski potencijal u dosadašnjim istraživanjima, potrebno je provesti opsežnije testove bioraspoloživosti KSN-a i njegovih metabolita, te ispitati farmakokinetičke i farmakodinamičke parametre kako bi se omogućila daljnja preklinička istraživanja potencijalne upotrebe KSN-a kao terapijskog sredstva.

## 4. LITERATURA

- Albini A, Dell'Eva R, Vené R, Ferrari N, Buhler DR, Noonan DM, i sur. (2006) Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. *Faseb J* **20**, 527–529. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5128fje>
- Almaguer C, Schönberger C, Gastl M, Arendt EK, Becker T (2014) *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. *J Inst Brew* **120**, 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Alonso-Esteban JI, Pinela J, Barros L, Ćirić A, Soković M, Calhella RC, i sur. (2019) Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) seeds. *Ind Crop Prod* **143**, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.001>
- Arsene AL, Rodino S, Butu A, Petrache P, Iordache O, Butu M (2015) Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of *Humulus lupulus*. *Farmacia* **63**, 851–857.
- Avila JL, Kissil JL (2013) Notch signaling in pancreatic cancer: oncogene or tumor suppressor? *Trends Mol Med* **19**, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.003>
- Bartmanska A, Wałęcka-Zacharska E, Tronina T, Popłonski J, Sordon S, Brzezowska E, i sur. (2018) Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules* **23**, 2059. <https://doi.org/10.3390/molecules23082059>
- Benelli R, Venè R, Ciarlo M, Carlone S, Barbieri O, Ferrari N (2012) The AKT/NF-κB inhibitor xanthohumol is a potent anti-lymphocytic leukemia drug overcoming chemoresistance and cell infiltration. *Biochem Pharmacol* **83**, 1634–1642. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.03.006>
- Biendl M (2009) Hops and health. *Tech Q Master Brew Assoc Am* **46**, 1–7. <https://doi.org/10.1094/TQ-46-2-0416-01>
- Bohr G, Gerhäuser C, Knauft J, Zapp J, Becker H (2005) Anti-inflammatory acylphloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). *J Nat Prod* **68**, 1545–1548. <https://doi.org/10.1021/np050164z>
- Bremer B, Bremer K, Chase MW, Reveal JL, Soltis DE, Soltis PS, i sur. (2003) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc* **141**, 399–436. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>

- Buckwold VE, Wilson RJH, Nalca A, Beer BB, Voss TG, Turpin JA, i sur. (2004) Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. *Antivir Res* **61**, 57–62. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(03\)00155-4](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(03)00155-4)
- Caplin M, Chen L (2020) The Potential Role of Xanthohumol in SARS-CoV-2 Treatment—Globally Accessible and Economically Viable. *Nutr Diet Suppl* **12**, 201–204. <https://doi.org/10.2147/NDS.S265857>
- Carvalho DO, Freitas J, Nogueira P, Henriques SN, Carmo AM, Castro MA, i sur. (2018) Xanthohumol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human thyroid cells. *Food Chem Toxicol* **121**, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.021>
- Cermak P, Olsovska J, Mikyska A, Dusek M, Kadleckova Z, Vanicek J, i sur. (2017) Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria. *APMIS* **125**, 1033–1038. <https://doi.org/10.1111/apm.12747>
- Chattopadhyay D (2010) *Ethnomedicine: A source of complementary therapeutics* [online], Research Signpost, Beliaghata, Kolkata, <[https://issuu.com/researchsignpost/docs/chattopadhyay\\_book](https://issuu.com/researchsignpost/docs/chattopadhyay_book)>. Pristupljeno 07. prosinca 2021.
- Cho YC, Kim HJ, Kim YJ, Lee KY, Choi HJ, Lee IS, i sur. (2008) Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN-gamma and LPS-activated macrophages. *Int Immunopharmacol* **8**, 567–573. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.12.017>
- Chung V (2015) Systemic therapy for hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* **24**, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2014.09.009>
- Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM, Ho E (2007) Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett* **246**, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.02.015>
- Cook MR, Luo J, Ndiaye M, Chen H, Kunnimalaiyaan M (2010) Xanthohumol inhibits the neuroendocrine transcription factor achaete-scute complex-like 1, suppresses proliferation, and induces phosphorylated ERK1/2 in medullary thyroid cancer. *Am J Surg* **199**, 315–318. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2009.08.034>
- Deeb D, Gao X, Jiang H, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC (2010) Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops, in human prostate cancer cells. *Anticancer Res* **30**, 3333–3339.

- Dell'Eva R, Ambrosini C, Vannini N, Piaggio G, Albini A, Ferrari N (2007) AKT/NF-kappaB inhibitor xanthohumol targets cell growth and angiogenesis in hematologic malignancies. *Cancer* **110**, 2007–2011. <https://doi.org/10.1002/cncr.23017>
- Dokduang H, Yongvanit P, Namwat N, Pairojkul C, Sangkhamanon S, Yageta MS, i sur. (2016) Xanthohumol inhibits STAT3 activation pathway leading to growth suppression and apoptosis induction in human cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep* **35**, 2065–2072. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4584>
- Dorn C, Weiss TS, Heilmann J, Hellerbrand C (2010a) Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits proliferation, migration and interleukin-8 expression of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* **36**, 435–441. [https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000517](https://doi.org/10.3892/ijo_00000517)
- Dorn C, Kraus B, Motyl M, Weiss TS, Gehrig M, Scholmerich J, i sur. (2010b) Xanthohumol, a chalcone derived from hops, inhibits hepatic inflammation and fibrosis. *Mol Nutr Food Res* **54**, 205–213. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900314>
- Dorn C, Heilmann J, Hellerbrand C (2012) Protective effect of xanthohumol on toxin-induced liver inflammation and fibrosis. *Int J Clin Exp Pathol* **5**, 29–36. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1295738>
- Drenzek JG, Seiler NL, Jaskula-Sztul R, Rausch MM, Rose SL (2011) Xanthohumol decreases Notch1 expression and cell growth by cell cycle arrest and induction of apoptosis in epithelial ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* **122**, 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.04.027>
- Festa M, Capasso A, D'acunto CW, Masullo M, Rossi AG, Pizza C, i sur. (2011) Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways. *J Nat Prod* **74**, 2505–2513. <https://doi.org/10.1021/np200390x>
- Festa M, Caputo M, Cipolla C, D'Acunto C, Rossi A, Tecce M, i sur. (2013) The involvement of xanthohumol in the expression of annexin in human malignant glioblastoma cells. *Open Biochem J* **7**, 1–10. <https://doi.org/10.2174/1874091X01307010001>
- Gao X, Deeb D, Liu Y, Gautam S, Dulchavsky SA, Gautam SC (2009) Immunomodulatory activity of xanthohumol: Inhibition of T cell proliferation, cell-mediated cytotoxicity and Th1 cytokine production through suppression of NF-kappaB. *Immunopharm Immunot* **31**, 477–484. <https://doi.org/10.1080/08923970902798132>

Gerhäuser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, i sur. (2002) Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* **1**, 959–969.

Gerhäuser C, Hussong R, Bertl E, Klimo K, Frank N, Bartsch H, i sur. (2006) Cancer chemopreventive and anti-angiogenic activities of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.). *Eur J Cancer Suppl* **4**, 56. [https://doi.org/10.1016/s1359-6349\(06\)80542-2](https://doi.org/10.1016/s1359-6349(06)80542-2)

Girisa S, Saikia Q, Bordoloi D, Banik K, Monisha J, Daimary UD, i sur. (2021) Xanthohumol from Hop: Hope for cancer prevention and treatment. *IUBMB Life* **73**, 1016–1044. <https://doi.org/10.1002/iub.2522>

Gómez DT, Santos JL (2007) Human papillomavirus infection and cervical cancer: pathogenesis and epidemiology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (Mendez-Vilas A, ur.). Formatex Research Center, Badajoz, Spain, str. 680–688.

Guerreiro S, Monteiro R, Martins MJ, Calhau C, Azevedo I, Soares R (2007) Distinct modulation of alkaline phosphatase isoenzymes by 17betaestradiol and xanthohumol in breast cancer MCF-7 cells. *Clin Biochem* **40**, 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.09.012>

Hahm JR, Lee MS, Min YK, Lee MK, Kim KW, Nam SJ, i sur. (2001) Routine measurement of serum calcitonin is useful for early detection of medullary thyroid carcinoma in patients with nodular thyroid diseases. *Thyroid* **11**, 73–80. <https://doi.org/10.1089/10507250150500694>

Hanske L, Hussong R, Frank N, Gerhäuser C, Blaut M, Braune A (2005) Xanthohumol does not affect the composition of rat intestinal microbiota. *Mol Nutr Food Res* **49**, 868–873. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500048>

Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ahn KS, Anand P, Krishnan S, Guha S, i sur. (2008) Modification of the cysteine residues in IkappaBalpha kinase and NF-kappaB (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF-kappaB-regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells. *Blood* **113**, 2003–13. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-151944>

Harish V, Haque E, Śmiech M, Taniguchi H, Jamieson S, Tewari D, i sur. (2021) Xanthohumol for Human Malignancies: Chemistry, Pharmacokinetics and Molecular Targets. *Int J Mol Sci* **22**, 4478. <https://doi.org/10.3390/ijms22094478>



Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR (2000) *In vitro* inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* **30**, 235–251. <https://doi.org/10.1080/004982500237631>

Ho YC, Liu CH, Chen CN, Duan KJ, Lin MT (2008) Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Phytother Res* **22**, 1465–1468. <https://doi.org/10.1002/ptr.2481>

Hudcová T, Bryndová J, Fialová K, Fiala J, Karabín M, Jelínek L, i sur. (2014) Antiproliferative effects of prenylflavonoids from hops on human colon cancer cell lines. *J Inst Brew* **120**, 225–230. <https://doi.org/10.1002/jib.139>

Hussong R, Frank N, Knauff J, Ittrich C, Owen R, Becker H, i sur. (2005) A safety study of oral xanthohumol administration and its influence on fertility in Sprague Dawley rats. *Mol Nutr Food Res* **49**, 861–867. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500089>

ITIS (2022) Report *Humulus lupulus* L. Taxonomic Serial No.19160. ITIS-Integrated Taxonomic Information System, [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=19160#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19160#null). Pristupljeno 31. siječnja 2022.

Jiang W, Zhao S, Xu L, Lu Y, Lu Z, Chen C, i sur. (2015) The inhibitory effects of xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, on cell growth and tumorigenesis in human pancreatic cancer. *Biomed Pharmacother* **73**, 40–47. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.05.020>

Kang Y, Park MA, Heo SW, Park SY, Kang KW, Park PH, i sur. (2013) The radio-sensitizing effect of xanthohumol is mediated by STAT3 and EGFR suppression in doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cells. *BBA-Gen Subj* **1830**, 2638–2648. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.005>

Karabin M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P (2015) Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnol Adv* **33**, 1063–1090. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>

Kim SY, Lee I-S, Moon A (2013) 2-Hydroxychalcone and xanthohumol inhibit invasion of triple negative breast cancer cells. *Chem Biol Interact* **203**, 565–572. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.03.012>

- Klosek M, Mertas A, Krol W, Jaworska D, Szymshal J, Szliska E (2016) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in prostate cancer cells after treatment with xanthohumol-A natural compound present in *Humulus lupulus* L. *Int J Mol Sci* **17**, 837. <http://doi.org/10.3390/ijms17060837>
- Koo JH, Kim HT, Yoon HY, Kwon KB, Choi IW, Jung SH, i sur. (2008) Effect of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Exp Mol Med* **40**, 313–319. <http://doi.org/10.3858/emm.2008.40.3.313>
- Kunnimalaiyaan S, Sokolowski KM, Balamurugan M, Gamblin TC, Kunnimalaiyaan M (2015a) Xanthohumol inhibits Notch signaling and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **10**, e0127464. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0127464>
- Kunnimalaiyaan S, Trevino J, Tsai S, Gamblin TC, Kunnimalaiyaan M (2015b) Xanthohumol-mediated suppression of Notch1 signaling is associated with antitumor activity in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* **14**, 1395–1403. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0915>
- Lee IS, Lim J, Gal J, Kang JC, Kim HJ, Kang BY, i sur. (2011) Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. *Neurochem Int* **58**, 153–160. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.11.008>
- Li Y, Wang K, Yin S, Zheng H, Min D (2016) Xanthohumol inhibits proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* **12**, 5289–5294. <http://doi.org/10.3892/ol.2016.5313>
- Lin M, Xiang D, Chen X, Huo H (2019) Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health. *J Agr Food Chem* **67**, 8291–8302. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03780>
- Lionello M, Staffieri A, Marioni G (2012) Potential prognostic and therapeutic role for angiogenesis markers in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* **132**, 574–582. <http://doi.org/10.3109/00016489.2011.652308>
- Liu M, Hansen PE, Wang G, Qiu L, Dong J, Yin H, i sur. (2015) Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* **20**, 754–779. <http://doi.org/10.3390/molecules20010754>
- Liu M, Yin H, Qian X, Dong J, Qian Z, Miao J (2016) Xanthohumol, a Prenylated Chalcone from Hops, Inhibits the Viability and Stemness of Doxorubicin-Resistant MCF-7/ADR Cells. *Molecules* **22**, 36. <http://doi.org/10.3390/molecules22010036>

- Liu W, Li W, Liu H, Yu X (2019) Xanthohumol inhibits colorectal cancer cells via downregulation of Hexokinases II-mediated glycolysis. *Int J Biol Sci* **15**, 2497–2508. <http://doi.org/10.7150/ijbs.37481>
- Long B, Parks E, Pacurari P, Rieland A, Pacurari M (2019) Cytotoxic Effects of Xanthohumol and Its Combination with Cisplatin on Human Metastatic Lung Cancer H1299 Cells. *J Adv Med Med Res* **30**, 1–15. <https://doi.org/10.9734/jammr/2019/v30i930237>
- Lou S, Zheng YM, Liu SL, Qiu J, Han Q, Li N, i sur. (2014) Inhibition of hepatitis C virus replication *in vitro* by xanthohumol, a natural product present in hops. *Planta Med* **80**, 171–176. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1360172>
- Magalhães PJ, Carvalho DO, Cruz JM, Guido LF, Barros AA (2009) Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat Prod Commun* **4**, 591–610. <http://doi.org/10.1177/1934578X0900400501>
- Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, i sur. (2013) mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell Metab* **18**, 726–739. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.013>
- Mendes V, Monteiro R, Pestana D, Teixeira D, Calhau C, Azevedo I (2008) Xanthohumol influences preadipocyte differentiation: implication of antiproliferative and apoptotic effects. *J Agric Food Chem* **56**, 11631–11637. <https://doi.org/10.1021/jf802233q>
- Mi X, Wang C, Sun C, Chen X, Huo X, Zhang Y, i sur. (2017) Xanthohumol induces paraptosis of leukemia cells through p38 mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Oncotarget* **8**, 31297–31304. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16185>
- Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, i sur. (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Che Toxicol* **37**, 271–285. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00019-8)
- Miranda CL, Aponso GLM, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR (2000) Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Lett* **149**, 21–29. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(99\)00328-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00328-6)
- Monteiro R, Calhau C, Silva AO, Pinheiro-Silva S, Guerreiro S, Gartner F, i sur. (2008) Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts. *J Cell Biochem* **104**, 1699–1707. <https://doi.org/10.1002/jcb.21738>

- Nagel J, Culley LK, Lu Y, Liu E, Matthews PD, Stevens JF, i sur. (2008) EST analysis of hop glandular trichomes identifies an *O*-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *Plant Cell* **20**, 186–200. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055178>
- Nookandeh A, Frank N, Steiner F, Ellinger R, Schneider B, Gerhäuser C, i sur. (2004) Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry* **65**, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.11.016>
- Nowakowska Z (2007) A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem* **42**, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.09.019>
- Ohshima H, Bartsch H (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* **305**, 253–264. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90245-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90245-3)
- Pafiti KS, Vlasiou MC (2019) Evaluation of Xanthohumol as a potent drug from nature: Synthesis, isolation and anticancer activity. *SCIREA* **4**, 1–19.
- Pan L, Becker H, Gerhäuser C (2005) Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor and mitochondrial pathway. *Mol Nutr Food Res* **49**, 837–843. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500065>
- Pang Y, Nikolic D, Zhu D, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, i sur. (2007) Binding of the hop (*Humulus lupulus* L.) chalcone xanthohumol to cytosolic proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *Mol Nutr Food Res* **51**, 872–879. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600252>
- Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS (2009) Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid* **19**, 1333–1342. <https://doi.org/10.1089/thy.2009.0195>
- Plazar J, Zegura B, Lah TT, Filipic M (2007) Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutat Res* **632**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.03.013>
- Plazar J, Filipic M, Groothuis GMM (2008) Antigenotoxic effect of Xanthohumol in rat liver slices. *Toxicol In Vitro* **22**, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.09.009>
- Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA (2008) Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* **19**, 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.12.007>

Roberts TR, Wilson RJH (2006) Hops. U: Priest FJ i Stewart GG (ured.) Handbook of Brewing, 2. izd. [online], Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, str. 177–280. <<https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/9781420015171/handbook-brewing-graham-stewart-fergus-priest>>. Pristupljeno 10. prosinca 2021.

Roehrer S, Stork V, Ludwig C, Minceva M, Behr J (2019) Analyzing bioactive effects of the minor hop compound xanthohumol C on human breast cancer cells using quantitative proteomics. *PLoS ONE* **14**, e0213469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213469>

Rozalski M, Micota B, Sadowska B, Stochmal A, Jedrejek D, Wieckowska-Szakiel M, i sur. (2013) Antiadherent and Antibiofilm Activity of *Humulus lupulus* L. Derived Products: New Pharmacological Properties. *Biomed Res Int* **2013**. <https://doi.org/10.1155/2013/101089>

Saito K, Matsuo Y, Imafuji H, Okubo T, Maeda Y, Sato T, i sur. (2018) Xanthohumol inhibits angiogenesis by suppressing nuclear factor- $\kappa$ B activation in pancreatic cancer. *Cancer Sci* **109**, 132–140. <https://doi.org/10.1111/cas.13441>

Sastre-Serra J, Ahmiane Y, Roca P, Oliver J, Pons DG (2019) Xanthohumol, a hop-derived prenylflavonoid present in beer, impairs mitochondrial functionality of SW620 colon cancer cells. *Int J Food Sci Nutr* **70**, 396–404. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1540558>

Sathornsumetee S, Rich JN (2008) Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann NY Acad Sci* **1142**, 108–132. <https://doi.org/10.1196/annals.1444.009>

Scagliarini A, Mathey A, Aires V, Delmas D (2020) Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops, Induces DNA Damages in Colorectal Cancer Cells and Sensitizes SW480 Cells to the SN38 Chemotherapeutic Agent. *Cells* **9**, 932. <https://doi.org/10.3390/cells9040932>

Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, i sur. (2018) Melanoma. *Lancet* **392**, 971–984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)

Seitz T, Hackl C, Freese K, Dietrich P, Mahli A, Thasler RM, i sur. (2021) Xanthohumol, a Prenylated Chalcone Derived from Hops, Inhibits Growth and Metastasis of Melanoma Cells. *Cancers* **13**, 511. <https://doi.org/10.3390/cancers13030511>

Sławinska-Brych A, Krol SK, Dmoszynska-Graniczka M, Zdzisinska B, Stepulak A, Gagos M (2015) Xanthohumol inhibits cell cycle progression and proliferation of larynx cancer cells *in vitro*. *Chem Biol Interact* **240**, 110–118. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.008>

- Sławinska-Brych A, Zdzisinska B, Dmoszynska-Graniczka M, Jeleniewicz W, Kurzepa J, Gagos M, i sur. (2016) Xanthohumol inhibits the extracellular signal regulated kinase (ERK) signalling pathway and suppresses cell growth of lung adenocarcinoma cells. *Toxicology* **357–358**, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.06.008>
- Small E (1978) A Numerical and Nomenclatural Analysis of Morpho-Geographic Taxa of *Humulus*. *Sys Bot* **3**, 37–76. <https://doi.org/10.2307/2418532>
- Smith TA (2000) Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br J Biomed Sci* **57**, 170-178.
- Soares R, Guo S, Gartner F, Schmitt FC, Russo J (2003) 17  $\beta$ -estradiolmediated vessel assembly and stabilization in tumor angiogenesis requires TGF $\alpha$  and EGFR crosstalk. *Angiogenesis* **6**, 271–281. <https://doi.org/10.1023/B:AGEN.0000029413.32882.dd>
- Srećec S (2006) Gorki sastojci hmelja tijekom vegetacije, prerade u pelete, skladištenja i proizvodnje piva (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Stevens JF, Page JE (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. *Phytochemistry* **65**, 1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
- Stompor M, Żarowska B (2016) Antimicrobial Activity of Xanthohumol and Its Selected Structural Analogues. *Molecules* **21**, 608. <https://doi.org/10.3390/molecules21050608>
- Sun Z, Zhou C, Liu F, Zhang W, Chen J, Pan Y, i sur. (2018) Inhibition of breast cancer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. *Oncol Lett* **15**, 908–916. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7434>
- Tang Y, Wang Y, Kiani MF, Wang B (2016) Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. *Clin Breast Cancer* **16**, 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.05.012>
- Tas F (2012) Metastatic behavior in melanoma: Timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol* **2012**, 647684. <https://doi.org/10.1155/2012/647684>
- Thongchot S, Thanee M, Loilome W, Techasen A, Boonmars T, Sa-Ngiamwibool, i sur. (2019) Curative effect of xanthohumol supplementation during liver fluke-associated cholangiocarcinogenesis: Potential involvement of autophagy. *J Tradit Complement Med* **10**, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.02.001>

- Trovisco V, Soares P, Preto A, Castro P, Máximo V (2007) Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma: great expectations. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **51**, 643–653. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000500002>
- Vanhoecke BW, Delporte F, Van Braeckel E, Heyerick A, Depypere HT, Nuytinck M, i sur. (2005) A safety study of oral tangeretin and xanthohumol administration to laboratory mice. *In Vivo* **19**, 103–107.
- Vene R, Benelli R, Minghelli S, Astigiano S, Tosetti F, Ferrari N (2012) Xanthohumol impairs human prostate cancer cell growth and invasion and diminishes the incidence and progression of advanced tumors in TRAMP mice. *Mol Med* **18**, 1292–1302. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00174>
- Verstovsek S, Kantarjian H, Manshour T, Cortes J, Giles F, Rogers A, i sur. (2002) Prognostic significance of cellular vascular endothelial growth factor expression in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* **99**, 2265–2267. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.6.2265>
- Verzele M (1986) 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. *Journal of the Institute of Brewing* **92**, 32–48. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04372.x>
- Walden D, Kunnimalaiyaan S, Sokolowski K, Clark TG, Kunnimalaiyaan M (2017) Antiproliferative and apoptotic effects of xanthohumol in cholangiocarcinoma. *Oncotarget* **8**, 88069–88078. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21422>
- Wang Q, Ding ZH, Liu JK, Zheng YT (2004) Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*. *Antivir Res* **64**, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.08.005>
- Watts GS, Futscher BW, Holtan N, Degeest K, Domann FE, Rose SL (2008) DNA methylation changes in ovarian cancer are cumulative with disease progression and identify tumor stage. *BMC Med Genomics* **1**, 47. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-1-47>
- Weiskirchen R, Mahli A, Weiskirchen S, Hellerbrand C (2015) The hop constituent xanthohumol exhibits hepatoprotective effects and inhibits the activation of hepatic stellate cells at different levels. *Front Physiol* **6**, 140. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00140>
- Wolff H, Motyl M, Hellerbrand C, Heilmann J, Kraus B (2011) Xanthohumol uptake and intracellular kinetics in hepatocytes, hepatic stellate cells, and intestinal cells. *J Agric Food Chem* **59**, 12893–12901. <https://doi.org/10.1021/jf203689z>

- Yager JD, Davidson NE (2006) Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* **354**, 270–282. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050776>
- Yong WK, Abd Malek SN (2015) Xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis in ca ski human cervical cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* **2015**, 921306. <http://doi.org/10.1155/2015/921306>
- Yong WK, Ho YF, Malek SN (2015) Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. *Pharmacogn Mag* **11**, 275–283. <http://doi.org/10.4103/0973-1296.166069>
- Yoo YB, Park KS, Kim JB, Kang HJ, Yang JH, Lee EK, i sur. (2014) Xanthohumol inhibits cellular proliferation in a breast cancer cell line (MDA-MB231) through an intrinsic mitochondrial-dependent pathway. *Indian J Cancer* **51**, 518–523. <http://doi.org/10.4103/0019-509X.175328>
- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2004) Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic Biol Med* **37**, 1683–1693. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.002>
- Yu D, Jin C, Liu Y, Yang J, Zhao Y, Wang H, i sur. (2013) Clinical implications of cancer stem cell-like side population cells in human laryngeal cancer. *Tumour Biol* **34**, 3603–3610. <http://doi.org/10.1007/s13277-013-0941-6>
- Yuan J, Peng G, Xiao G, Yang Z, Huang J, Liu Q, i sur. (2020) Xanthohumol suppresses glioblastoma via modulation of Hexokinase 2-mediated glycolysis. *J. Cancer* **11**, 4047–4058. <https://doi.org/10.7150/jca.33045>
- Zanoli P, Zavatti M (2008) Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* **116**, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>
- Zhang YM, Shi XB, Xu B, Yuan CS, Zheng W, Li G, i sur. (2020) Endoplasmic reticulum stress mediated the xanthohumol induced murine melanoma B16-F10 cell death. *J Asian Nat Prod Res* **22**, 850–863. <https://doi.org/10.1080/10286020.2019.1644623>
- Zhao F, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K, Kitanaka S (2003) Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biol Pharm Bull* **26**, 61–65. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.61>



Zhao X, Jiang K, Liang B, Huang X (2016) Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF- $\kappa$ B/p53-apoptosis signaling pathway. *Oncol Rep* **35**, 669–675. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4455>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Paula Mišković izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

  
Vlastoručni potpis