

Utjecaj kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju stanica raka dojke

Režek, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:020997>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Laura Režek

**UTJECAJ KURKUMINA I PIRAZOLNOG
ANALOGA KURKUMINA U UVJETIMA
NUTRITIVNE DEPRIVACIJE NA
VIJABILNOST I PROLIFERACIJU STANICA
RAKA DOJKE**

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



Ovaj rad je izrađen u okviru HRZZ projekta **IP-2020-02-9162** „*Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija*“ voditeljice prof. dr. sc. Lidije Barišić.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ivani Kmetič na prihvaćenom mentorstvu, pomoći, trudu i vremenu uloženom u izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se također dr. sc. Marini Miletić na velikoj pomoći tijekom izrade praktičnog dijela diplomskog rada i svim prenesenim znanjima i vještinama. Hvala i izv. prof. dr. sc. Teuti Murati na podršci i svim korisnim savjetima prilikom izrade.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek vjerovali u mene i bili mi podrška.

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: Molekularna biotehnologija

UTJECAJ KURKUMINA I PIRAZOLNOG ANALOGA KURKUMINA U UVJETIMA NUTRITIVNE
DEPRIVACIJE NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU STANICA RAKA DOJKE

Laura Režek, univ. bacc. ing. biotechn.
0058217199

Sažetak: Cilj rada bio je ispitati učinak nutritivne deprivacije, kao i učinak kurkumina (CRC) i pirazolnog analoga kurkumina (PC) (2,5 – 100 μ M) u uvjetima nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanične linije, te na indukciju stanične smrti autofagijom i apoptozom. Stanična vijabilnost praćena je metodama MTT, *Neutral Red* i *Trypan Blue*, dok je analiza stanične smrti provedena metodom protočne citometrije. Uzgoj stanica u DMEM *High Glucose* i DMEM *Low Glucose* hranjivim medijima razrijeđenim PBS ili HBSS puferom uzrokovao je značajno smanjenje proliferacije stanica određeno MTT metodom, pri čemu koncentracija dostupne glukoze nije bila ograničavajući parametar. Nutritivna deprivacija potaknula je autofagiju kod samo jednog uzorka, dok je apoptoza bila blago inducirana kod svih i to nešto jače kod primjene medija s nižom koncentracijom glukoze. CRC i PC uzrokovali su smanjenje stanične vijabilnosti u ovisnosti u dozi, pri čemu su se parametri poput načina i vremena tretiranja stanica (stanice nacijepjljene u mediju za uzgoj u koji je dodan CRC ili PC; stanice tretirane s CRC-om ili PC-om nakon 24h (odnosno nakon formiranog monosloja)) pokazali važnim za konačne citotoksične učinke navedenih spojeva. Nutritivna deprivacija pojačala je citotoksično djelovanje CRC-a, što je potvrđeno metodama MTT, *Neutral Red* i *Trypan Blue*. Udio stanica koje odumiru autofagijom ili apoptozom značajno je porastao povećanjem koncentracije CRC-a (5 – 100 μ M) u uvjetima nutritivne deprivacije.

Ključne riječi: nutritivna deprivacija, kurkumin, pirazolni analog kurkumina, autofagija, apoptoza

Rad sadrži: 65 stranica, 36 slika, 4 tablice, 43 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Kmetič

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marina Miletić

izv. prof. dr. sc. Teuta Murati

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Teuta Murati (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ivana Kmetič (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (član)
4. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

Datum obrane: 23. rujna 2024.

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: Molecular Biotechnology

THE EFFECT OF CURCUMIN AND PYRAZOLE ANALOGUE OF CURCUMIN UNDER CONDITIONS OF NUTRIENT DEPRIVATION ON THE VIABILITY AND PROLIFERATION OF BREAST CANCER CELLS

Laura Režek, univ. bacc. ing. biotechn.
0058217199

Abstract: The aim of this study was to examine the effect of nutrient deprivation, as well the effect of curcumin (CRC) and pyrazole analogue of curcumin (PC) (2,5 – 100 μ M) under conditions of nutrient deprivation on the viability and proliferation of the MCF-7 cells, and on the induction of cell death by autophagy and apoptosis. Cell viability was determined using MTT, Neutral Red and Trypan Blue methods, while cell death analysis was performed using the flow cytometry method. DMEM High Glucose and DMEM Low Glucose media diluted with PBS or HBSS caused a significant decrease in cell proliferation, which was determined by MTT method, while the concentration of available glucose was not the limiting parameter. Nutrient deprivation stimulated autophagy in only one sample, while apoptosis was mildly induced in all of them and somewhat stronger when using media with a lower glucose concentration. CRC and PC caused a decrease in cell viability in a dose-dependent manner, with parameters such as conditions and time of cell treatment (cells inoculated in culture medium to which CRC or PC was added; cells treated with CRC or PC after 24h (that is, after monolayer formation)) proved to be important for the final cytotoxic effects of the mentioned compounds. Nutrition deprivation enhanced the cytotoxic effect of CRC, which was confirmed by the MTT, Neutral Red and Trypan Blue methods. The proportion of cells that undergo cell death by autophagy or apoptosis increased significantly in conditions of nutrient deprivation as concentration of CRC (5 – 100 μ M) increased.

Keywords: nutrient deprivation, curcumin, pyrazole analogue of curcumin, autophagy, apoptosis

Thesis contains: 65 pages, 36 figures, 4 tables, 43 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ivana Kmetič, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Marina Miletić, PhD, Scientific Assistant

Teuta Murati, PhD, Associate Professor

Reviewers:

1. Teuta Murati, PhD, Associate professor (president)
2. Ivana Kmetič, PhD, Full professor (mentor)
3. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (member)
4. Igor Slivac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 23th, 2024

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	KURKUMIN I NJEGOVI DERIVATI	3
2.1.1.	Kurkumin.....	3
2.1.2.	Derivati kurkumina	5
2.2.	METABOLIČKE PROMJENE U KANCEROZNYM STANICAMA	7
2.2.1.	Unos glukoze u stanicu	7
2.2.2.	Metabolizam glukoze i metaboličke promjene u kancerovnim stanicama	8
2.3.	STANIČNA SMRT	11
2.3.1.	Autofagija.....	11
2.3.2.	Apoptoza.....	14
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1.	MATERIJALI	17
3.1.1.	Biološki materijal	17
3.1.2.	Kemikalije	17
3.1.3.	Otopine i puferi.....	18
3.1.4.	Oprema i uređaji	21
3.2.	METODE	21
3.2.1.	Uzgoj i održavanje MCF-7 stanica u kulturi	21
3.2.2.	Metode za određivanje proliferacije i vijabilnosti stanica.....	22
3.2.2.1.	Trypan Blue metoda	22
3.2.2.2.	MTT metoda.....	22
3.2.2.3.	Neutral Red metoda	23
3.2.3.	Analiza stanične smrti protočnom citometrijom.....	23
3.2.3.1.	Autofagija.....	23
3.2.3.2.	Apoptoza.....	23
3.2.4.	Određivanje učinka nutritivne deprivacije na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica	24
3.2.5.	Određivanje učinka nutritivne deprivacije na indukciju autofagije/apoptoze u MCF-7 kulturi stanica.....	25
3.2.5.1.	Analiza autofagije u kulturi MCF-7 stanica pri uvjetima nutritivne deprivacije .	
	25

3.2.5.2. Analiza apoptoze u kulturi MCF-7 stanica pri uvjetima nutritivne deprivacije ..	25
3.2.6. Određivanje učinka kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima deprivacije glukoze na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica.....	25
3.2.7. Određivanje učinka kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima nutritivne deprivacije na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica.....	25
3.2.8. Analiza autofagije nakon tretmana MCF-7 stanica kurkuminom uzgajanih u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS	26
3.2.9. Analiza apoptoze nakon tretmana MCF-7 stanica kurkuminom uzgajanih u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS	26
3.3. OBRADA PODATAKA	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. UČINAK NUTRITIVNE DEPRIVACIJE NA VIJABILNOST, PROLIFERACIJU I INDUKCIJU SMRTI MCF-7 STANICA.....	28
4.1.1. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom MTT	28
4.1.2. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom <i>Neutral Red</i>	30
4.1.3. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom <i>Trypan Blue</i>	31
4.1.4. Učinak nutritivne deprivacije na indukciju autofagije.....	32
4.1.5. Učinak nutritivne deprivacije na indukciju apoptoze.....	34
4.2. UČINAK KURKUMINA I PIRAZOLNOG ANALOGA KURKUMINA U UVJETIMA NUTRITIVNE DEPRIVACIJE NA VIJABILNOST, PROLIFERACIJU I INDUKCIJU SMRTI MCF-7 STANICA.....	37
4.2.1. Učinak kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima deprivacije glukoze na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica određen MTT metodom	37
4.2.2. Učinak kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima nutritivne deprivacije na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica određen MTT metodom	41
4.2.3. Učinak kurkumina u uvjetima deprivacije glukoze/nutrijenata na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica određen <i>Neutral Red</i> metodom	43
4.2.4. Učinak kurkumina u uvjetima deprivacije glukoze/nutrijenata na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica određen <i>Trypan Blue</i> metodom	45
4.2.5. IC vrijednosti	46
4.2.6. Učinak tretmana MCF-7 stanica kurkuminom uzgajanih u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM +	

1/3PBS na indukciju autofagije	51
4.2.7. Učinak tretmana MCF-7 stanica kurkuminom uzgajanih u LGlcM ili 2/3LGlcM + 1/3PBS na indukciju apoptoze.....	54
5. ZAKLJUČCI	59
6. LITERATURA	61

1. UVOD

Rak dojke jedan je od najčešće prisutnih vrsta karcinoma kod žena i vodeći uzrok smrti uzrokovane rakom. U posljednje vrijeme, sve više do izražaja dolazi terapijski pristup koji se temelji na deprivaciji nutrijenata, odnosno na „izgladnjivanju“ stanica raka (engl. *cancer starvation therapy*). Naime, kancerozne stanice karakterizira izmijenjena mreža metaboličkih puteva u odnosu na normalne stanice zbog njihovih jedinstvenih metaboličkih potreba. Povećana potreba za glukozom jedna je od njih kako bi stanice podržale nekontroliranu proliferaciju i osigurale preživljenje u nepovoljnim uvjetima koji su često prisutni u staničnom okolišu. Stoga je kod stanica raka razvijen specifični energetskei metabolizam zvan Warburg efekt, gdje stanice konvertiraju glukozu do laktata procesom aerobne glikolize čak i u prisutnosti kisika, što se razlikuje od metabolizma normalnih stanica gdje se nakon glikolize odvija energetskei učinkovitiji proces oksidativne fosforilacije. Tumorske stanice također karakterizira i prekomjerna ekspresija transportera za unos glukoze u stanicu. Osim energetskeih, tumori moraju zadovoljiti i povećane biosintetske potrebe, stoga su ovisni i o drugim nutrijentima osim glukoze, poput aminokiselina i lipida, od kojih se posebice izdvaja ovisnost o glutaminu (Bose i sur., 2021).

Kurkumin, polifenolni spoj izoliran iz rizoma *Curcuma longa*, predmet je brojnih istraživanja zbog svojih protuupalnih, antioksidacijskih i antikancerogenih svojstava zahvaljujući kojima pokazuje široki terapijski potencijal. Dokazano je da kurkumin djeluje citotoksično na nekoliko vrsta tumora, uključujući rak dojke. Inhibira njihovu proliferaciju, angiogenezu, sposobnost metastaziranja, a uočeno je da inducira staničnu smrt apoptozom i autofagijom (Urošević i sur., 2022). Također, dokazano je da kurkumin direktno inhibira aktivnost GLUT1 transportera za unos glukoze u stanicu, koji je često prekomjerno eksprimiran u stanicama raka dojke (Gunnink i sur., 2016). Međutim, veliku prepreku za korištenje kurkumina u medicinske svrhe predstavlja njegova slaba bioraspoloživost. Iz toga se razloga istražuju novosintetizirani derivati kurkumina kako bi se prevladali postojeći nedostaci i poboljšala njegova apsorpcija u organizmu.

Istraživanja su pokazala da deprivacija nutrijentima u kombinaciji s drugim terapijama protiv raka može rezultirati povećanom citotoksičnošću antitumorskih lijekova i time većom efikasnošću terapije (Pateras i sur., 2023; Khajah i sur., 2022). Primjenom opisane kombinacije liječenja, za postizanje istoga učinka potrebne su manje koncentracije lijekova, što rezultira značajnim smanjenjem nepoželjnih simptoma koji se javljaju kao rezultat ovih terapija.

Uzimajući u obzir dokazani sinergistički učinak kombiniranih terapija koje uključuju deprivaciju nutrijenata s ciljem jačega djelovanja već postojećega lijeka, osmišljeni su sljedeći eksperimenti koji su provedeni kao dio ovog diplomskog rada. Cilj je najprije bio ispitati učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanične linije te na indukciju stanične

smrti autofagijom i apoptozom. U drugom se dijelu istraživanja zatim ispitivao utjecaj kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u kombinaciji s uvjetima deprivacije nutrijenata na vijabilnost i proliferaciju stanica, kao i na indukciju autofagije i apoptoze. Stanična vijabilnost praćena je metodama MTT, *Neutral Red* i *Trypan Blue*, dok je analiza stanične smrti provedena metodom protočne citometrije.

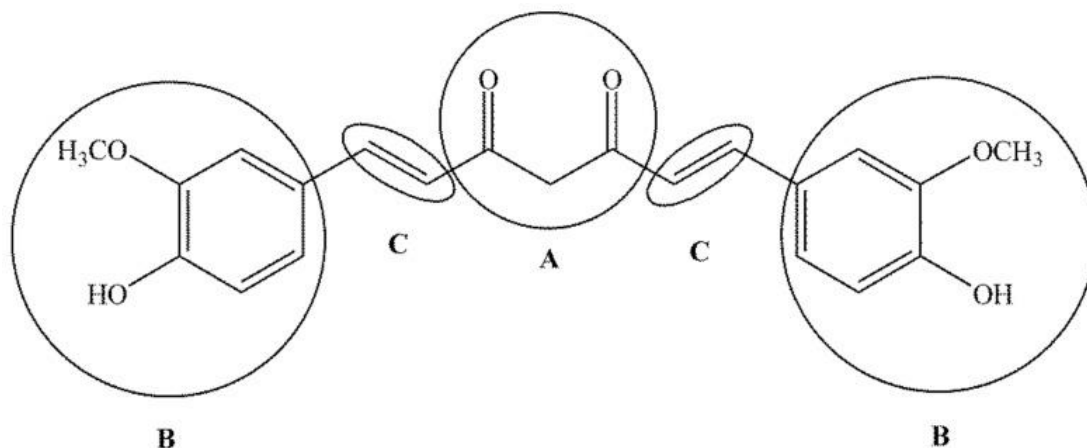
2. TEORIJSKI DIO

2.1. KURKUMIN I NJEGOVI DERIVATI

2.1.1. Kurkumin

Kurkumin je polifenolni spoj specifične žute boje ekstrahiran iz rizoma biljke *Curcuma longa*, poznata još i pod drugim nazivom kurkuma. Njegova je primjena poznata kroz povijest – koristio se kao dodatak prehrani, kao i u tradicionalnoj medicini u zemljama jugoistočne Azije. Prvi put su ga izolirali dvojica znanstvenika s Hardvara, Vogel i Pelletier, 1815. godine, a kemijska struktura kurkumina prvi je puta prezentirana 1910. godine od strane znanstvenika Milobedzka i Lampe. Od kada je prvi put izoliran, zbog svoje je biološke aktivnosti i raznih prednosti za zdravlje stavljen u središte istraživanja brojnih znanstvenika (Giordano i Tommonaro, 2019).

Kemijski naziv za kurkumin je diferuloilmetan. Gledajući njegovu kemijsku strukturu, kurkumin je simetrična molekula, a čine ju dva aromatska prstena, koji sadrže vezanu hidroksilnu i metoksilnu skupinu, spojeni razmaknicom od 7 ugljikovih atoma koja se sastoji od α,β -nezasićene β -diketonske jedinice. Na slici 1 vidljive su aktivne funkcijske skupine kurkumina: β -diketo skupina u središtu molekule, zatim dvostruke veze unutar ugljikovodičnog lanca te fenolni ostatak s metoksilnom skupinom (Priyadarsini, 2014).



Slika 1. Kemijska struktura kurkumina s istaknutim aktivnim funkcijskim skupinama: A – β -diketo skupina; B – metoksilna i fenolna skupina; C – dvostruka veza (Urošević i sur., 2022)

Aromatske skupine odgovorne su za hidrofobnost kurkumina, dok je za fleksibilnost same molekule odgovoran α,β -nezasićeni β -diketo dio, a značaj ovih svojstava očituje se kroz sposobnost kurkumina da se veže na razne biomakromolekule u ljudskom organizmu. Kurkumin nije lako topljiv u fiziološkom mediju i pokazuje slabu distribuciju i bioraspodjelivost. Slabo se apsorbira u tankom crijevu, brzo se metabolizira u jetri i brzo sistemski eliminira iz organizma (Prasad i sur., 2014). Klinička ispitivanja pokazala su da je kurkumin siguran za ljudsku konzumaciju i pri visokim dnevnim dozama do čak 12 g, pri čemu pokazuje vrlo malo

nuspojava (Shakeri i sur., 2019).

Kurkumin djeluje kao hormetički agens, pri čemu pokazuje stimulacijski efekt pri niskim dozama, a inhibitorni efekt pri visokim dozama. Ovo podrazumijeva i pojavu djelomične funkcije pri niskim dozama, poput njegove antioksidacijske aktivnosti. S druge strane, pri visokim dozama javlja se drugačija funkcija, kao što je to primjerice indukcija autofagije i stanične smrti. Nadalje, zamijećeno je da kurkumin u nekim slučajevima ima jači učinak pri nižim dozama nego pri višim, odnosno da pokazuje bifazno djelovanje ovisno o dozi. Primjer pojačanog učinka kurkumina pri nižim dozama je aktivacija signalnog puta protein kinaza aktiviranih mitogenom, kao i već spomenuta antioksidacijska aktivnost (Moghaddam i sur., 2019).

Kurkumin ima dokazan raznolik farmakološki učinak u *in vivo* i *in vitro* sustavima, zbog čega je i detaljno proučavan otkada je prvi put izoliran i kemijski okarakteriziran. Upravo je struktura kurkumina odgovorna za njegovu biološku aktivnost. Brojna istraživanja pokazala su da kurkumin karakteriziraju antioksidacijska, antitumorska, protuupalna, imunomodulirajuća, antibakterijska, antivirusna i antimalarijska svojstva, svojstva zacjeljivanja rana, te brojna druga.

Kurkumin je snažan antioksidans, pri čemu djeluje na način da se veže sa slobodnim radikalima u stanicama. Slobodni radikali poput reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i reaktivnih dušikovih spojeva (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) nastaju u ljudskom organizmu u patofiziološkim stanjima ili pod utjecajem raznih fizikalnih ili kemijskih faktora. Mogu uzrokovati peroksidaciju lipida, zatim promjene na razini DNA, te isto tako gubitak aktivnosti enzima i na taj način oštećuju stanice te uzrokuju starenje i nastanak bolesti. Za kurkumin je dokazano da dobro inhibira lipidnu peroksidaciju te na taj način pomaže zaštititi stanica od oksidacijskog stresa. Također, uzrokuje povećanu ekspresiju metionin sulfoksid reduktaze A (engl. *Methionine Sulfoxide Reductase A*, MsrA), povećava koncentracije enzima MsrA, superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) i time povećava enzimsku antioksidacijsku aktivnost (Urošević i sur., 2022).

Protuupalna svojstva kurkumina očituju se kroz njegovu sposobnost da inhibira ciklooksigenazu-2 (COX-2), lipoksigenaze (LOX) i inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS), bitne enzime koji posreduju upalne procese. Kurkumin inhibira i metabolizam arahidonske kiseline, ekspresiju citokina (interleukine) i kemokina, faktore nekroze tumora, NF-κB, kao i otpuštanje steroidnih hormona. Opisano protuupalno djelovanje kurkumina učinkovito je protiv brojnih upalnih bolesti kao što su artritis, gastritis, upalne bolesti crijeva, pankreatitis, autoimune bolesti, alergije i kardiovaskularne bolesti (Arshad i sur., 2017).

Dokazano je da kurkumin posjeduje antitumorska svojstva, pokazujući citotoksičan učinak na tumorske stanice, inhibirajući njihovu proliferaciju i angiogenezu. Njegov je terapijski i preventivni učinak uočen kod nekoliko vrsta tumora, uključujući rak dojke, prostate, mozga, pluća i gušterače. Kurkumin interferira s bitnim molekularnim putevima uključenima u razne

biološke procese poput proliferacije, kontrole staničnoga ciklusa, metastaziranja, apoptoze, procesa upale i angiogeneze, od kuda potječu njegova antikancerogena svojstva. Istraživanja su pokazala da kurkumin isto tako povećava osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapiju i radioterapiju čime se poboljšava učinkovitost liječenja i smanjuju nuspojave kada se koristi u kombinaciji s drugim terapijama. Kurkumin također specifično cilja matične stanice raka koje su zaslužne za otpornost raka na kemoterapije (Zoi i sur., 2024).

Brojni dokazi upućuju i na povezanost upalnih procesa s razvojem karcinoma. Inhibicijom AP-1 i NF- κ B faktora kurkuminom dolazi do smanjene transkripcije gena koji su inače pojačano eksprimirani u kanceroznim stanicama – gena odgovornih za poticanje stanica na proliferaciju, sprječavanje ulaska stanica u apoptozu i poticanje angiogeneze. Isto tako, kurkumin inhibira i protein kinaze koje induciraju apoptotičku aktivnost, a molekularnom metodom kurkumina pokazao se i STAT3 (engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*) protein, faktor koji potiče rast i preživljenje stanice te potiče ekspresiju antiapoptotičkih proteina kao što su Bcl-2 i Bcl-xL i time blokira apoptozu (Giordano i Tommonaro, 2019).

2.1.2. Derivati kurkumina

Zbog njegove slabe bioraspoloživosti i niske topljivosti u vodi, učinkovitost kurkumina kao terapeutika je smanjena, stoga su tijekom godina razvijane različite strategije s ciljem prevladavanja spomenutih nedostataka.

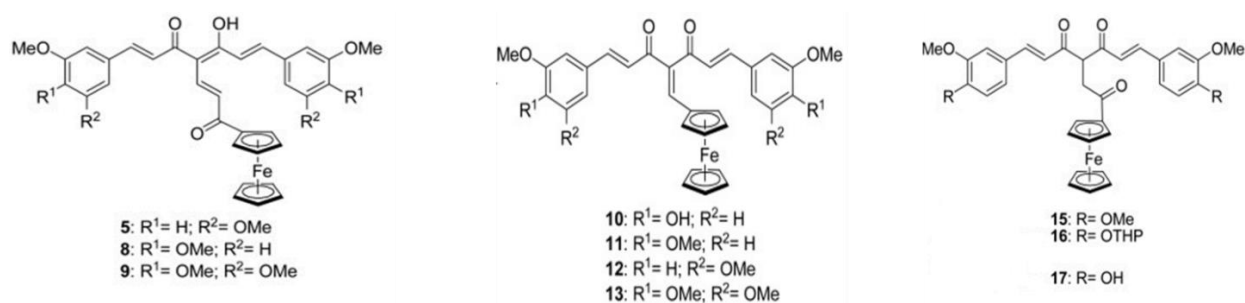
Jedan od pristupa uključuje dodatak adjuvansa u formulaciju lijeka na bazi kurkumina. Drugi pak pristupi nude korištenje nanočestica, micelarnih i liposomalnih nosača kao sustave isporuke lijeka, dok se neke strategije baziraju na modifikaciji strukture molekule kurkumina. Sintetski analozi kurkumina dobivaju se modifikacijom osnovne strukture molekule korištenjem različitih kemijskih reakcija. Na taj se način mogu sintetizirati novi spojevi koji sadržavaju osnovne strukturne značajke kurkumina, poput poveznice od 7 ugljikovih atoma i oksisupstituenata na prstenu benzena. Također, moguće je sintetizirati spojeve s prividnom strukturnom analogijom kurkuminu, te bioorganometalne komplekse kurkumina za koje je karakteristično prisustvo iona metala u strukturi (Arshad i sur., 2017).

β -diketonski ostatak u molekuli kurkumina metabolizira se jetrenim enzimima aldo-keto reduktazama, čime se smanjuje terapijski učinak kurkumina na različite bolesti. Dokazano je da je delecija ovog reaktivnog β -diketonskog ostatka odgovorna za povećanu *in vitro* stabilnost kurkumina kod pH vrijednosti 7,4, kao i za poboljšan farmakokinetički profil *in vivo*. Analozi kurkumina s razmaknicom od 5 ugljikovih atoma pokazali su se pogodnim za daljnji razvoj antitumorskih lijekova na bazi kurkumina (Liang i sur., 2009). Također, uvođenje raznih funkcijskih grupa umjesto fenolnih hidroksilnih skupina moglo bi spriječiti razgradnju kurkumina

pod bazičnim uvjetima (Pröhl i sur., 2016).

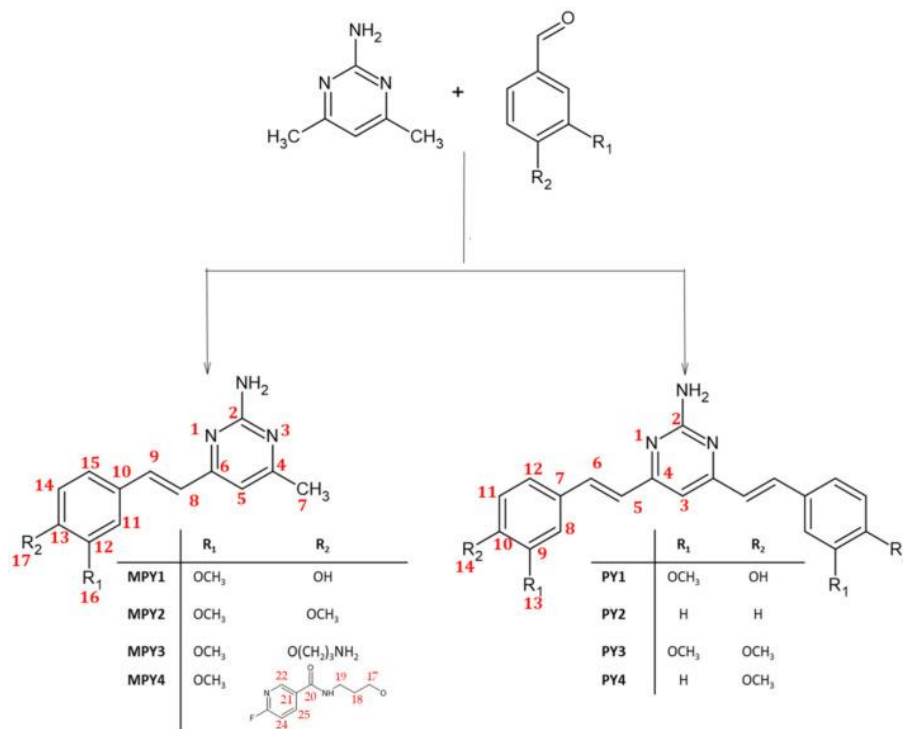
β -diketonski ostatak unutar molekule kurkumina djeluje kao kelirajući ligand i odgovoran je za tvorbu stabilnih kompleksa s metalima (Shakeri i sur., 2019). Interakcija nekoga liganda s metalima dovodi do drastične promjene biološkoga učinka liganda, u ovom kontekstu kurkumina, čime se smanjuju njegove negativne nuspojave, a može mu se povećati i biološka aktivnost. Također, prijelazni metalni poput bakra, željeza i mangana mogu ostvarivati interakcije s aktivnim mjestom enzima, stoga imaju važnu ulogu u raznim biološkim procesima u organizmu (Heras i sur., 2019).

Zanimljivima su se pokazali novosintetizirani metalni kompleksi nastali kovaletnim vezanjem organometalnoga ostatka na molekulu kurkuminoida. U istraživanju Arezki i sur. (2011) na ovaj je način sintetizirano osam novih ferocenskih derivata kurkuminoida, gdje je ferocen vezan razmaknicama različitih duljina na kurkuminoide sa substituiranim metoksilnim i hidroksilnim grupama na aromatskim prstenovima, što je prikazano na slici 2. Prisutnost ferocena u derivatima kurkumina povećala je njihovu biološku aktivnost u supresiji proliferacije stanica raka, poput pojačane citotoksičnosti, učinka na polimerizaciju tubulina i indukciju naglih morfoloških promjena endotelinih stanica (Arezki i sur., 2011).



Slika 2. Ferocenski derivati kurkuminoida (ferocen vezan razmaknicama različitih duljina) (Arezki i sur., 2011)

Kemijskom modifikacijom kurkumina pripremljeni su derivati na bazi pirimidina kojima je ispitana potencijalna antikancerogena aktivnost. Istraživanje Wang i sur. (2021) pokazalo je kako je novi derivat kurkumina, uz pokazanu značajnu kemijsku stabilnost, inhibirao rast stanica raka debelog crijeva u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Nadalje, uočeno je da je antitumorsko djelovanje novosintetiziranoga spoja postignuto indukcijom stvaranja intracelularnoga ROS-a, što je dovelo do promjene potencijala membrane mitohondrija, zastoja staničnoga ciklusa, aktivacije stresa endoplazmatskoga retikuluma i u konačnici apoptoze stanica (Wang i sur., 2021).



Slika 3. Novosintetizirani amino pirimidinski derivati kurkumina (Mari i sur., 2023)

Slični su rezultati dobiveni i drugim istraživanjima, gdje su korišteni derivati kurkumina kojima je reaktivna keto-enolna skupina supstituirana strukturom amino pirimidina. Na taj je način dobiveno osam novih derivata prikazanih na slici 3. Svi derivati pokazali su izvrsnu stabilnost u fiziološkom mediju. Za dva derivata određen je isti antiproliferacijski učinak kao i za kurkumin na staničnoj liniji raka debelog crijeva te poboljšana citotoksičnost prema stanicama raka prostate (Mari i sur., 2023).

2.2. METABOLIČKE PROMJENE U KANCEROZNIM STANICAMA

2.2.1. Unos glukoze u stanicu

Glukoza je primarni supstrat i izvor energije u svim stanicama sisavaca. Hidrofilna je molekula, stoga u stanicu ne može difundirati kroz lipidni dvosloj, već su joj za ulazak u citosol potrebni posebni transportni proteini koji se nalaze unutar stanične membrane. Glukoza se u stanice može transportirati putem dvije vrste membranskih proteina zaslužnih za prijenos heksoza: SGLT klasom transportera (engl. *sodium-dependent glucose co-transporters*) i GLUT klasom transportera (engl. *facilitative glucose transporters*) (Szablewski, 2013).

SGLT skupina transportera odgovorna je za transport heksoza uz njihov koncentracijski gradijent. Ovaj proces odvija se mehanizmom sekundarnoga aktivnoga transporta, te je ovisan

o unosu natrija niz njegov koncentracijski gradijent. Prvi identificiran bio je SGLT1, visoko-afinitetni transporter eksprimiran prvenstveno u membranama zrelih eritrocita u tankome crijevu i bubrežnim proksimalnim tubulima. S druge strane, GLUT skupina transportera transportira šećere niz njihov koncentracijski gradijent bez utroška energije. U ovu skupinu svrstavaju se transportni proteini GLUT1 – GLUT12, GLUT14 i H⁺/mio-inozitol transporteri, pri čemu svaki od njih pokazuje različit afinitet za glukozu i ostale heksoze. GLUT1 je najčešći transporter glukoze prisutan u ljudskim stanicama i smatra se odgovornim za bazalni unos glukoze u većini tkiva. U normalnim tkivima eksprimiran je u različitim koncentracijama te je metabolički i hormonalno reguliran, pri čemu je u najvišim koncentracijama prisutan u mozgu i eritrocitima, a umjereno je eksprimiran u mišićima, jetri, adipoznome tkivu i placenti (Szablewski, 2013).

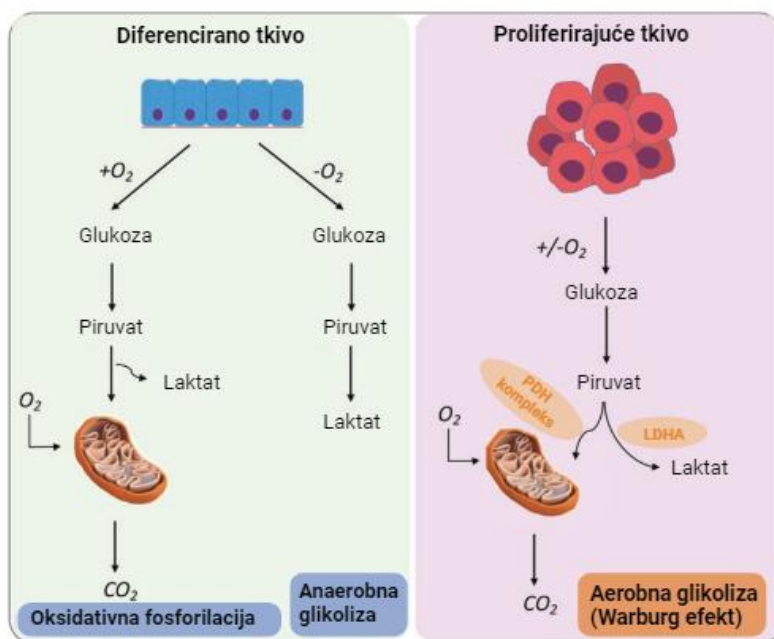
Primijećeno je da su pripadnici GLUT skupine transportera često povećano eksprimirani tijekom onkogeneze u različitim vrstama tkiva, iako su i tipično prisutni u ne-kanceroznim tkivima. Također, zamijećeno je da stanice raka često eksprimiraju GLUT skupinu proteina u onim tkivima gdje spomenuti transporteri pod normalnim uvjetima ne bi bili prisutni (Furuta i sur., 2010). GLUT1 kao glavni predstavnik GLUT skupine transportera, koji je široko raspodijeljen u normalnim tkivima, najviše je proučavan. Prekomjerna ekspresija GLUT1 transportera zabilježena je u različitim tumorima poput raka dojke, gušterače, jetre, mozga, jednjaka, bubrega, kože, pluća, jajnika, endometrija, grlića maternice i drugih (Medina i Owen, 2002). Njegova je prekomjerna ekspresija povezana s nekoliko obilježja tumora, poput povećane proliferacije, invazivnosti i smanjenoga preživljenja pacijenata. Nadalje, povučena je i korelacija ekspresije GLUT1 s razinom hipoksije tumora – stanja u kojem je opskrba kisikom smanjena. Hipoksija u tumorima povezana je s agresivnim fenotipovima tumora koji pokazuju visoku sklonost metastaziranju, a može dovesti i do rezistencije na kemoterapiju i radioterapiju (Szablewski, 2013). Povećana ekspresija transportnih proteina za glukozu posljedica je povećane potrebe kanceroznih stanica prema glukozu i njihovog pojačanoga metabolizma glukoze.

2.2.2. Metabolizam glukoze i metaboličke promjene u kanceroznim stanicama

Nakon što glukoza uđe u normalnu ne-tumorsku stanicu, može ući u različite metaboličke puteve ovisno o trenutnim metaboličkim potrebama stanice. Ukoliko su energetske potrebe stanice visoke, glukoza se procesom glikolize konvertira do piruvata pri čemu nastaje ATP i NADH. Ukoliko je prisutan kisik, piruvat se konvertira do acetil-CoA koji zatim ulazi u ciklus trikarboksilnih kiselina gdje u potpunosti oksidira do CO₂, nakon čega slijedi oksidativna fosforilacija kako bi se generirao ATP. Ovim se procesima sveukupno generira 36 mola ATP-a po molu glukoze. Ako kisik nije prisutan, stanica podliježe energetski nisko učinkovitom

procesu, anaerobnoj glikolizi. Pod tim se podrazumijeva oksidacija piruvata nastaloga glikolizom do laktata pomoću enzima laktat dehidrogenaze, pri čemu se dobivaju 2 mola ATP-a po molu utrošene glukoze (Martel i sur., 2015).

Nasuprot normalnim stanicama, u stanicama raka izražen je izmijenjeni metabolizam glukoze nastao reprogramiranjem već postojećih metaboličkih puteva. Naime, kako bi podržale nekontroliranu proliferaciju, kancerozne stanice imaju veću potrebu za energijom stoga ih karakterizira povećana brzina unosa glukoze, kao i povećana brzina glikolize. Tumorske stanice nakon glikolize konvertiraju piruvat do laktata i pri uvjetima kada je kisik prisutan, pri čemu dolazi do nakupljanja laktata. Iako je glikoliza manje učinkovit proces u proizvodnji energije, stanice raka preferiraju ovaj metabolički put nad oksidativnom fosforilacijom čak i u prisutnosti kisika. Opisani izmijenjeni energetski metabolizam smatra se jednim od glavnih obilježja raka i naziva se Warburg efekt ili aerobna glikoliza (slika 4), koji je prvi opisano znanstvenik Otto Warburg 1920-tih godina (Warburg, 1956).



Slika 4. Stanično disanje u normalnim diferenciranim stanicama (lijevo) nasuprot Warburg efektu u proliferirajućim kanceroznim stanicama (desno) (prema Bose i sur., 2021)

Otkrićem Warburg efekta postavljalo se pitanje zašto bi stanice raka preferirale energetski manje učinkovit proces za dobivanje energije ako je njihova potreba za energijom povećana u usporedbi s normalnim stanicama. Warburg je pretpostavljao da je razlog tome leži u činjenici da je oksidativna fosforilacija nefunkcionalna u stanicama raka zbog oštećenja mitohondrija. Kasnijim se istraživanjima ustanovilo da su brzine oksidativne fosforilacije u normalnim i tumorskim stanicama slične i da tumorske stanice u uvjetima kada je kisik dostupan koriste

aerobnu glikolizu i oksidativnu fosforilaciju. Tek je u uvjetima kada je kisik nedostupan i stanice se nađu u stanju hipoksije, primijećena ubrzana potrošnja glukoze i povećano izlučivanje laktata (anaerobna glikoliza), dok je oksidativna fosforilacija smanjena (Bose i sur., 2021).

Smatra se da je postojeći izmijenjeni metabolizam glukoze i proizvodnje laktata prilagodba tumorskih stanica na hipoksiju. Stanice koje brzo rastu i nekontrolirano se dijele karakterizira nedostatak kisika i nutrijenata zbog difuzijskih ograničenja opskrbe krvlju. Kao rezultat toga nastaju hipoksične tumorske stanice koje se oslanjaju na neoksidacijski energetski metabolizam poput glikolize, čak i kada se uvjeti promijene i kisik postane dostupan (Furuta i sur., 2010).

Kako se procesom aerobne glikolize dobiva manje energije nasuprot oksidativne fosforilacije, brzina glikolize mora biti znatno veća nego u normalnim stanicama kako bi se postigle dovoljne razine ATP-a. Zabilježeno je da je brzina glikoliza u tumorskim stanicama i do 30 puta veća nego u normalnim, što je moguće kontinuiranom pretvorbom piruvata u laktat. Čak i kada je oksidativna fosforilacija prisutna, aerobna glikoliza imaće puno viši fluks glukoze do laktata. Sukladno tome, zabilježena je 20 do 30 puta veća brzina unosa glukoze u stanice, što je i ključno kako bi se brzina glikolize održala na potrebnoj razini. Stanice raka svoju povećanu potrebu za glukozom zadovoljavaju povećanom ekspresijom i aktivnošću glikolitičkih enzima, kao i povećanom ekspresijom transportnih proteina za glukozu poput već spomenutog GLUT1 (Bose i sur., 2021; Martel i sur., 2015).

Stanice raka osim povećane potrebe za energijom karakterizira i potreba za anaboličkim metabolitima za proizvodnju biomase kako bi se mogle nastaviti nekontrolirano dijeliti. Smatra se da je još jedan od razloga zašto kancerogene stanice preferiraju aerobnu glikolizu taj da se intermedijeri glikolize mogu koristiti kao prekursori za sintezu aminokiselina, nukleotida i masnih kiselina potrebnih za izgradnju biomase. Isto tako, Warburg efektom smanjuje se proizvodnja ROS-a u mitohondriju uslijed smanjene oksidacijske fosforilacije, što rezultira inhibicijom jedne vrste apoptoze koja nastaje nakupljanjem ROS-a i u konačnici izbjegavanjem smrti tumorskih stanica (Bose i sur., 2021).

Osim promijenjenoga metabolizma glukoze, tumori pokazuju i promjene u metabolizmu aminokiselina i lipida. Drugi najkorišteniji metabolit za tumorske stanice nakon glukoze je aminokiselina glutamin. Tumorske stanice koriste ga kao izvor energije i za biosintezu ključnih staničnih komponenta. Glutamin se u stanici konvertira u glutamat, te potom u α -ketoglutarat koji ulazi u ciklus trikarboksilnih kiselina što u konačnici rezultira generiranjem ATP-a. Također, glutamin služi kao donor dušika u sintezi dušičnih baza purina i pirimidina, a bitnu ulogu ima kao prekursor biosinteze proteina, zatim glutationa koji je bitan za održavanje redoks homeostaze, te je također jedan od izvora NADPH. Služi i kao prekursor za sintezu drugih aminokiselina poput serina, glicina i aspartata, a izvor je ugljika i dušika za sintezu lipida koji su

glavna komponenta stanične membrane (DeBerardinis i Cheng, 2010). Glutamin je neesencijalna aminokiselina, odnosno ljudsko tijelo može je samostalno sintetizirati te ju stoga nije nužno unositi prehranom u organizam. Međutim, zbog visoke potrebe za glutaminom, tumorske stanice zapravo ovise o vanjskim izvorima glutamina, odnosno pokazuju tzv. „glutaminsku ovisnost“ te u nedostatku vanjskih izvora glutamina može doći do njihovog odumiranja (Li i sur., 2021).

Metabolizam lipida u tumorima također je izmijenjen i ove su promjene uvelike povezane s nastankom raka i njegovim daljnjim napretkom. Primijećeno je da je sinteza masnih kiselina povećana u stanicama raka te se smatra da fosfolipidi sintetizirani *de novo* lipogenezom opskrbljuju proliferirajuće tumorske stanice kako bi se dalje prerasporedili u stanične membrane i organele stanica kćeri (Park i sur., 2021). Također, povećan je udio zasićenih masnih kiselina u samoj strukturi fosfolipida, što rezultira manjom fluidnosti membrane i što je karakteristika agresivnih tumora dojke, a izmijenjen sastav membrane potencijalno doprinosi i smanjenoj osjetljivosti stanice na peroksidaciju. U stanicama raka uočena je i povećana razina β -oksidacije, što je još jedan od načina kojim stanice zadovoljavaju svoje povećane potrebe za energijom. Lipidi poput sfingozida i ceramida imaju bitnu ulogu u signalizaciji i induktori su apoptoze, a ekspresija enzima bitnih u sintezi ceramida smanjena je u brojnim vrstama tumora (Baenke i sur., 2013).

2.3. STANIČNA SMRT

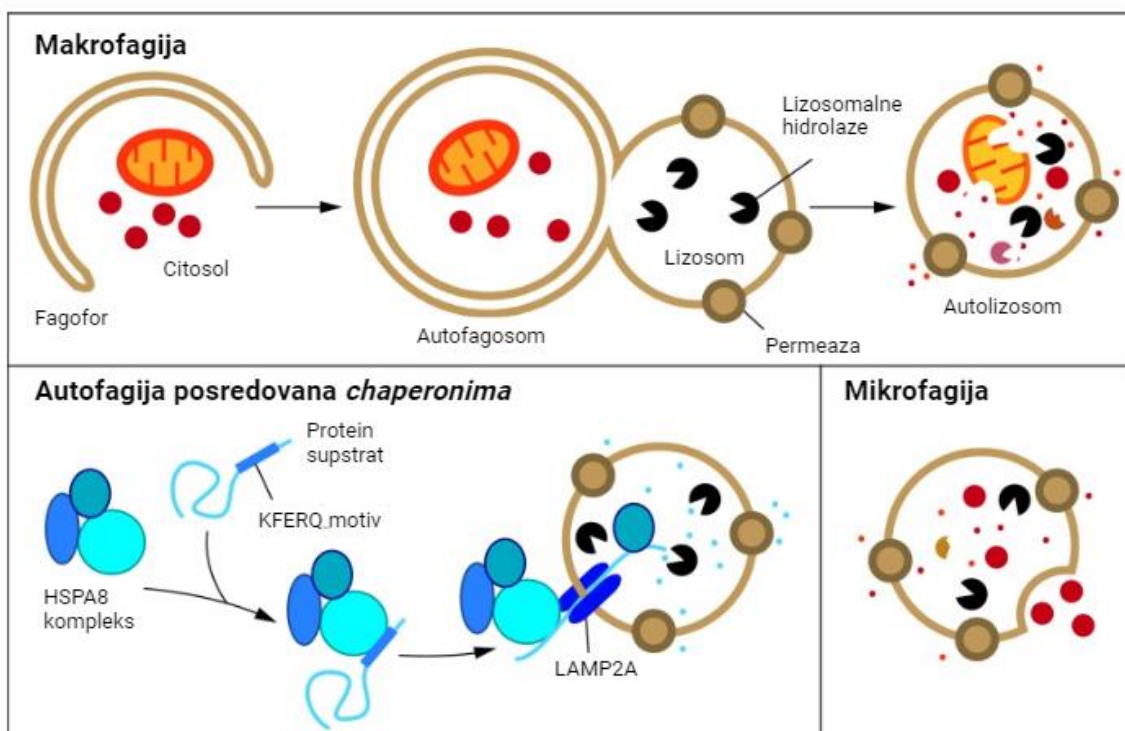
Stanična smrt je ključan biološki proces u višestaničnim organizmima koji je bitan za aktivno održavanje homeostaze u organizmu i za sistemsku eliminaciju potencijalno opasnih, oštećenih i nepotrebnih stanica. Vrste stanične smrti mogu se podijeliti u tri glavne skupine prema njihovim morfološkim razlikama: apoptoza, stanična smrt autofagijom i nekroza. Ovi su procesi striktno regulirani, a svaka se vrsta stanične smrti aktivira kroz različite, a ponekad i preklapajuće signalne puteve kao odgovor na specifične podražaje. Neravnoteža u regulaciji stanične smrti povezana je s razvojem raznim bolesti – pretjerana stanična smrt dovest će do degenerativnih stanja, dok će njezin nedostatak rezultirati nekontroliranom proliferacijom stanica i razvojem raka (Green i Llambi, 2015).

2.3.1. Autofagija

Autofagija je intracelularni degradacijski proces čija je svrha održavanje vijabilnosti stanice kroz razgradnju oštećenih, suvišnih ili neželjenih komponenata (poput organela, proteina i makromolekula) te recikliranjem produkata razgradnje. To je proces koji je visoko konzerviran u svim eukariotskim stanicama, a javlja se kao odgovor stanice na stresne uvjete, što bi uključivalo oštećenje staničnih organela, zatim prisutnost i akumulaciju krivo smotanih i

abnormalnih proteina, kao i uvjete nedostatka hranjivih tvari iz okoline (Yun i Lee, 2018).

U stanicama sisavaca postoje tri glavne vrste autofagije: makroautofagija, autofagija posredovana *chaperonima* i mikroautofagija. Iako je svaka vrsta autofagije morfološki različita, ono što im je zajedničko jest da se sve tri vrste oslanjaju na isporuku makromolekula do lizosoma na razgradnju i recikliranje.



Slika 5. Tri vrste autofagije u stanicama sisavaca (prema Parzych i Klionsky, 2014)

Najbolje proučena vrsta autofagije je makroautofagija. Za makroautofagiju specifično je da dolazi do *de novo* sinteze citoplazmatskih vezikula s dvostrukom membranom koje se nazivaju autofagosomi, kao što je prikazano na slici 5. Ove se vezikule koriste za izdvajanje komponenata i njihovo transportiranje do lizosoma gdje se razgrađuju. Niska razina makroautofagije se odvija konstitutivno u stanici, a može biti pojačano inducirana stresnim uvjetima poput nedostatka hranjivih tvari ili energije, kako bi se povećalo preživljenje stanice, na način da se citoplazmatski materijal tada razgrađuje do produkata koji se mogu koristiti za proizvodnju energije ili u biosintetskim procesima. Također, time se održava zaliha važnih proteina i drugih hranjivih tvari koje služe kao izvor energije. Kada su uvjeti u okolini normalni i stanica ne gladije, makroautofagija djeluje kao citoprotektivni mehanizam, odnosno sustav održavanja stanice na način da specifično razgrađuje oštećene ili suvišne organele. Međutim, pretjerana autofagija štetna je za stanice te su brojne bolesti poput bolesti srca, pluća, jetre, neurodegenerativne bolesti, starenje, rak, dijabetes i druge, povezane upravo s disfunkcijom

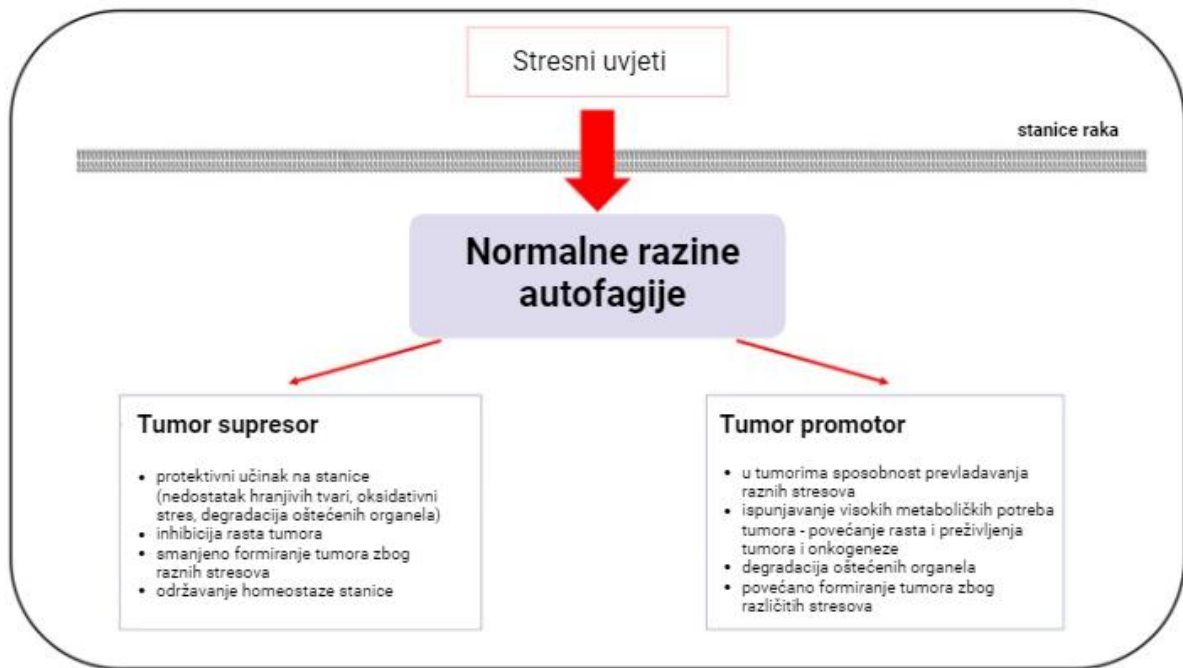
autofagije (Parzych i Klionsky, 2014).

Mikroautofagija je vrsta autofagije tijekom koje sadržaj citoplazme invaginacijom ili deformacijom lizosomske membrane ulazi u lizosom. Pri tome se unos odvija izravno na membrani lizosoma te može uključivati intaktne organele. O procesu mikroautofagije, njezinoj regulaciji i ulogama u ljudskom organizmu te njezinoj povezanosti sa zdravljem i bolestima zna se relativno malo zbog ograničenih metoda i dostupnih alata za istraživanje. Nedavno istraživanje ukazalo je na postojanje procesa sličnoga mikrofagiji pod imenom endosomalna mikroautofagija (Parzych i Klionsky, 2014).

Autofagiju posredovanu *chaperonima* (engl. *Chaperone Mediated Autophagy*, CMA) karakterizira prijenos pojedinačnih proteina direktno kroz membranu lizosoma. Ova je vrsta autofagije visoko specifična za supstrat koji mora sadržavati pentapeptid ciljajući motiv pod nazivom KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). Po tome se razlikuje od mikroautofagije i makroautofagije koje nisu u tolikoj mjeri specifične i mogu nespecifično zahvatiti citoplazmu. Proteini u citosolu koji sadrže navedenu sekvencu budu prepoznati od strane proteina *chaperona*, zatim se ciljni proteini odmotavaju i pojedinačno translociraju kroz lizosomalnu membranu. Smatra se da oko 30 % proteina u citosolu sadrži KFERQ motiv (Parzych i Klionsky, 2014).

Kod stanica raka, autofagija ima dvostruku ulogu – s jedne strane djeluje kao tumor supresor na način da inhibira preživljenje kanceroznih stanica i inducira staničnu smrt, dok s druge strane djeluje kao tumor promotor time što olakšava nastanak tumora poticanjem proliferacije i rasta stanica raka (slika 6).

Autofagija suprimira nastanak tumora na način da degradira oštećene dijelove stanice i stare proteine te održava homeostazu u stanici. Mutacija bitnih proteina koji sudjeluju u procesu autofagije može dovesti do inhibicije ili indukcije razvoja tumora. Izostanak gena BECN1, koji kodira za protein Beclin 1 i ima ulogu u procesu autofagije, uočen je kod brojnih tipova raka kod ljudi, uključujući rak dojke, jajnika i prostate. BECN1 je tumor supresor, važan je u formiranju fagofora te njegov gubitak rezultira smanjenom autofagijom i povećanom proliferacijom tumorskih stanica. Proteini poput UVRAG i Bif-1 također su pozitivni regulatori autofagije i djeluju kao tumor supresori. Smanjenjem ekspresije gena koji kodiraju za spomenute proteine uočeno je da dolazi do poremećaja u formiranju autofagosoma i samog procesa autofagije, što rezultira povećanom proliferacijom stanica raka dojke, prostate, crijeva i želuca. Nadalje, oštećenje mitohondrija dovodi do pretjerane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva, što za posljedicu ima nastanak karcinoma. Autofagija degradacijom oštećenih dijelova stanice regulira reaktivne kisikove spojeve i time sprječava stvaranje tumora (Yun i Lee, 2018).



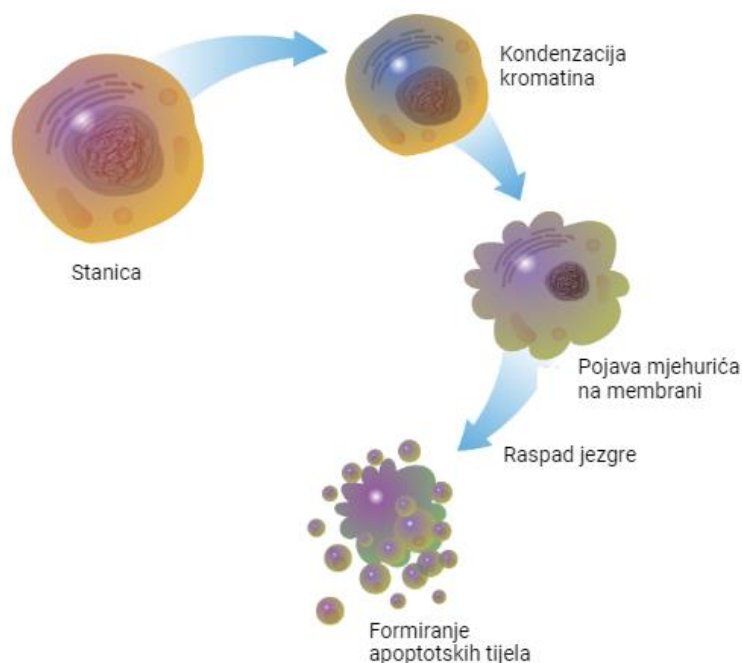
Slika 6. Shematski prikaz uloge autofagije u stanicama raka kao tumor supresora ili tumor promotora (prema Yun i Lee, 2018)

S druge strane, autofagija ima ulogu tumor promotora. Kako su izložene ekstremnim stresnim uvjetima poput nedostatka hranjivih tvari i niske prisutnosti kisika, tumorske stanice koriste mehanizam autofagije kako bi ih prevladale i time osigurale preživljenje i rast u uznapredovanim karcinomima. U središtu tumora, opskrba stanica kisikom je niska i stanice su hipoksične te se u tim dijelovima aktivira autofagija. Delecija Beclin 1 dovodi do supresije autofagije te time povećava smrt stanice (White i diPaola, 2009). Nadalje, autofagijom se recikliraju intracelularne makromolekule čime se dobivaju supstrati koje brzorastuće stanice tumora koriste kako bi ispunile svoje povećane potrebe za energijom. Također, primijećeno je da u stanicama u kojima je autofagija onemogućena, dolazi do poremećaja u preživljenju stanica usred metaboličkoga stresa. Stoga, autofagija povećava toleranciju stanica na stres i time doprinosi njihovom preživljavanju. Dokazano je da je autofagija povećana i kod smrtonosnijih vrsta karcinoma s mutiranim genom za RAS proteine, male GTPaze koje sudjeluju u prijenosu signala za preživljenje, proliferaciju i metabolizam stanica. Zamijećeno je da je kod RAS mutiranih stanica s visokim razinama autofagije, preživljenje stanica ovisno o autofagiji tijekom uvjeta sa smanjenim dostupnim hranjivim tvarima (Yun i Lee, 2018).

2.3.2. Apoptoza

Apoptoza ili programirana stanična smrt je regulirani proces koji se javlja u višestaničnim organizmima kojim se uništavaju stanice koje više nisu potrebne ili predstavljaju prijetnju organizmu. Stanicu u kojoj se aktivirala apoptoza karakteriziraju specifične morfološke i

biokemijske promjene vidljive na slici 7. Dolazi do smanjivanja i kondenzacije stanice, raspada citoskeleta, raspada jezgrine membrane i fragmentiranja DNA. Na površini stanice koja je u apoptozi često se znaju formirati velike izbočine poput mjehurića. Ukoliko se radi o velikoj stanici, dolazi do tvorbe apoptotskih tijela, odnosno stanica se raspada na fragmente zatvorene membranom. U *in vivo* uvjetima ta apoptotska tijela s vremenom budu razgrađena od strane makrofaga ili nekih drugih okolnih stanica. Na taj način apoptoza *in vivo* ne uzrokuje upalu okolnog tkiva upravo zbog zadržavanja staničnih sastojaka unutar apoptotskih tijela (Alberts i sur., 2022).



Slika 7. Morfološke promjene stanice koja prolazi kroz proces apoptoze (*prema* NHGRI, 2024).

U procesu apoptoze sudjeluju kaspaze, proteolitički enzimi s cisteinskim ostatkom u svom aktivnom mjestu koji cijepaju specifične proteine u citoplazmi i jezgri i time aktiviraju staničnu smrt. Kaspaze su u stanici sintetizirane u svom neaktivnom obliku kao prokaspaze, a aktiviraju se proteolitičkim cijepanjem u specifičnom ostatku aspartata drugim kaspazama. Na ovaj način stvara se proteolitička kaskada kaspaza kojom se amplificirani signal za staničnu smrt brzo širi. Jednom kada se javi intracelularni ili ekstracelularni signal za aktivaciju apoptoze, dolazi do agregacije intracelularnih adaptorskih molekula i aktivacije inicijalne prokaspaze koja cijepa samu sebe, a zatim i ostale kaspaze u nizu. Vanjski put aktivacije apoptoze djeluje na način da se na stanične receptore vežu ekstracelularni ligandi i formira se aktivacijski kompleks DISC (engl. *Death-Inducing-Signalling-Complex*). Unutarnji put može biti aktiviran oštećenjem DNA, nedostatkom hormona rasta, kemoterapijskim sredstvima, virusnom infekcijom, citokinima, reaktivnim kisikovim vrstama, UV zračenjem, prisutnošću dvolančane RNA i dr., pri čemu se

povećava permeabilnost vanjske membrane mitohondrija (engl. *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*, MOMP) te dolazi do otpuštanja citokroma c iz međumembranskoga prostora mitohondrija u citosol i posljedično se formira veći aktivacijski kompleks apoptosom (Carneiro i El-Deiry, 2020).

Proteini koji su odgovorni za regulaciju aktivacije kaspaza spadaju u Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) i IAP (engl. *Inhibitor of apoptosis*) obitelj proteina. Bcl-2 skupina proteina odgovorna je za kontrolu unutarnjeg puta aktivacije apoptoze. Svrstavaju se u tri klase: (1) antiapoptotička skupina proteina koji sprječavaju MOMP i time ne dozvoljavaju apoptozu, u koju se ubrajaju Bcl-2 i Bcl-xL (sadrže četiri homologne domene: BH1 – BH4, a često mogu sadržavati i transmembransku domenu); (2) proapoptotička/efektorska skupina Bcl-2 proteina, koji stvaranjem otvora u vanjskoj membrani mitohondrija induciraju MOMP, te ovdje pripadaju Bak i Bax proteini; (3) sekundarna klasa proapoptotičkih proteina koji potiču apoptozu tako da reguliraju aktivnost drugih dviju klasa proteina, uključuju „BH3-only“ proteine (proteini koji sadrže samo BH3 domenu). Kako bi se stanica dodatno zaštitila od nepoželjne aktivacije kaspaza postoji i IAP skupina proteina. U spomenutu skupinu klasificira se protein XIAP (engl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*), koji direktno inhibira aktivnost kaspaza (Alberts i sur., 2022).

Izbjegavanje odlaska stanice u apoptozu usred poremećaja u njezinoj regulaciji jedno je od glavnih obilježja raka. U većini karcinoma prisutnih u ljudi protoonkogen Bcl-2 prekomjerno je eksprimiran i na taj način ne dozvoljava stanici da ode u apoptozu. Njegova povećana ekspresija povezana je razvojem rezistencije na kemoterapiju u više vrsta tumora, kao i s visokim stopama metastaziranja i slabom prognozom pacijenata u više od 60 % slučajeva raka dojke. Bcl-2 ostvaruje interakcije s proapoptotičkim članovima Bcl-2 obitelji proteina koji u svojoj strukturi imaju domenu BH3. Ovom se domenom proapoptotički proteini vežu na Bcl-2 i time ga inaktiviraju. BH3 domenu posjeduje i Beclin-1 protein važan u procesu autofagije, koji se također može vezati na Bcl-2. Kada je disociran s Bcl-2, Beclin-1 aktivira lipid kinazu u inicijalnim koracima autofagije. Po tome je Bcl-2 molekula koja inhibira signalne puteve u procesu apoptoze, kao i autofagije (Akkoç i sur., 2015).

U oko 50 % ljudskih tumora dolazi do mutacije u genu koji kodira za protein tumor supresor p53. Uslijed nastale mutacije, p53 više ne može inducirati apoptozu kao ni zastoje staničnoga ciklusa kao odgovor na nastalo oštećenje u DNA molekuli. Na ovaj način stanice nastave proliferirati iako ne bi trebale u uvjetima kada je prisutno oštećenje u DNA, što dovodi do nakupljanja mutacija i razvoja karakteristika koje čine rak zloćudnijim (Alberts i sur., 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki materijal

U eksperimentalnom dijelu izrade diplomskog rada korištena je stanična linija humanoga karcinoma dojke, MCF-7. MCF-7 je stanična linija koja potječe iz adenokarcinoma dojke, a izolirana je iz 69-godišnje pacijentice 1970. godine. Uspostavio ju je dr. Herbert Soule na institutu *Michigan Cancer Foundation*, od kuda i potječe sam naziv stanične linije. MCF-7 stanična linija pokazuje eksprimiran receptor za estrogen, a moguće ju je uzgojiti adherentno ili u suspenziji.

3.1.2. Kemikalije

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose* (4,5 g L⁻¹ glukoze, s L-glutaminom i natrijevim bikarbonatom), Capricorn Scientific, Njemačka
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose* (1,0 g L⁻¹ glukoze, s L-glutaminom i natrijevim bikarbonatom), Capricorn Scientific, Njemačka
- *Fetal Bovine Serum* (FBS, fetalni goveđi serum), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *0,25 % Trypsin-EDTA 1X* (trypsin-EDTA), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Laboratorij za toksikologiju, SUZG PBF, Zagreb, Hrvatska
- *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS), Merck, Njemačka
- *Trypan blue* boja, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *MTT (Thiazolyl Blue Tetrazoiul Bromide)*, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *Neutralrot*, E. MerckAg – Darmstadt, Njemačka
- kurkumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- pirazolni analog kurkumina, Laboratorij za organsku kemiju, SUZG PBF, Zagreb, Hrvatska
- apsolutni etanol (C₂H₅OH), Alkaloid, Skoplje
- DMSO (dimetilsulfoksid), Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska
- ledena octena kiselina (CH₃COOH), Kemika, Zagreb, RH
- destilirana voda (dH₂O)
- *Muse™ Autophagy LC3- antibody based Kit*, kat. br. MCH200109, Millipore, Merck Darmstadt, Njemačka
- *Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kit*, kat. broj MCH 100105, Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka

3.1.3. Otopine i puferi

	<u>DMEM High Glucose</u>	<u>DMEM Low Glucose</u>
Sastojci	Koncentracija (mg L⁻¹)	
<u>Anorganske soli</u>		
CaCl ₂ *2H ₂ O	265,00	265,00
Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O	0,10	0,10
MgSO ₄ *7H ₂ O	200,00	200,00
KCl	400,00	400,00
NaHCO ₃	3700,00	3700,00
NaCl	6400,00	6400,00
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	141,73	141,73
<u>Aminokiseline</u>		
glicin	30,00	30,00
L-arginin*HCl	84,00	84,00
L-cistein*2HCl	62,57	62,57
L-glutamin	584,00	584,00
L-histidin*HCl*H ₂ O	42,00	42,00
L-izoleucin	105,00	105,00
L-leucin	105,00	105,00
L-lizin*HCl	146,00	146,00
L-metionin	30,00	30,00
L-fenilalanin	66,00	66,00
L-serin	42,00	42,00
L-treonin	95,00	95,00
L-triptofan	16,00	16,00
L-tirozin*2Na*2H ₂ O	103,79	103,79
L-valin	94,00	94,00
<u>Vitamini</u>		
kolin klorid	4,00	4,00
folna kiselina	4,00	4,00
mio-inozitol	7,20	7,20
nikotinamid	4,00	4,00
D-kalcijev pantotenat	4,00	4,00
piridoksal*HCl	4,00	4,00

riboflavin	0,40	0,40
tiamin*HCl	4,00	4,00
<u>Ostalo</u>		
D-glukoza	4500,00	1000,00
fenol crveno natrijeva sol	15,90	15,90
natrijev piruvat	110,00	110,00

Phosphate Buffer Saline (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	do 1000 mL

0,4 %-tna otopina Trypan Blue

Trypan Blue	0,08 g
PBS pufer	20 mL
→ profiltrirati	

MTT stock otopina

MTT	25 mg
PBS pufer	5 mL
→ sterilno profiltrirati	

4 %-tna stock otopina Neutral Red

Neutral Red	4 g
dH ₂ O	100 mL
→ sterilno profiltrirati	

Radna otopina Neutral Red

stock otopina Neutral Red	125 µL
medij za uzgoj	100 mL

Otopina za odbojavanje *Neutral Red* boje

apsolutni etanol 50 % (v/v)

ledena octena kiselina 1 % (v/v)

dH₂O 49 % (v/v)

Ishodna otopina kurkumina

kurkumin 22,1028 mg

DMSO 3 mL

→ pripremljene su otopine kurkumina (CRC) tako da su u mediju za uzgoj postignute koncentracije od 2,5 do 100 μM

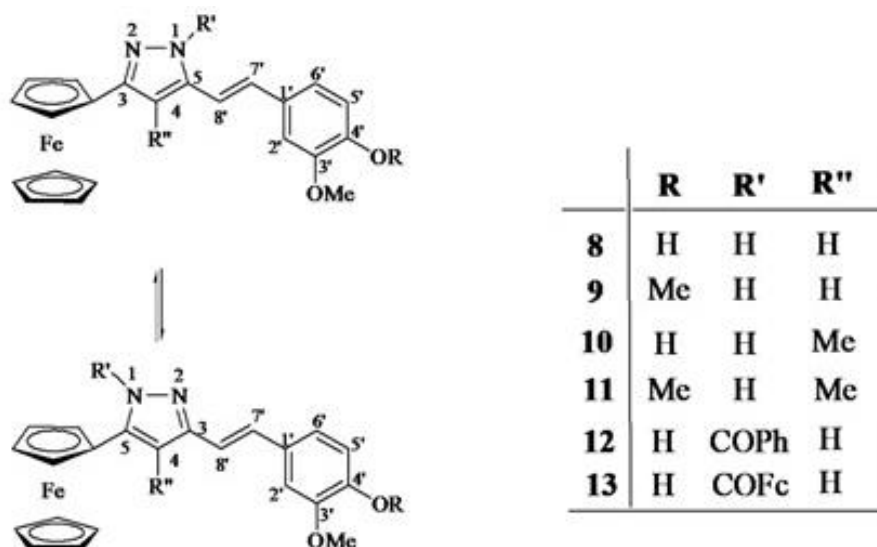
Ishodna otopina pirazolnog analoga kurkumina (PC)

U Laboratoriju za organsku kemiju SUZG PBF sintetiziran je novi pirazolni analog kurkumina (PC), čija je struktura dodatno modificirana uvođenjem ferocena (slika 8) u cilju poboljšanja biološkog djelovanja (antikancerogeni učinak) u odnosu na ishodni polifenol – CRC.

pirazolni analog kurkumina 16 mg

EtOH 1,6 mL

→ pripremljene su otopine pirazolnog analoga kurkumina (PC) tako da su u mediju za uzgoj postignute koncentracije od 2,5 do 100 μM



Slika 8. Struktura pirazolnog analoga kurkumina (broj 10 u tablici) sintetiziranog u Laboratoriju za organsku kemiju SUZG PBF

3.1.4. Oprema i uređaji

- komora za sterilan rad (laminar) HMC SafeGUARD Pro 1200, HMC Europe, Njemačka
- inkubator s kontroliranom atmosferom ICO105med, Automatic CO₂, Memmert, Njemačka
- svjetlosni mikroskop LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- inverzni mikroskop, Motic AE2000 s kamerom Moticam S6, MOTIC Deutschland GmbH, Njemačka
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica Assistant, Bright-Line, Njemačka
- hladnjak za čuvanje stanica na -80 °C, New Brunswick Scientific, UK
- vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija
- centrifuga Centrifuge 5425 R, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- spektrofotometar Helios-γ, Thermo Electron Corporation, UK
- Microplate Reader Infinite 200 PRO, TECAN, Austrija
- Guava® Muse™ Cell Analyzer, Luminex, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj i održavanje MCF-7 stanica u kulturi

MCF-7 stanična linija čuva se u zamrzivaču na -80 °C u mediju za zamrzavanje kojeg čini 80 % hranjivog medija za uzgoj (DMEM *High Glucose*, HGlcM), 10 % FBS-a i 10 % DMSO-a. Uzgoj započinje naglim odmrzavanjem stanica u inkubatoru pri 37 °C i kontroliranoj atmosferi s 95 % zraka i 5 % CO₂. Rad s kulturama stanica provodi se u komori za sterilan rad (laminaru), gdje su osigurani aseptični uvjeti. Nakon odmrzavanja, stanice se resuspendiraju u mediju za uzgoj, koji se sastoji od 90 % HGlcM-a i 10 % FBS-a. Stanice se zatim prebacuju u T-bocu i uzgajaju pri optimalnim uvjetima za njihov rast i razvoj – u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO₂) pri temperaturi od 37 °C. Kako bi stanice nastavile proliferirati, potrebno je redovito mijenjati hranjivi medij za uzgoj jer od tuda potječu potrebne hranjive tvari za njihov rast i razvoj.

MCF-7 stanice rastu adherentno i u monosloju, pričvršćene za površinu stijenke T-boce. Prilikom precijepljivanja, stanice je potrebno odvojiti od podloge na kojoj rastu pomoću proteolitičkog enzima tripsina. To se radi na način da se najprije iz T-boce uklanja iskorišteni medij za uzgoj, nakon čega se ostaci medija ispiru tripsinom. Nakon ispiranja, dodaje se 1 mL tripsina i stanice se stavljaju na inkubaciju nekoliko minuta. Djelovanjem tripsina stanice se odvajaju od površine T-boce i potom resuspendiraju u novom svježem mediju za uzgoj. Suspenzija stanica izdvaja se iz T-boce i uzorak suspenzije uzima se za brojanje stanica pod

svjetlosnim mikroskopom pomoću metode *Trypan Blue*. Nakon što se odredila koncentracija stanica u izdvojenom uzorku, računa se potrebni volumen stanične suspenzije koji treba nacijepiti kako bi se postigla željena početna koncentracija stanica za uzgoj. Za daljnji uzgoj u T-boci početna koncentracija nacijepljenih stanica treba iznositi 1×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj.

3.2.2. Metode za određivanje proliferacije i vijabilnosti stanica

3.2.2.1. *Trypan Blue* metoda

Metoda *Trypan Blue* koristi se za određivanje broja živih i mrtvih stanica u staničnoj suspenziji. Princip metode temelji se na činjenici da mrtve stanice imaju oštećenu staničnu membranu zbog čega boja *Trypan Blue* može ući u stanice i obojiti ih plavo. S druge strane, žive stanice imaju očuvanu staničnu membranu, stoga boja ne može ući u njih i one ostaju nebojane. Kultura MCF-7 stanica u koncentraciji 1×10^5 st mL^{-1} nacijepi se u jažice 6-*well* ploča (4 mL/jažica).

Iz suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica izuzme se 20 μL uzorka i pomiješa s 20 μL 0,4 %-tne otopine *Trypan Blue* boje. Uzorak se dobro resuspendira, a zatim se 20 μL uzorka nanese na Fuchs-Rosenthalovu komoricu za brojanje stanica. Komorica se sastoji od 16 velikih kvadrata čije krajeve označava trostruka linija, a unutar svakog velikog kvadrata je 16 manjih kvadrata. Stanice se broje u 4 velika središnja kvadrata, nakon čega se izračuna srednja vrijednost izbrojanih stanica i dobiveni broj množi s 10^4 kako bi se dobio broj stanica po mL originalne suspenzije, odnosno primjenjuje se sljedeća jednadžba:

$$\text{koncentracija stanica} = \text{srednja vrijednost izbrojanih stanica} \times 10^4 \text{ (stanica } \text{mL}^{-1}\text{)}$$

3.2.2.2. *MTT* metoda

MTT je tetrazolijeva sol žute boje topljiva u vodi, koja se ulaskom u žive stanice djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza prevodi u kristale formazana ljubičaste boje topljive u organskim otapalima. MTT se može prevesti u formazan samo u živim stanicama s aktivnim mitohondrijem. U sterilnim uvjetima u jažice 96-*well* ploče u kojima se uzgaja stanična kultura (100 μL suspenzije MCF-7 stanica u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1}) dodaje se ishodna otopina MTT-a (na 100 μL stanične suspenzije dodaje se 10 μL ishodne otopine MTT-a). Nakon dodatka MTT-a slijedi inkubacija ploča pri 37 °C u trajanju od 3 sata. Završetkom inkubacije iz jažica se uklanja medij za uzgoj te se dodaje organsko otapalo (DMSO) u volumenu istovjetnom volumenu u kojem je u jažice nacijepljena stanična suspenzija – 100 μL . Mjerenjem na čitaču mikrotitarskih ploča pri 540 nm određuje se intenzitet nastalog obojenja koje je proporcionalno broju živih, metabolički aktivnih stanica.

3.2.2.3. *Neutral Red metoda*

Iz jažica *multiwell* ploča u kojima se uzgaja stanična kultura (MCF-7 stanice naciijepljene u koncentraciji 1×10^5 st mL^{-1} , 2 mL/jažica) najprije se uklanja hranjivi medij za uzgoj stanica, nakon čega slijedi ispiranje ostatka medija s 1 mL sterilnog PBS-a. Nakon toga u jažice se dodaje 1 mL radne otopine *Neutral Red* boje koja se akumulira unutar lizosoma živih stanica te se ploče stavljaju na inkubaciju pri 37 °C u vremenskom trajanju od 3 sata. Nakon inkubacije, otopina boje se uklanja i stanice se ispiru PBS-om. Slijedi dodavanje 2 mL otopine za odbojavanje te se ploče zatim stavljaju na tresilicu 20 minuta. Nakon toga mjeri se intenzitet nastalog obojenja spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je broju živih stanica.

3.2.3. Analiza stanične smrti protočnom citometrijom

3.2.3.1. *Autofagija*

Analiza autofagije provedena je prema protokolu *Muse™ Autophagy LC3- antibody based Kit*. Iz jažica *6-well* ploča uklanja se medij za uzgoj nakon čega se stanice ispiru s po 500 μL PBS-a. U jažice se zatim dodaje 500 μL PBS-a + 5 μL reagensa A (engl. *autophagy reagent A*, ArA) te se ploče stavljaju na inkubaciju u trajanju od 4 sata. Nakon inkubacije, stanice se ponovno ispiru s po 500 μL PBS-a i dodaje se 500 μL tripsina te slijedi kratka inkubacija kako bi se stanice odvojile od površine na kojoj rastu. Stanice se zatim izdvajaju u *ependorf* tubice (2 mL) i u njih se dodaje po 500 μL PBS-a, slijedi centrifugiranje pri 2500 rpm 5 minuta na 4°C. Supernatant se uklanja, a na stanice zaostale u talogu dodaje se 5 μL Anti-LC3 Alexa Flour®555 + 95 μL 1X reagensa B (engl. *1X autophagy reagent B*, ArB). Stanice se zatim bojaju u mraku na ledu 30 minuta, te slijedi centrifugiranje pri 2500 rpm 5 minuta na 4 °C. Supernatant se uklanja, stanice se ispiru puferom (engl. *1X Assay Buffer*, 1X AB) i ponovno centrifugiraju pri istim uvjetima. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice se resuspendiraju u 200 μL 1X AB. Uzorak se potom nanosi na *Muse™* protočni citometar te se očitavaju podaci o indukciji autofagije iz prikaza histograma na temelju inteziteta fluorescencije uzorka.

3.2.3.2. *Apoptoza*

Analiza apoptoze provedena je prema protokolu *Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kit*. Iz jažica *6-well* ploča uklanja se medij, stanice se ispiru s po 500 μL PBS-a te se potom dodaje 500 μL tripsina. Ploče se stavljaju na kratku inkubaciju kako bi se stanice odvojile od podloge. U jažice se zatim vraća 500 μL prethodno uklonjenog medija. U *ependorf* tubicama od 2 mL resuspendira se 100 μL stanične suspenzije sa 100 μL *Muse™ Annexin V & Dead Cell* reagensa kako bi se dobio uzorak za analizu. Pripremljeni uzorak inkubira se na sobnoj temperaturi u mraku 20 minuta. Uzorak se zatim nanosi na *Muse™* protočni citometar te se

očitavaju podaci o udjelu pojedinih frakcija stanica u kulturi - živih i mrtvih te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi.

3.2.4. Određivanje učinka nutritivne deprivacije na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica

Pripremljene su suspenzije MCF-7 stanica u HGlcM ili LGlcM hranjivim medijima te u navedenim medijima razrijeđenim s PBS-om ili HBSS-om u različitim omjerima (tablica 1).

Tablica 1. Mediji za uzgoj stanica korišteni pri određivanju učinka nutritivne deprivacije na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica

Opis uvjeta	Kratika
DMEM <i>High Glucose</i> * hranjivi medij	HGlcM
DMEM <i>Low Glucose</i> * hranjivi medij	LGlcM
$\frac{2}{3}$ DMEM <i>High Glucose</i> * hranjivog medija i $\frac{1}{3}$ HBSS pufera	$\frac{2}{3}$ HGlcM + $\frac{1}{3}$ HBSS
$\frac{1}{2}$ DMEM <i>High Glucose</i> * hranjivog medija i $\frac{1}{2}$ HBSS pufera	$\frac{1}{2}$ HGlcM + $\frac{1}{2}$ HBSS
$\frac{2}{3}$ DMEM <i>High Glucose</i> * hranjivog medija i $\frac{1}{3}$ PBS pufera	$\frac{2}{3}$ HGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS
$\frac{1}{2}$ DMEM <i>High Glucose</i> * hranjivog medija i $\frac{1}{2}$ PBS pufera	$\frac{1}{2}$ HGlcM + $\frac{1}{2}$ PBS
$\frac{2}{3}$ DMEM <i>Low Glucose</i> * hranjivog medija i $\frac{1}{3}$ HBSS pufera	$\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ HBSS
$\frac{1}{2}$ DMEM <i>Low Glucose</i> * hranjivog medija i $\frac{1}{2}$ HBSS pufera	$\frac{1}{2}$ LGlcM + $\frac{1}{2}$ HBSS
$\frac{2}{3}$ DMEM <i>Low Glucose</i> * hranjivog medija i $\frac{1}{3}$ PBS pufera	$\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS
$\frac{1}{2}$ DMEM <i>Low Glucose</i> * hranjivog medija i $\frac{1}{2}$ PBS pufera	$\frac{1}{2}$ LGlcM + $\frac{1}{2}$ PBS

*medij za uzgoj + 10 % FBS-a

U jažice *multiwell* ploča nacijepljena je suspenzija MCF-7 stanica prema protokolima opisanim u 3.2.2.1; 3.2.2.2; 3.2.2.3 (ovisno o primijenjenoj metodi) kako bi se pratio učinak nutritivne deprivacije potaknut uzgojem u različitim medijima (tablica 1). Stanice kultivirane u HGlcM ili LGlcM mediju (uz dodatak 10 % FBS-a) praćene su kao kontrolni uzorci. Proliferacija i vijabilnost stanica praćena je svaka 24 sata metodom MTT tijekom 96 sati, dok su metode

Neutral Red i *Trypan Blue* provedene nakon 48h.

3.2.5. Određivanje učinka nutritivne deprivacije na indukciju autofagije/apoptoze u MCF-7 kulturi stanica

3.2.5.1. *Analiza autofagije u kulturi MCF-7 stanica pri uvjetima nutritivne deprivacije*

Pripremljene su suspenzije MCF-7 stanica (1×10^5 stanica mL^{-1}) u HGlcM ili LGlcM hranjivim medijima te u navedenim medijima razrijeđenim s PBS-om ili HBSS-om u različitim omjerima prema tablici 1. U svaku jažicu 6-*well* ploče nacijepi se po 4 mL pripremljene stanične suspenzije. Nakon inkubacije od 48 sati, metodom protočne citometrije određuje se indukcija autofagije u uzorcima prema protokolu opisanom u 3.2.3.1.

3.2.5.2. *Analiza apoptoze u kulturi MCF-7 stanica pri uvjetima nutritivne deprivacije*

Pripremljene su suspenzije MCF-7 stanica (1×10^5 stanica mL^{-1}) u HGlcM ili LGlcM hranjivim medijima te u navedenim medijima razrijeđenim s PBS ili HBSS u različitim omjerima prema tablici 1. U svaku jažicu 6-*well* ploče nacijepi se po 4 mL pripremljene stanične suspenzije. Nakon inkubacije od 48 sati, metodom protočne citometrije određuje udio živih, apoptotskih i mrtvih stanica prema protokolu opisanom u 3.2.3.2.

3.2.6. Određivanje učinka kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima deprivacije glukoze na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica

Istraživanje učinka CRC-a i PC-a na vijabilnost stanica kultiviranih u HGlcM ili LGlcM provedeno je na dva načina. Najprije su stanice nacijepljene u mediju za uzgoj (5×10^4 stanica mL^{-1} , 100 μL /jažica) u koji je dodan CRC ili PC tako da su u mediju postignute željene koncentracije od 2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 μM . Stanice kultivirane u HGlcM ili LGlcM mediju (uz dodatak 10 % FBS-a) + otapalo (DMSO/EtOH; 5 μL mL^{-1}) praćene su kao kontrolni uzorci. Vijabilnost stanica kvantificirana je svaka 24 sata MTT metodom tijekom 96 sati.

Drugi način istraživanja učinka CRC-a i PC-a na vijabilnost stanica kultiviranih u HGlcM ili LGlcM proveden je tako da su stanice najprije nacijepljene u mediju te su nakon 24 h (kada su se stanice već prihvatile za dno jažica i formirale monosloj) tretirane ispitivanim spojem. Vijabilnost stanica praćena je nakon 72 sata MTT metodom. Dodatno je učinak CRC-a na stanice kultivirane u LGlcM određen metodama *Neutral Red* i *Trypan Blue*.

3.2.7. Određivanje učinka kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima nutritivne deprivacije na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica

U jažice 96-*well* ploče nacijepljeno je po 100 μL suspenzije MCF-7 stanica (konc. 5×10^4

mL⁻¹) u $\frac{2}{3}$ HGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju, uz dodatak 10 % FBS-a. Nakon 24 sata stanice su tretirane različitim koncentracijama CRC-a/PC-a, tako da su u medijima za uzgoj postignute koncentracije od 2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 μ M. Stanice kultivirane u HGlcM ili LGlcM mediju (uz dodatak 10 % FBS-a) + otapalo (DMSO/EtOH; 5 μ L mL⁻¹) praćene su kao kontrolni uzorci. Vijabilnost stanica određena je MTT metodom nakon 72 sata. Dodatno je učinak CRC-a na stanice kultivirane u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS određen metodama *Neutral Red* i *Trypan Blue*.

3.2.8. Analiza autofagije nakon tretmana MCF-7 stanica kurkuminom uzgajanih u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS

Pripremljene su suspenzije MCF-7 stanica u LGlcM mediju i u mediju $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS, uz dodatak 10 % FBS-a (1×10^5 stanica mL⁻¹ medija za uzgoj). U jažice 6-*well* ploče nacijepljeno je po 4 mL pripremljenih staničnih suspenzija. Nakon 24 sata inkubacije stanice su tretirane različitim koncentracijama CRC-a kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije spoja od 5; 50 i 100 μ M. Stanice kultivirane u LGlcM (uz dodatak 10 % FBS-a) + otapalo (DMSO; 5 μ L mL⁻¹) praćene su kao kontrolni uzorci. Ploče se inkubiraju u trajanju od 72 sata te se nakon toga metodom protočne citometrije određuje indukcija autofagije u uzorcima. Protokol provođenja analize opisan je u poglavlju 3.2.3.1.

3.2.9. Analiza apoptoze nakon tretmana MCF-7 stanica kurkuminom uzgajanih u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS

Pripremljene su suspenzije MCF-7 stanica u LGlcM mediju i u mediju $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS, uz dodatak 10 % FBS-a (1×10^5 stanica mL⁻¹ medija za uzgoj). U jažice 6-*well* ploče nacijepljeno je po 4 mL pripremljenih staničnih suspenzija. Nakon 24 sata inkubacije stanice su tretirane različitim koncentracijama CRC-a kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije spoja od 5; 50 i 100 μ M. Stanice kultivirane u LGlcM (uz dodatak 10 % FBS-a) + otapalo (DMSO; 5 μ L mL⁻¹) praćene su kao kontrolni uzorci. Ploče se zatim stavljaju na inkubaciju 72 sata te se nakon toga metodom protočne citometrije određuje udio živih, apoptotskih i mrtvih stanica. Protokol provođenja analize opisan je u poglavlju 3.2.3.2.

3.3. OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

gdje je N = ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka.

Statistička analiza provedena je Studentovim *t*-testom, a *t* vrijednost izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 - S_{\bar{x}_2}^2}}$$

Statistički značajnim smatrane su one razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti (*p*) bio manji od 0,05 ($p < 0,05$).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako bi podržale svoju nekontroliranu proliferaciju, kancerozne stanice karakteriziraju povećane energetske i biosintetske potrebe u odnosu na normalne stanice, stoga jedan od pristupa na koji se oslanjaju terapije za tretman raka uključuje deprivaciju nutrijentima. Zabilježeno je da nutritivna deprivacija može pojačati učinak već postojećih antitumorskih lijekova i efikasnost samih terapija (Khajah i sur., 2022). Kurkumin i njegovi derivati poboljšanih svojstava u središtu su brojnih istraživanja posljednjih nekoliko godina upravo zbog njihove dokazane uloge u zaustavljanju razvoja, rasta i daljnje progresije karcinoma. Također, kurkumin direktno inhibira transportere za unos najkorištenijeg metaboličkoga supstrata stanica raka – glukoze (Gunnink i sur., 2016). Cilj je ovoga istraživanja stoga bio najprije ispitati utjecaj nutritivne deprivacije, a zatim i utjecaj nutritivne deprivacije u kombinaciji s kurkuminom i pirazolnim analogom kurkumina na inhibiciju rasta stanica raka dojke i indukciju stanične smrti.

4.1. UČINAK NUTRITIVNE DEPRIVACIJE NA VIJABILNOST, PROLIFERACIJU I INDUKCIJU SMRTI MCF-7 STANICA

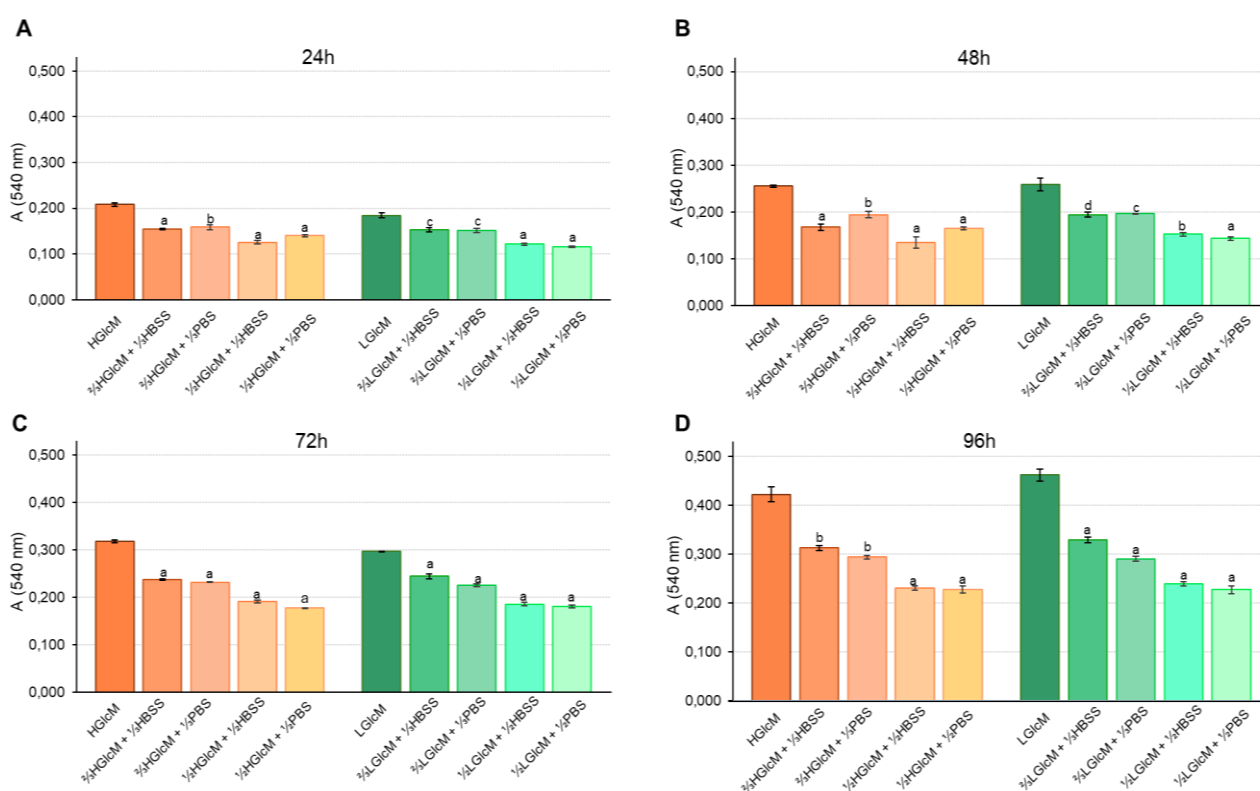
Kako bi se u staničnom okolišu postigli uvjeti nutritivne deprivacije, pripremljeno je nekoliko kombinacija razrijeđenih hranjivih medija za uzgoj stanica, na način da su DMEM *High Glucose* i DMEM *Low Glucose* hranjivi mediji u određenim omjerima razrijeđeni HBSS i PBS puferom (tablica 1). Vijabilnost i proliferacija stanica kultiviranih u razrijeđenim hranjivim medijima praćeni su metodom MTT svaka 24 sata tijekom 96 sati, te metodama *Neutral Red* i *Trypan Blue* nakon 48 sati. Također, praćen je i učinak nutritivne deprivacije na indukciju apoptoze i autofagije nakon 48 sati metodom protočne citometrije.

4.1.1. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom MTT

Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica praćen je metodom MTT 24, 48, 72 i 96 sati nakon naciepljivanja stanica. Dobiveni rezultati (3 mjerenja po uzorku) statistički su obrađeni i prikazani grafički na slici 9 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška.

Prema slici 9, vidljivo je da nakon 24 sata vijabilnost stanica statistički značajno opada u odnosu na kontrolni uzorak (stanice uzgajane u nerazrijeđenom mediju) kako se koncentracija nutrijenata u hranjivom mediju smanjuje, a isti trend vidljiv je i nakon 48, 72 i 96 sati. Nadalje, uočeno je da nakon 96 sati stanice slabije rastu u medijima razrijeđenim PBS-om nego HBSS-om. Također je vidljivo da nema značajne razlike između vijabilnosti stanica uzgajanih u HGICM

mediju i vijabilnosti stanica uzgajanih u LGlcM mediju kod istih omjera razrijeđenja medija i pufera. Koncentracija dostupne glukoze nije bio parametar koji je ograničavao vijabilnost stanica, već je negativan utjecaj na staničnu proliferaciju imala deprivacija svih dostupnih nutrijenata. Navedeno je u suprotnosti s dosad provedenim istraživanjima gdje se ispitivao utjecaj različitih koncentracija glukoze na rast stanica raka dojke čiji su rezultati pokazali da je vijabilnost stanica u ovisnosti o koncentraciji dostupne glukoze (Khajah i sur., 2022; Demirel i sur., 2019).



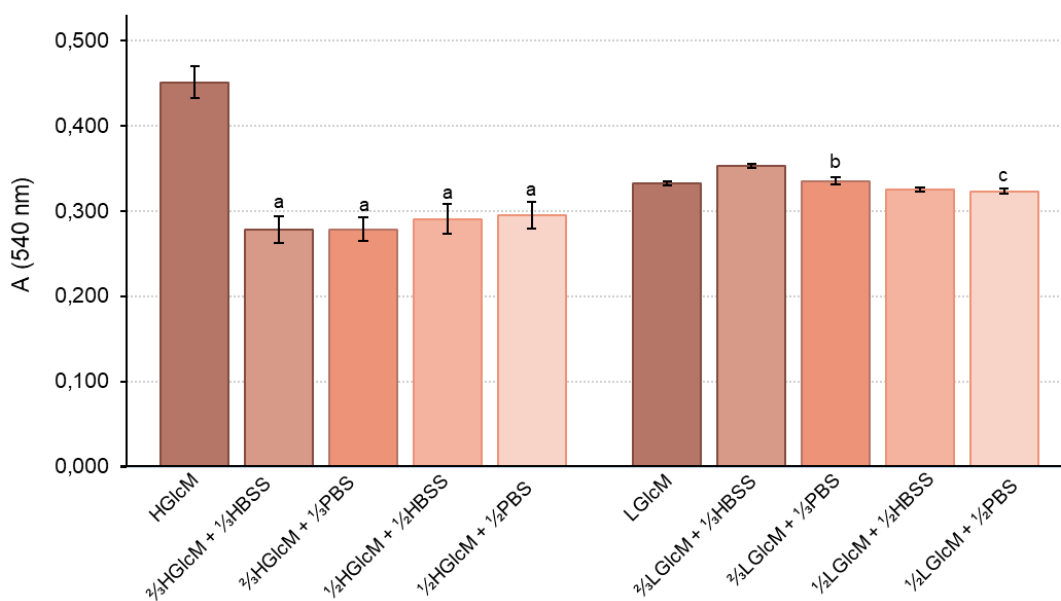
Slika 9. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica nakon 24 (A), 48 (B), 72 (C) i 96 sati (D), određen metodom MTT. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (HGlcM i LGlcM) (Student *t*-test): ^dp<0,025, ^cp<0,01, ^bp<0,005, ^ap<0,001. HGlcM – DMEM *High Glucose* hranjivi medij; LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij; HBSS – engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*; PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*

4.1.2. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica praćen je metodom *Neutral Red* 48 sati nakon naciijepljivanja stanica. Dobiveni rezultati (4 mjerenja po uzorku) statistički su obrađeni i prikazani grafički na slici 10 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška.

Na slici 10 vidljivo je da je vijabilnost stanica u LGlcM mediju smanjena u odnosu na vijabilnost stanica koje su rasle u HGlcM mediju s većom koncentracijom dostupne glukoze. Razrijeđivanjem HGlcM medija zamijećen je statistički značajan ($p < 0,001$) pad u vijabilnosti stanica u odnosu na nerazrijeđeni medij, dok se s druge strane razrijeđivanjem LGlcM medija vijabilnost nije znatno promijenila, odnosno smanjivanje koncentracije nutrijenata u hranjivom mediju nije imalo značajan utjecaj na proliferaciju stanica.

Dobiveni rezultati mogu se objasniti prilagodbom stanica raka na nepovoljne uvjete niskih koncentracija nutrijenata, što im omogućuje preživljenje, a navedeno su u svojem istraživanju dokazali Tsai i sur. (2021). Na temelju eksperimenata koje su proveli, ustanovili su da su stanice raka gušterače koje su bile prilagođene na rast u uvjetima deprivacije nutrijenata, konkretnije na niske koncentracije glukoze i glutamina, pokazale pojačanu proliferaciju u odnosu na stanice koje nisu bile prilagođene na opisane uvjete. Stanice koje su prethodno preživjele nutritivnu deprivaciju stekle su reverzibilne negenetske prilagodbe koje su im omogućile prebacivanje između metaboličkih stanja optimalnih za rast u uvjetima suviška hranjivih tvari ili u uvjetima njihova nedostatka.

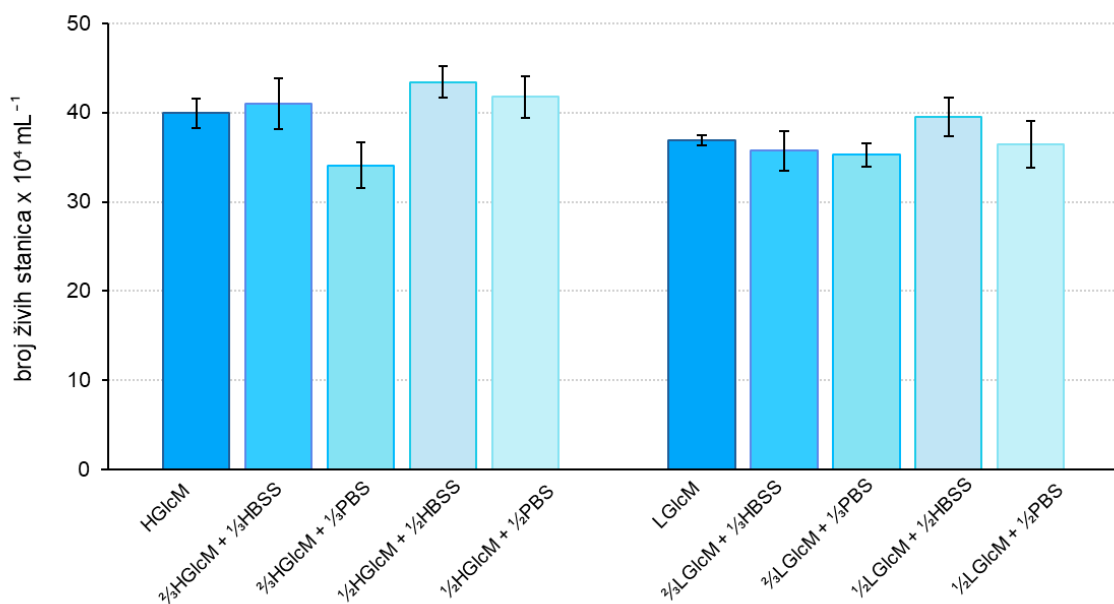


Slika 10. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica nakon 48 sati, određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (HGlcM i LGlcM) (Student *t*-test): ^cp<0,05, ^bp<0,005, ^ap<0,001. HGlcM – DMEM *High Glucose* hranjivi medij; LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij; HBSS – engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*; PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*

4.1.3. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica praćen je metodom *Trypan Blue* 48 sati nakon naciepljivanja stanica. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni (4 mjerenja po uzorku) i prikazani grafički na slici 11 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška.

Na slici 11 vidljivo je da razrjeđivanje HGlcM ili LGlcM medija nije uzrokovalo statistički značajne promjene u proliferaciji stanica te da su stanice uzgajane u LGlcM mediju rasle nešto slabije nego u HGlcM mediju.



Slika 11. Učinak nutritivne deprivacije na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica nakon 48 sati, određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica mL⁻¹ ± standardna pogreška.

HGlcM – DMEM *High Glucose* hranjivi medij; LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij; HBSS – engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*; PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*

4.1.4. Učinak nutritivne deprivacije na indukciju autofagije

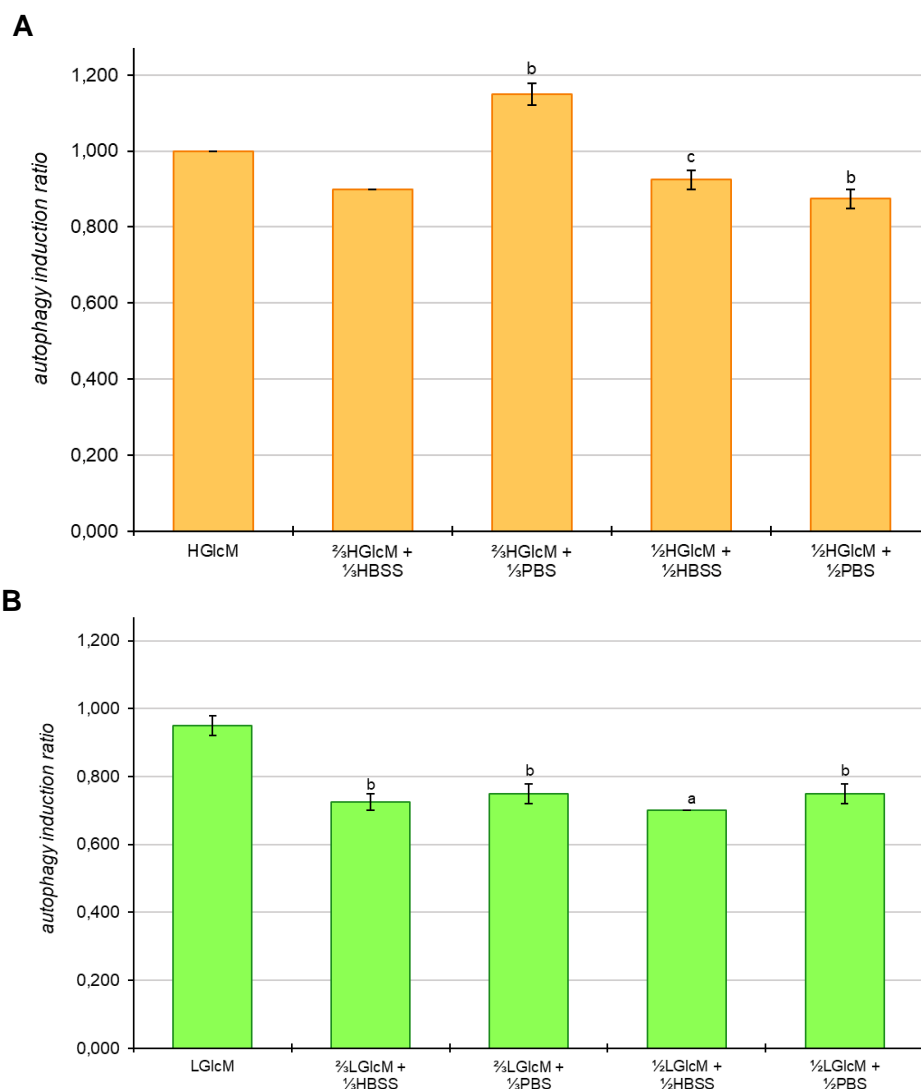
Učinak nutritivne deprivacije na indukciju autofagije u MCF-7 staničnoj liniji nakon 48 sati određen je metodom protočne citometrije i primjenom *Muse™ autophagy LC3-antibody based kit-a*. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na slici 12, dok su reprezentativni uzorci – histogrami (engl. *Autophagy induction profile*) prikazani na slici 13.

Iz slike 12 vidljivo je kako je nutritivna deprivacija jedino kod kombinacije medija i pufera $\frac{2}{3}$ HGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS uzrokovala porast stanica koje podliježu autofagiji u odnosu na kontrolni uzorak (HGlcM) te je navedeni učinak bio statistički značajan ($p < 0,001$). Kod ostalih uzoraka, udjeli stanica koje odumiru autofagijom bili su manji u odnosu na kontrolni uzorak.

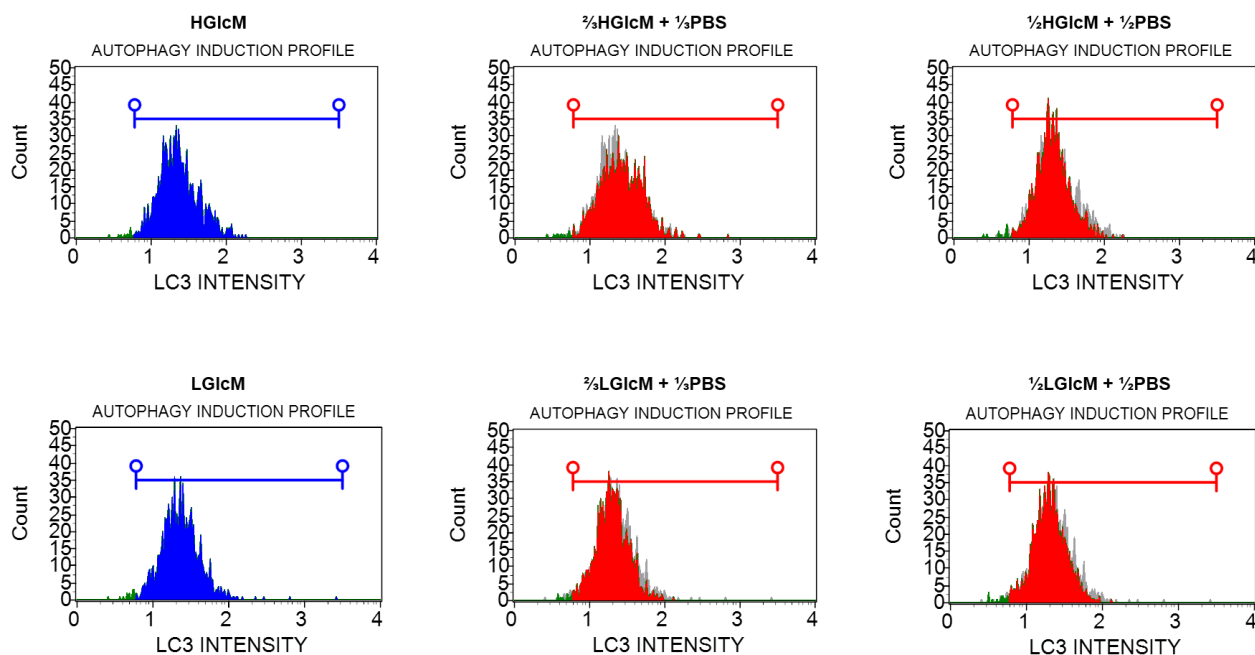
Istraživanje provedeno od strane Walker i sur. (2018), u kojem su se ispitali zaštitni mehanizmi u stanicama raka dojke tijekom deprivacije glukozom, pokazalo je da je autofagija inducirana tijekom uvjeta nedostatka glukoze. Blokiranje autofagije farmakološki s klorokinom ili delecijom gena ključnog za proces autofagije poput Beclin 1 ili ATG7 značajno je smanjilo sposobnost preživljenja stanica tijekom deprivacije glukozom (Walker i sur., 2018).

Drugo je istraživanje ispitalo ulogu YAP proteina u promjeni fluksa autofagije kako bi se promoviralo preživljenje MCF-7 stanica u uvjetima nutritivne deprivacije. Rezultati su dokazali da su normalne razine autofagije potrebne kako bi MCF-7 stanice preživjele uvjete nutritivne

deprivacije te da blokiranjem autofagije suprimiranjem lizosomalne degradacije dolazi do smanjene sposobnosti stanica za preživljenje i brzog nastupanja apoptoze (Song i sur., 2015).



Slika 12. Evaluacija autofagije kod MCF-7 stanica kultiviranih u razrijeđenim HGlcM (**A**) i LGlcM (**B**) medijima nakon 48 sati metodom protočne citometrije. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (HGlcM i LGlcM) (Student *t*-test): ^c*p*<0,025, ^b*p*<0,005, ^a*p*<0,001
 HGlcM – DMEM *High Glucose* hranjivi medij; LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij; HBSS – engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*; PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*



Slika 13. Reprezentativni uzorci – histogrami (engl. *Autophagy induction profile*) dobiveni nakon 48 sati za MCF-7 stanice u uvjetima nutritivne deprivacije metodom protočne citometrije

HGlcM – DMEM *High Glucose* hranjivi medij; LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij; HBSS – engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*; PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*

4.1.5. Učinak nutritivne deprivacije na indukciju apoptoze

Učinak nutritivne deprivacije na indukciju apoptoze u MCF-7 staničnoj liniji određen je metodom protočne citometrije i primjenom *Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kit-a*. Stanične suspenzije različitih koncentracija nutrijenata (tablica 1) naciepljene su u volumenu od 4 mL u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji stanica od 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. 48 sati nakon naciepljivanja stanica, primjenom *Muse™* protočnoga citometra provedena je kvantitativna analiza živih i mrtvih stanica te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi.

Rezultati analize dobiveni *Muse™* protočnim citometrom prikazani su kao *dot-plot* dijagrami iz kojih se podaci iščitavaju na sljedeći način: u donjem lijevom kvadratu prikazana je subpopulacija živih stanica (7-AAD (-)/aneksin V (-)), u donjem desnom nalazi se populacija stanica u ranoj apoptozi (7-AAD (-)/aneksin V (+)), u gornjem desnom kvadratu prikazan je udio stanica u kasnoj apoptozi (7-AAD (+)/aneksin V (+)), dok je u gornjem lijevom vidljiva subpopulacija mrtvih stanica ((7-AAD (+)/aneksin V (-)).

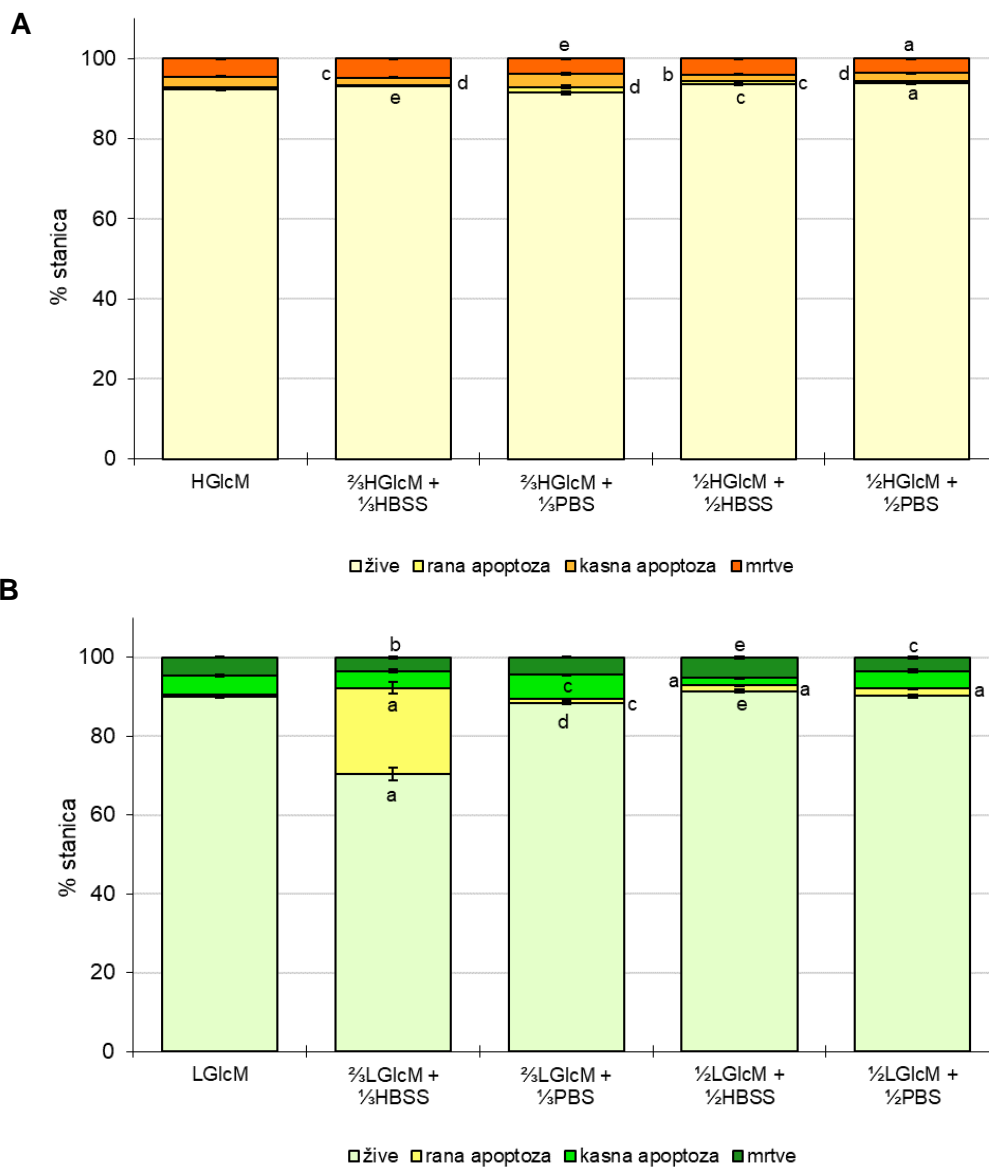
Dobiveni rezultati analize apoptoze MCF-7 stanica u uvjetima nutritivne deprivacije prikazani su kao udjeli živih i mrtvih stanica te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (slika 14) te isto tako kao reprezentativni *dot-plot* dijagrami sa četiri različite subpopulacije MCF-7 stanica (slika 15). Za određivanje učinka nutritivne deprivacije provedeno je 4 – 8 mjerenja.

Na slici 14 A uočeno je da smanjenje koncentracija dostupnih nutrijenata razrijeđivanjem

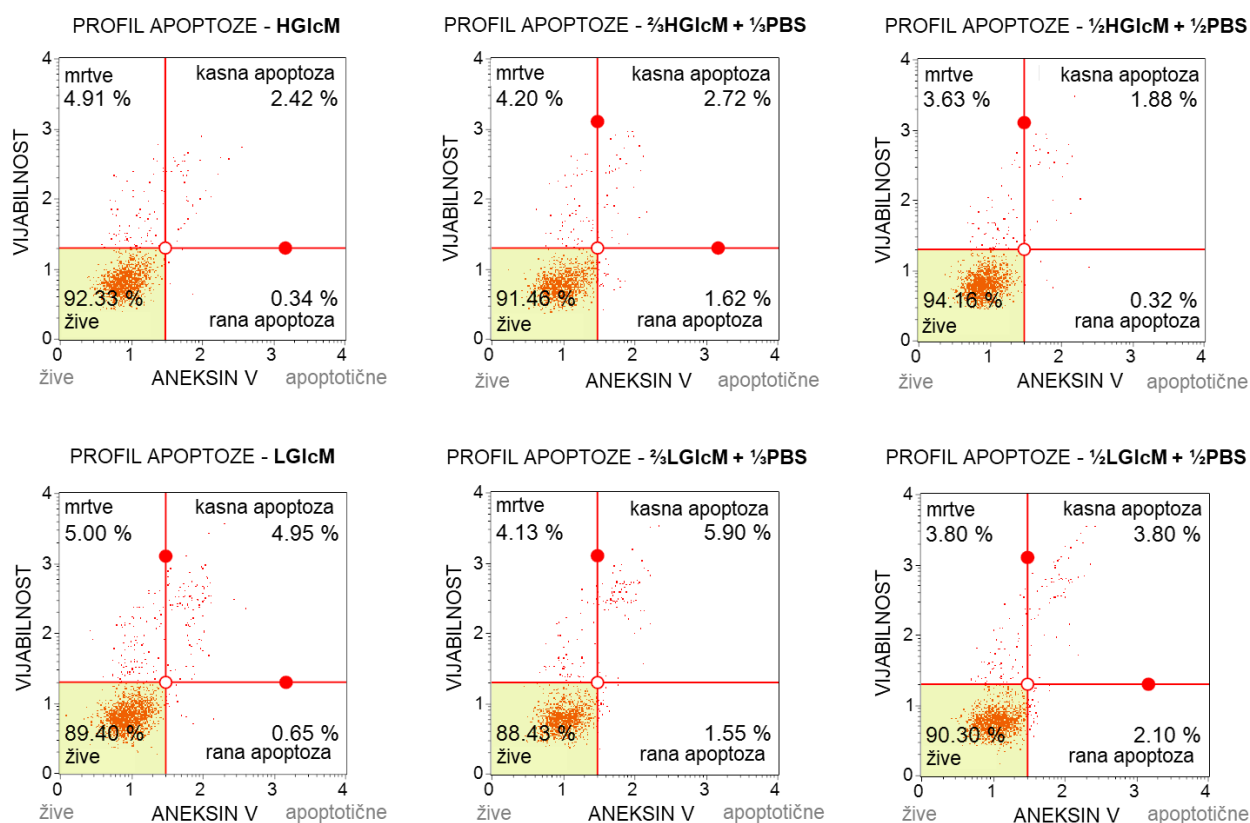
HGlcM medija nema značajan utjecaj na promjenu postotka živih stanica u populaciji. Udio ukupnih stanica u apoptozi (ranoj i kasnoj) prilikom uzgoja u HGlcM mediju iznosi 3,22 %, a razrijeđivanjem medija s $\frac{1}{3}$ PBS pufera taj postotak raste na 4,67 % ($p < 0,005$). Postotak mrtvih stanica kultiviranih u razrijeđenim medijima je neznatno manji, no statistički značajan u odnosu na kontrolni uzorak (udio mrtvih stanica u kulturi/kontrolni uzorak - 4,47 %), s izuzetkom $\frac{2}{3}$ HGlcM + $\frac{1}{3}$ HBSS medija gdje taj postotak nešto viši i iznosi 4,73 %.

Uzgoj u mediju s nižom koncentracijom glukoze u odnosu na HGlcM rezultirao je nešto višim udjelom stanica u apoptozi i nižom vijabilnošću stanica. Najizraženiji učinak na vijabilnost stanica i indukciju apoptoze zamjećen je prilikom uzgoja stanica u LGlcM mediju razrijeđenim s $\frac{1}{3}$ HBSS (slika 14 B).

Nutritivna deprivacija dakle blago inducira apoptozu u HGlcM i LGlcM medijima, a uočeno je da su udjeli ukupnih apoptotskih stanica u populaciji nešto viši kod LGlcM medija nego kod HGlcM medija pri istim omjerima razrjeđenja. Nedostatak glukoze u staničnom okolišu dakle blago inducira staničnu smrt apoptozom, što se podudara s rezultatima dobivenima u istraživanju Choi i sur. (2013).



Slika 14. Učinak nutritivne deprivacije na udjele živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica u HBSS ili PBS razrijeđenim HGlcM (**A**) i LGlcM (**B**) medijima nakon 48 sati, određen metodom protočne citometrije. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (HGlcM ili LGlcM) (Student *t*-test): ^e*p*<0,05, ^d*p*<0,025, ^c*p*<0,01, ^b*p*<0,005, ^a*p*<0,001
 HGlcM – DMEM *High Glucose* hranjivi medij; LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij; HBSS – engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*; PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*



Slika 15. Reprezentativni dot-plot dijagrami za MCF-7 stanice nakon 48 sati u uvjetima nutritivne deprivacije, dobiveni metodom protočne citometrije
 HGlcM – DMEM High Glucose hranjivi medij; LGlcM – DMEM Low Glucose hranjivi medij; HBSS – engl. Hanks' Balanced Salt Solution; PBS – engl. Phosphate Buffered Saline

4.2. UČINAK KURKUMINA I PIRAZOLNOG ANALOGA KURKUMINA U UVJETIMA NUTRITIVNE DEPRIVACIJE NA VIJABILNOST, PROLIFERACIJU I INDUKCIJU SMRTI MCF-7 STANICA

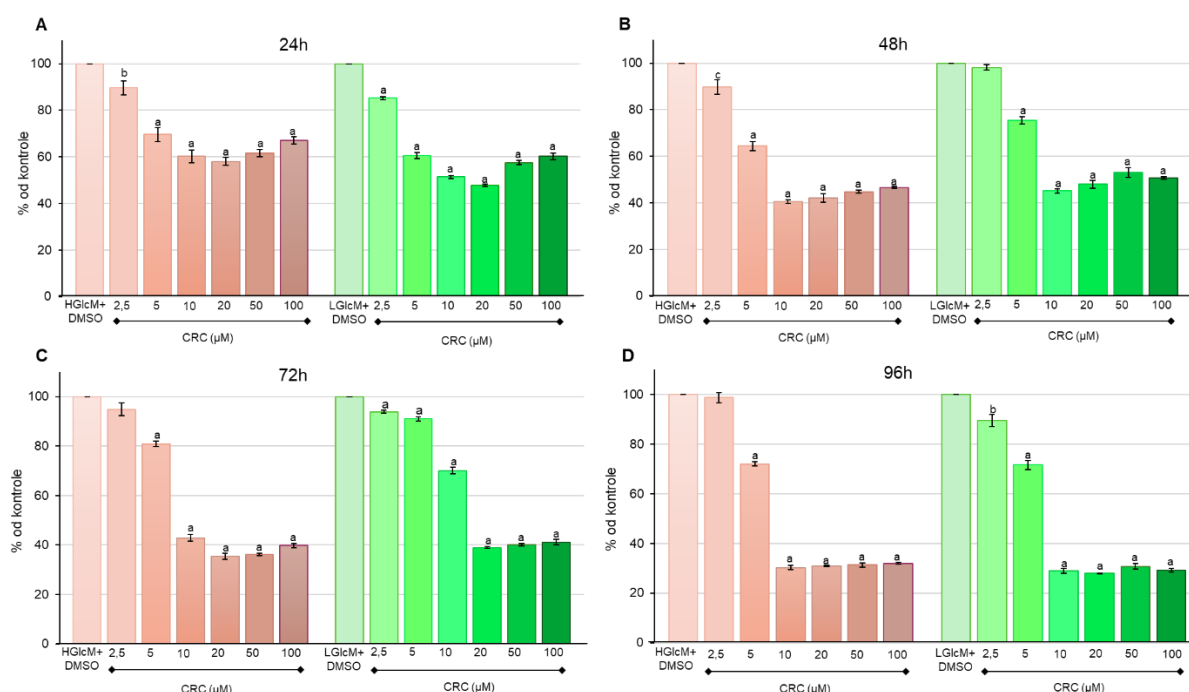
U drugom dijelu istraživanja ispitan je učinak kurkumina (CRC) i pirazolnog analoga kurkumina (PC) u kombinaciji s uvjetima deprivacije glukoze/nutrijenata na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanične linije, kao i na indukciju autofagije i apoptoze.

4.2.1. Učinak kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima deprivacije glukoze na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica određen MTT metodom

Učinak HGlcM i LGlcM medija, u koji je već tijekom samog naciepljivanja stanica dodan CRC ili PC tako da su u mediju postignute koncentracije od 2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 μ M, na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica praćen je metodom MTT svaka 24 sata tijekom 96 sati. Dobiveni rezultati (5 mjerenja po uzorku) statistički su obrađeni i prikazani grafički na slici 16 i

slici 17 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 5 μL otapala mL^{-1} medija) \pm standardna pogreška.

Na slici 16 vidljivo je da sve testirane koncentracije CRC-a uzrokuju smanjenu staničnu vijabilnost u odnosu na kontrolu. Najveću inhibiciju rasta stanica nakon 24 sata uzrokovala je koncentracija CRC-a od 20 μM , gdje je postotak preživljenja stanica iznosio 58,08 %, a za stanice uzgajane u LGlcM mediju – 47,72 %. Duža kultivacija stanica (48 – 96h u HGlcM ili LGlcM) tretiranih s CRC-om rezultirala je izraženom inhibicijom staničnoga rasta pri koncentracijama $\geq 10 \mu\text{M}$ (slika 16 B – D). Smanjenje udjela glukoze u mediju nije rezultiralo pojačanim inhibitorynim učinkom CRC-a.

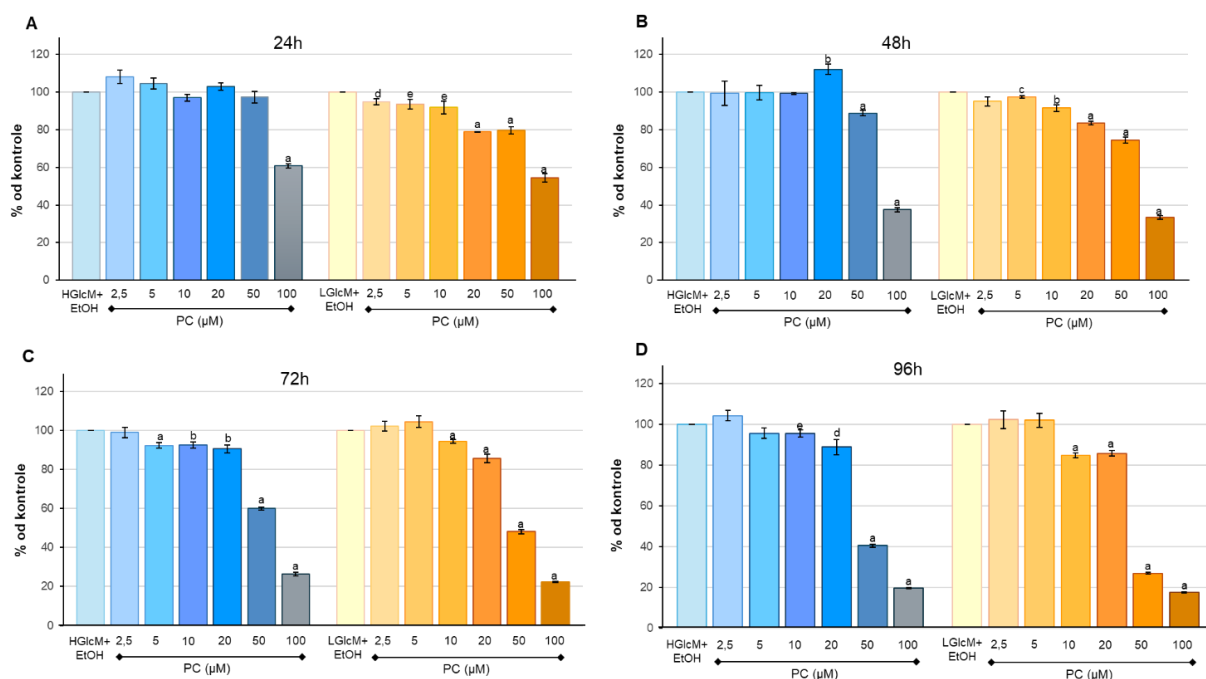


Slika 16. Vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u HGlcM i LGlcM medijima u koji je dodan kurkumin (CRC) (2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 μM) u odnosu na kontrolne vrijednosti (HGlcM/LGlcM + DMSO), određeno metodom MTT nakon 24 (A), 48 (B), 72 (C) i 96 sati (D). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (Student *t*-test): ^c $p < 0,025$, ^b $p < 0,01$, ^a $p < 0,001$

HGlcM+DMSO – stanice kultivirane u DMEM *High Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; LGlcM+DMSO – stanice kultivirane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 2,5 – 100 μM .

Prema slici 17 vidljivo je da u sva četiri promatrana vremena dolazi do pada stanične vijabilnosti kako raste koncentracija PC-a. Uočeno je da se značajniji citotoksični učinak postiže kod viših doza PC-a (50 – 100 μM) u HGlcM i LGlcM mediju. Najviša je koncentracija od 100 μM u oba medija i kod svih ispitivanih vremena uzrokovala najniži postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolu, koji je nakon 96 sati dosegao vrijednost od 19,67 % u HGlcM mediju te

od 17,50 % u LGlcM mediju. Tretman stanica koncentracijama PC-a višim od 20 μM rezultira nižim postotkom preživljenja u LGlcM mediju nego u HGlcM mediju. Postotak preživljenja stanica tretiranih s CRC-om odmah pri naciepljivanju, tijekom inkubacije u trajanju 96h bio je niži u odnosu na stanice tretirane s PC-om bez obzira je li uzgoj proveden u HGlcM ili LGlcM mediju (slika 16 i 17).



Slika 17. Vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u HGlcM i LGlcM medijima u koji je dodan pirazolni analog kurkumina (PC) (2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 μM) u odnosu na kontrolne vrijednosti (HGlcM/LGlcM + EtOH), određeno metodom MTT nakon 24 (A), 48 (B), 72 (C) i 96 sati (D). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (Student *t*-test): ^e $p < 0,05$, ^d $p < 0,025$, ^c $p < 0,01$, ^b $p < 0,005$, ^a $p < 0,001$

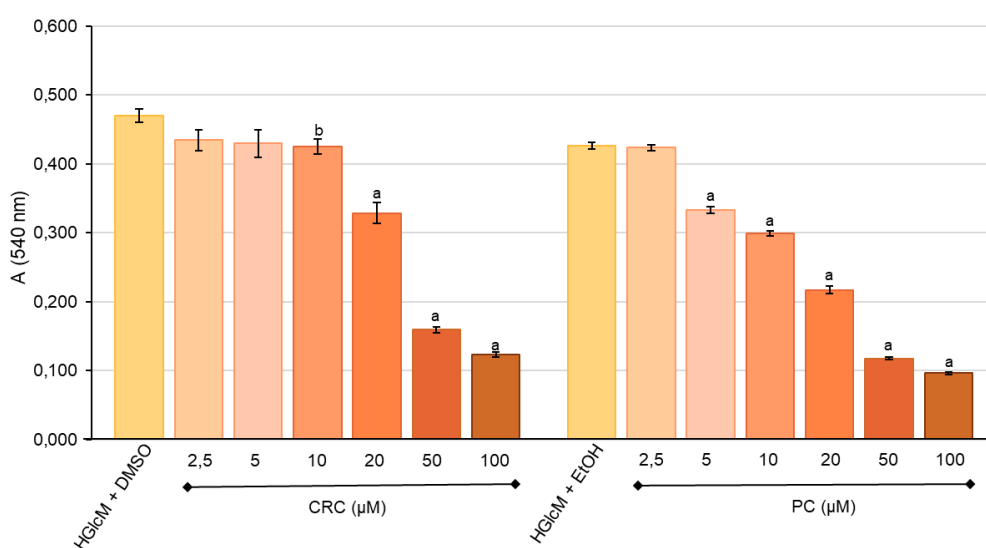
HGlcM+EtOH – stanice kultivirane u DMEM *High Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL EtOH mL^{-1} medija za uzgoj; LGlcM+EtOH – stanice kultivirane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL EtOH mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane PC-om u koncentracijama 2,5 – 100 μM .

Učinak CRC-a i PC-a na stanice kultivirane u HGlcM i LGlcM medijima proveden je i na način da su stanice bile tretirane spojem 24 sata nakon naciepljivanja (nakon formiranja staničnog monosloja) tako da se u mediju postignu koncentracije od 2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 μM . Vijabilnost i proliferacija MCF-7 stanica praćena je metodom MTT 72 sata nakon tretmana. Dobiveni rezultati (3 – 5 mjerenja po uzorku) statistički su obrađeni i prikazani grafički na slici 18 i slici 19 kao srednje vrijednosti apsorbancije pri 540 nm \pm standardna pogreška.

Prema slici 18, povećanjem koncentracije CRC-a/PC-a zamijećen je trend pada stanične proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak kod stanica uzgajanih u HGlcM mediju, pri čemu se izražen citotoksični učinak postiže pri koncentracijama 50 – 100 μM . Tretman stanica PC-om u

koncentracijama od 10 do 100 μM imao je statistički značajno jači inhibitorni efekt na rast stanica nego tretman istim koncentracijama CRC-a, što ukazuje na veću citotoksičnost novosintetiziranog pirazolog analoga kurkumina u usporedbi s kurkuminom.

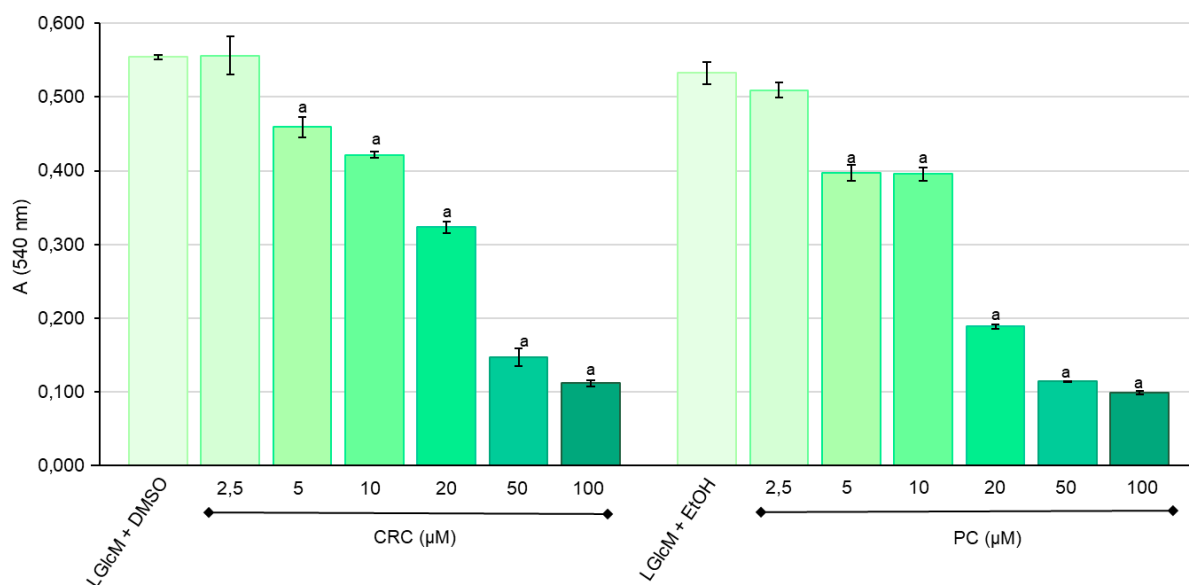
Hu i sur. (2018) dokazali su da CRC inhibira proliferaciju MCF-7 stanica te da je njegova citotoksičnost ovisna o primijenjenoj koncentraciji, što potvrđuju rezultati dobiveni ovim istraživanjem. Drugo je istraživanje, u kojem se ispitala stabilnost novosintetiziranih pirazolnih derivata kurkumina te njihov učinak na proliferaciju osteosarkomske stanične linije, pokazalo da jedan od derivata iskazuje znatno jači citotoksični učinak od CRC-a (Feriotto i sur., 2023).



Slika 18. Učinak kurkumina (CRC) i pirazolnog analoga kurkumina (PC) (2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 μM) na vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u HGLcM mediju, određen MTT metodom 72 sata nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (HGLcM + DMSO/EtOH) (Student *t*-test): ^b $p < 0,05$; ^a $p < 0,001$.

HGLcM + DMSO/EtOH – stanice kultivirane u DMEM *High Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO/EtOH mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane CRC-om/PC-om u koncentracijama 2,5 – 100 μM .

Iz slike 19 vidljivo je da vijabilnost stanica uzgajanih u LGlcM mediju također ovisi o dozi spoja kojom su stanice tretirane i da povećanjem koncentracije dolazi do statistički značajnoga (iznimka su rezultati za 2,5 μM CRC-a/PC-a koji nisu statistički značajni) pada vijabilnosti stanica te da koncentracije 50 – 100 μM uzrokuju izražen inhibitorni učinak. Također, uočeno je da su koncentracije PC-a od 2,5 – 100 μM uzrokovale veći pad u vijabilnosti stanica nego iste koncentracije CRC-a, kao što je to bio slučaj i kod stanica kultiviranih u HGLcM mediju.



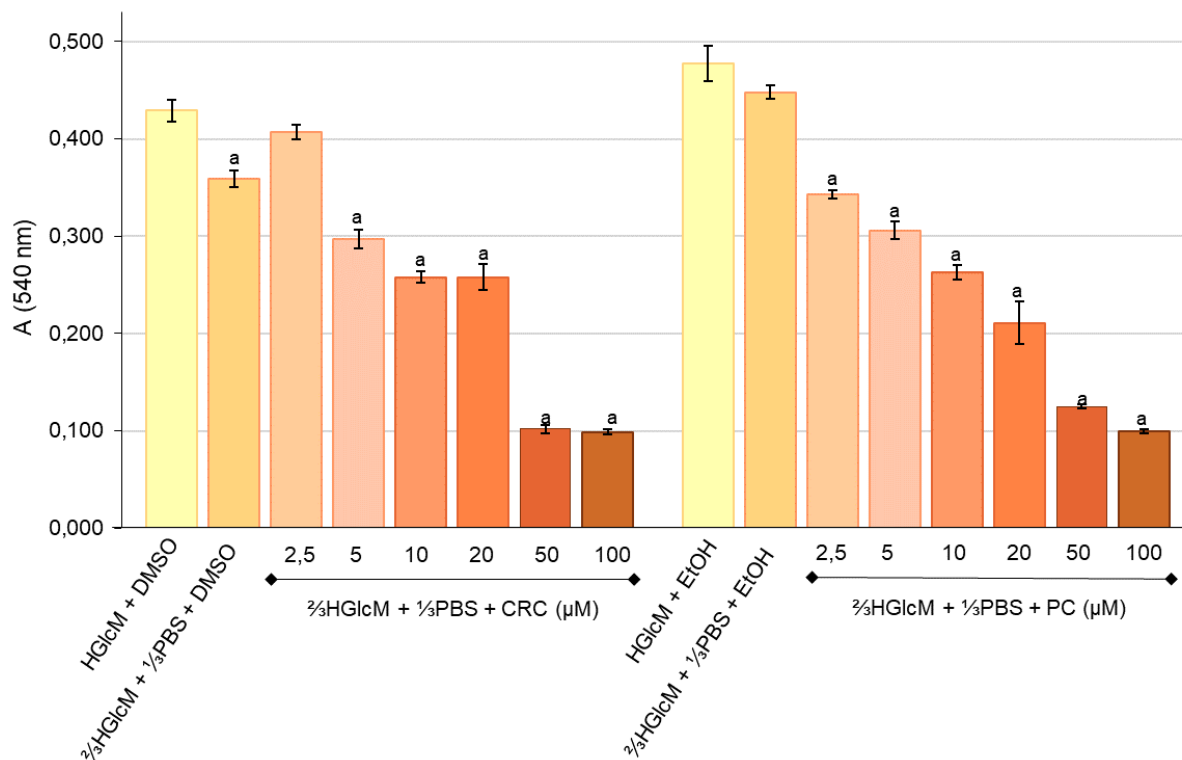
Slika 19. Učinak kurkumina (CRC) i pirazolnog analoga kurkumina (PC) (2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 µM) na vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u LGlcM mediju, određen MTT metodom 72 sata nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (LGlCM + DMSO/EtOH) (Student *t*-test): ^ap<0,001.

LGlCM + DMSO/EtOH – stanice kultivirane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 µL DMSO/EtOH mL⁻¹ medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane CRC-om/PC-om u koncentracijama 2,5 – 100 µM.

4.2.2. Učinak kurkumina i pirazolnog analoga kurkumina u uvjetima nutritivne deprivacije na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica određen MTT metodom

Učinak CRC-a i PC-a na stanice kultivirane u $\frac{2}{3}$ HGlCM + $\frac{1}{3}$ PBS i $\frac{2}{3}$ LGlCM + $\frac{1}{3}$ PBS medijima, tretirane spojem 24 sata nakon naciepljivanja tako da se u mediju postignu koncentracije od 2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 µM, na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica praćen je metodom MTT 72 sata nakon tretmana. Dobiveni rezultati (5 – 10 mjerenja po uzorku) statistički su obrađeni i prikazani grafički na slici 20 i slici 21 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška.

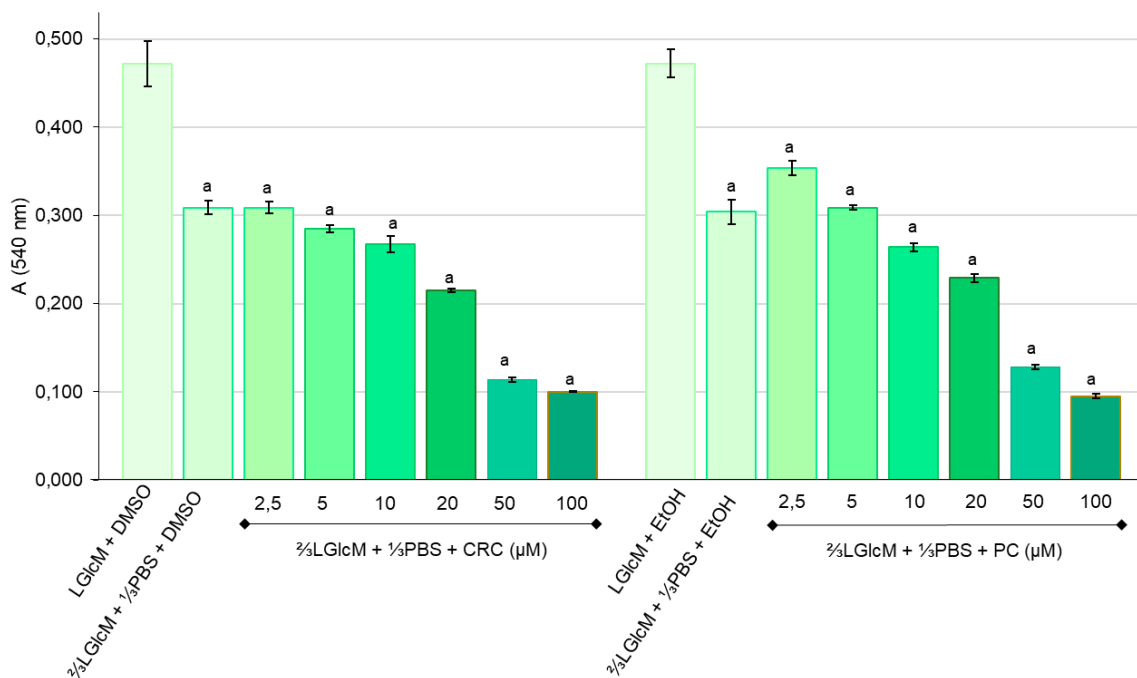
Iz slike 20 vidljivo je da kod stanica kultiviranih u HGlcM medijima razrijeđenima PBS-om kod svih koncentracija CRC-a/PC-a dolazi do smanjenja broja vijabilnih stanica u odnosu na kontrolu, te da vijabilnost stanica opada povećanjem doze ispitivanoga spoja. Koncentracije CRC-a (5 – 100 µM) statistički značajno uzrokuju pad stanične vijabilnosti prilikom uzgoja u HGlcM razrijeđenim s $\frac{1}{3}$ PBS. PC pri istim uvjetima uzgoja stanica te pri svim ispitanim koncentracijama pokazuje statistički značajni inhibitorni efekt na staničnu proliferaciju koji raste povećanjem koncentracije (slika 20).



Slika 20. Učinak kurkumina (CRC) i pirazolnog analoga kurkumina (PC) (2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 µM) na vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u 1/3 HGlCM + 1/3 PBS mediju, određen MTT metodom 72 sata nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (HGlCM + DMSO/EtOH) (Student *t*-test): ^ap<0,001.

HGlCM + DMSO/EtOH – stanice kultivirane u DMEM *High Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 µL DMSO/EtOH mL⁻¹ medija za uzgoj; 1/3 HGlCM + 1/3 PBS + DMSO/EtOH – stanice kultivirane u 1/3 DMEM *High Glucose* medija (10 % FBS) i 1/3 PBS-a te tretirane s 5 µL DMSO/EtOH mL⁻¹ medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane CRC-om/PC-om u koncentracijama 2,5 – 100 µM.

Proliferacija stanica uzgajanih u LGlCM mediju razrijeđenim PBS-om statistički značajno pada s povećanjem koncentracije CRC-a/PC-a, što je vidljivo iz slike 21 te je postotak inhibicije staničnog rasta znatno izraženiji pri uzgoju stanica u LGlCM + 1/3 PBS uz tretman s CRC-om ili PC-om u odnosu na HGlCM + 1/3 PBS i istovjetan tretman (slike 20 i 21).



Slika 21. Učinak kurkumina (CRC) i pirazolnog analoga kurkumina (PC) (2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 μM) na vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju, određen MTT metodom 72 sata nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (LGlcM + DMSO/EtOH) (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

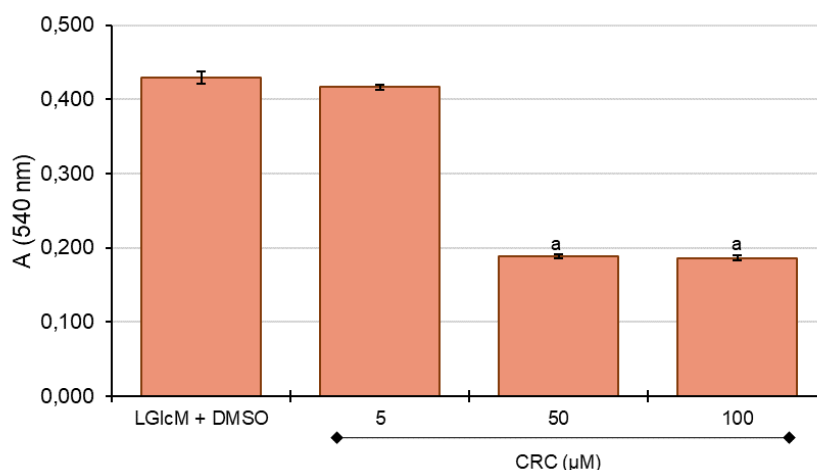
LGlcM + DMSO/EtOH – stanice kultivirane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO/EtOH mL^{-1} medija za uzgoj; $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS + DMSO/EtOH – stanice kultivirane u $\frac{2}{3}$ DMEM *Low Glucose* medija (10 % FBS) i $\frac{1}{3}$ PBS-a te tretirane s 5 μL DMSO/EtOH mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane CRC-om/PC-om u koncentracijama 2,5 – 100 μM .

4.2.3. Učinak kurkumina u uvjetima deprivacije glukoze/nutrijenata na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica određen *Neutral Red* metodom

Učinak CRC-a na stanice kultivirane u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS medijima, tretirane 24 sata nakon naciepljivanja tako da se u mediju postignu koncentracije od 5, 50 i 100 μM , na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica praćen je *Neutral Red* metodom 72 sata nakon tretmana. Dobiveni rezultati (3 – 5 mjerenja po uzorku) statistički su obrađeni i prikazani grafički na slici 22 i slici 23 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm \pm standardna pogreška.

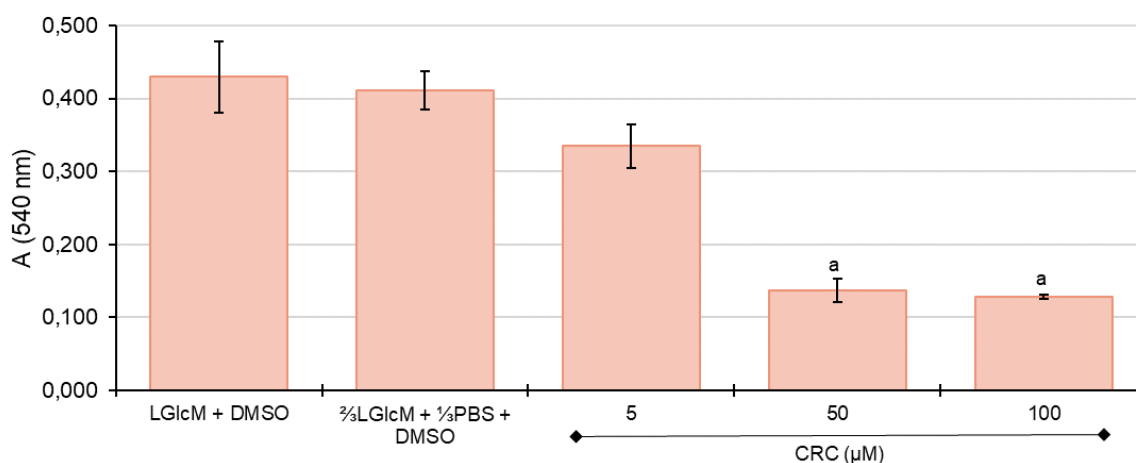
Iz rezultata prikazanih na slici 22 i 23 vidljivo je da sve ispitane koncentracije CRC-a rezultiraju padom stanične vijabilnosti i da je taj pad u korelaciji s primijenjenom dozom. Kod koncentracija CRC-a od 50 i 100 μM , taj je učinak izražen i statistički značajan ($p < 0,001$). Uspoređujući utjecaj medija na rast stanica, uočeno je da je kod stanica kultiviranih u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju inhibirajući učinak CRC-a na rast stanica jači nego kod stanica kultiviranih u LGlcM mediju pri istim ispitanim koncentracijama (5 – 100 μM). Najveća testirana koncentracija CRC-a od 100 μM uzrokovala je pad u vijabilnosti stanica na 43,37 % u odnosu na kontrolu kod LGlcM medija, dok je taj postotak za stanice u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju iznosio 29,87 %.

Slični su rezultati dobiveni u istraživanju provedenom od strane Khajah i sur. (2022), gdje je dokazano da kod niskih koncentracija glukoze u hranjivom mediju dolazi do značajno pojačanog inhibitornog učinka antitumorskih lijekova paklitaksela i doksorubicina. Pri uvjetima deprivacije glukoze potrebna je 1000 puta niža koncentracija ovih spojeva kako bi se postigao stupanj inhibicije sličan onom u uvjetima normalne koncentracije glukoze.



Slika 22. Učinak kurkumina (CRC) (5, 50 i 100 µM) na vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u LGlcM mediju, određen *Neutral Red* metodom 72 sata nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (LGlcM + DMSO) (Student *t*-test): ^ap<0,001.

LGlcM + DMSO – stanice kultivirane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 µL DMSO-a mL⁻¹ medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 µM.



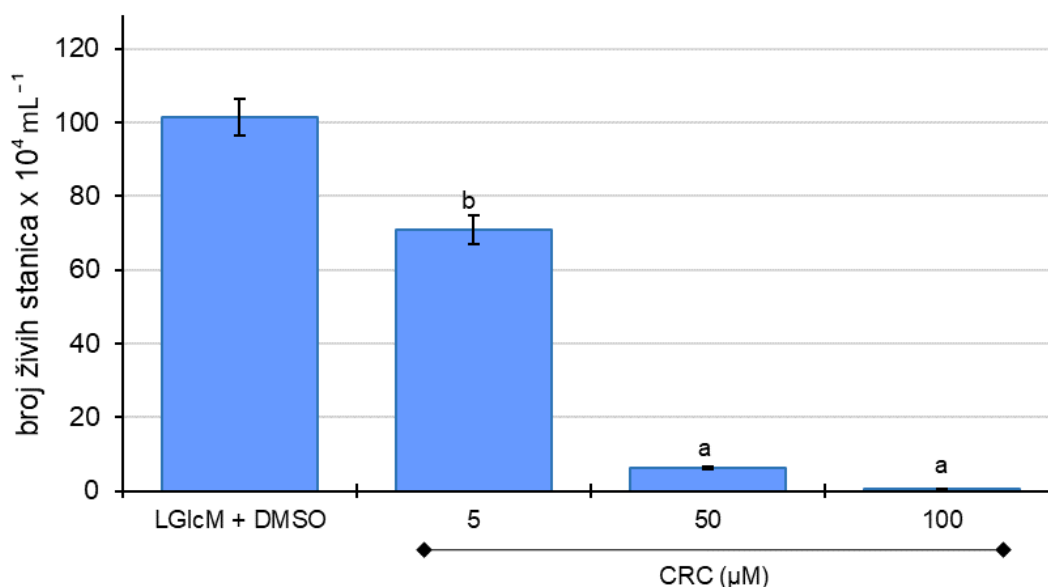
Slika 23. Učinak kurkumina (CRC) (5, 50 i 100 µM) na vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u 2/3 LGlcM + 1/3 PBS mediju, određen *Neutral Red* metodom 72 sata nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (LGlcM + DMSO) (Student *t*-test): ^ap<0,001.

LGlcM + DMSO – stanice kultivirane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 µL DMSO-a mL⁻¹ medija za uzgoj; 2/3 LGlcM + 1/3 PBS + DMSO – stanice kultivirane u 2/3 DMEM *Low Glucose* medija (10 % FBS) i 1/3 PBS-a te tretirane s 5 µL DMSO-a mL⁻¹ medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 µM.

4.2.4. Učinak kurkumina u uvjetima deprivacije glukoze/nutrijenata na proliferaciju i vijabilnost MCF-7 stanica određen *Trypan Blue* metodom

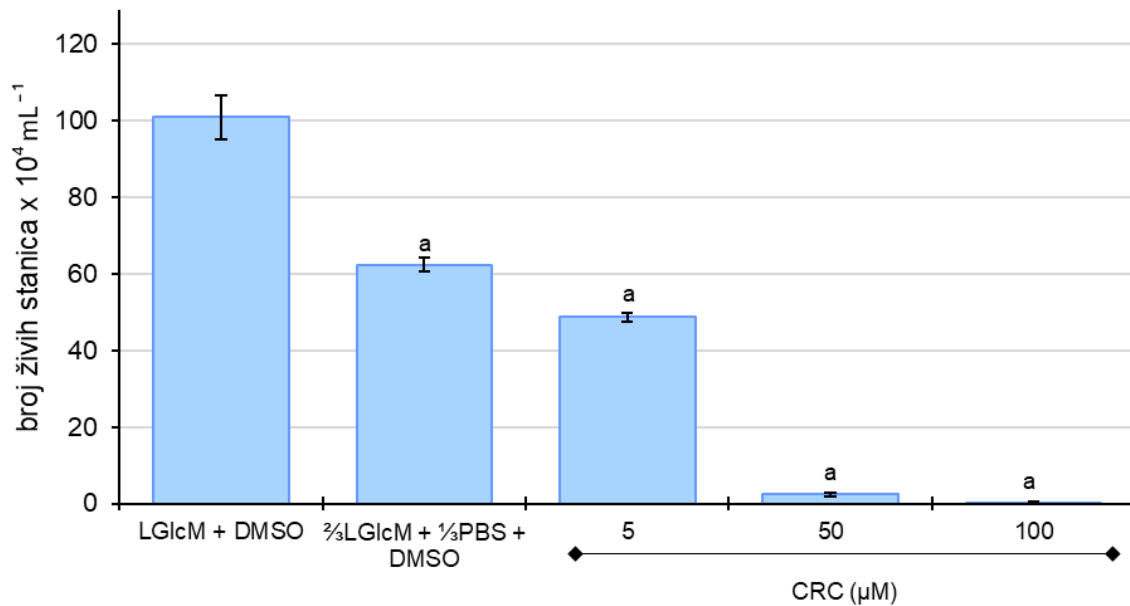
Učinak CRC-a na stanice kultivirane u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS medijima, tretirane 24 sata nakon naciepljivanja tako da se u mediju postignu koncentracije od 5, 50 i 100 μM , na vijabilnost i proliferaciju MCF-7 stanica praćen je *Trypan Blue* metodom 72 sata nakon tretmana. Dobiveni rezultati (4 mjerenja po uzorku) statistički su obrađeni i prikazani grafički na slici 24 i slici 25 kao srednja vrijednost broja živih stanica $\text{mL}^{-1} \pm$ standardna pogreška.

Porastom koncentracije CRC-a vidljivo je da broj živih stanica, koje su rasle u LGlcM i u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju, statistički značajno opada (slika 24 i slika 25). Koncentracija od 5 μM uzrokovala je u LGlcM mediju pad postotka preživjelih stanica na 69,98 % u odnosu na kontrolu, dok je kod medija razrijeđenog PBS-om i tretiranog istom koncentracijom CRC-a taj postotak iznosio 48,27 %. Za ostale testirane koncentracije spoja također je zabilježen manji postotak preživljenja stanica u razrijeđenom mediju, nego u nerazrijeđenom LGlcM mediju. Samo razrjeđenje medija s $\frac{1}{3}$ PBS bez tretmana CRC-om uzrokovalo je pad postotka preživljenja stanica na 61,83 % u odnosu na kontrolu.



Slika 24. Učinak kurkumina (CRC) (5, 50 i 100 μM) na vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u LGlcM mediju, određen *Trypan Blue* metodom 72 sata nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica $\text{mL}^{-1} \pm$ standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni uzorak (LGlcM + DMSO) (Student *t*-test): ^b $p < 0,005$, ^a $p < 0,001$.

LGlcM + DMSO – stanice kultivirane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 μM .



Slika 25. Učinak kurkumina (CRC) (5, 50 i 100 μM) na vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju, određen *Trypan Blue* metodom 72 sata nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica $\text{mL}^{-1} \pm$ standardna pogreška. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni uzorak (LGlcM + DMSO) (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.
 LGlcM + DMSO – stanice kultivirane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS + DMSO – stanice kultivirane u $\frac{2}{3}$ DMEM *Low Glucose* medija (10 % FBS) i $\frac{1}{3}$ PBS-a te tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 μM .

4.2.5. IC vrijednosti

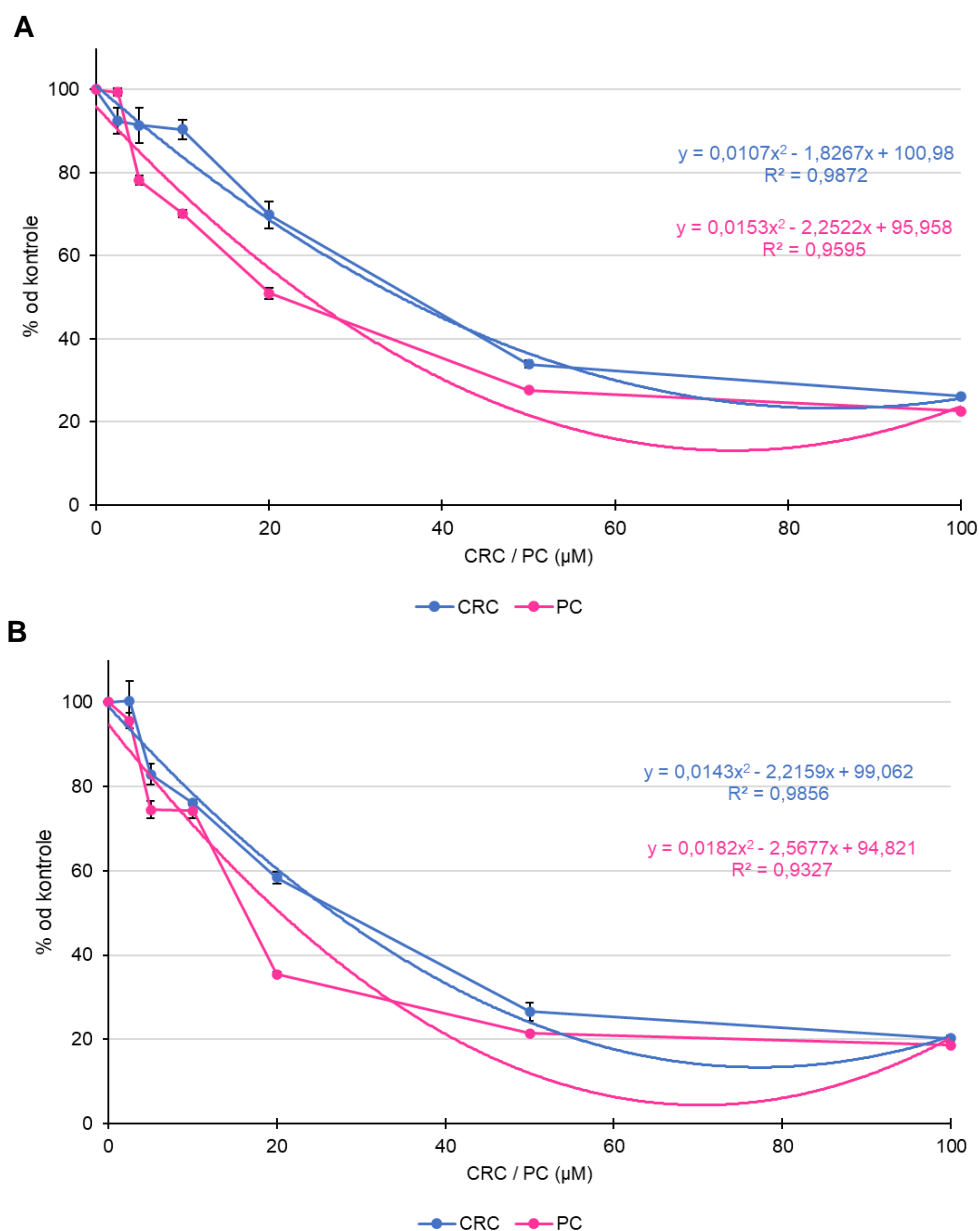
Koncentracije spoja koje uzorkuju 20, 50 i 80 %-tnu inhibiciju rasta stanica (IC20, IC50 i IC80 vrijednosti) izračunate su iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja koje najmanje odstupaju od izmjerenih vrijednosti. Interpolirane krivulje odabrane su na temelju odgovarajućeg koeficijenta determinacije R^2 čija se vrijednost nalazi u intervalu $0 \leq R^2 \leq 1$ i nastoji biti što bliža 1 (model je u tom slučaju reprezentativniji). IC vrijednosti za CRC i PC u HGlcM i LGlcM medijima određene su metodom MTT za svaka 24 sata tijekom 96 sati i prikazane u tablici 2. Iz rezultata dobivenih istraživanjem u kojem je tretman s CRC-om i PC-om proveden istovremeno s naciepljivanjem, izračunate su niže IC vrijednosti za CRC nego za PC, što ukazuje na jače citotoksično djelovanje CRC-a.

Tablica 2. Koncentracije kurkumina (CRC) i pirazolnog analoga kurkumina (PC) koje inhibiraju vijabilnost MCF-7 stanica u HGlcM i LGlcM medijima za 20, 50 i 80 %, određene metodom MTT nakon 24, 48, 72 i 96 sati. Tretman s CRC i PC proveden istovremeno s nacjeppljivanjem stanica.

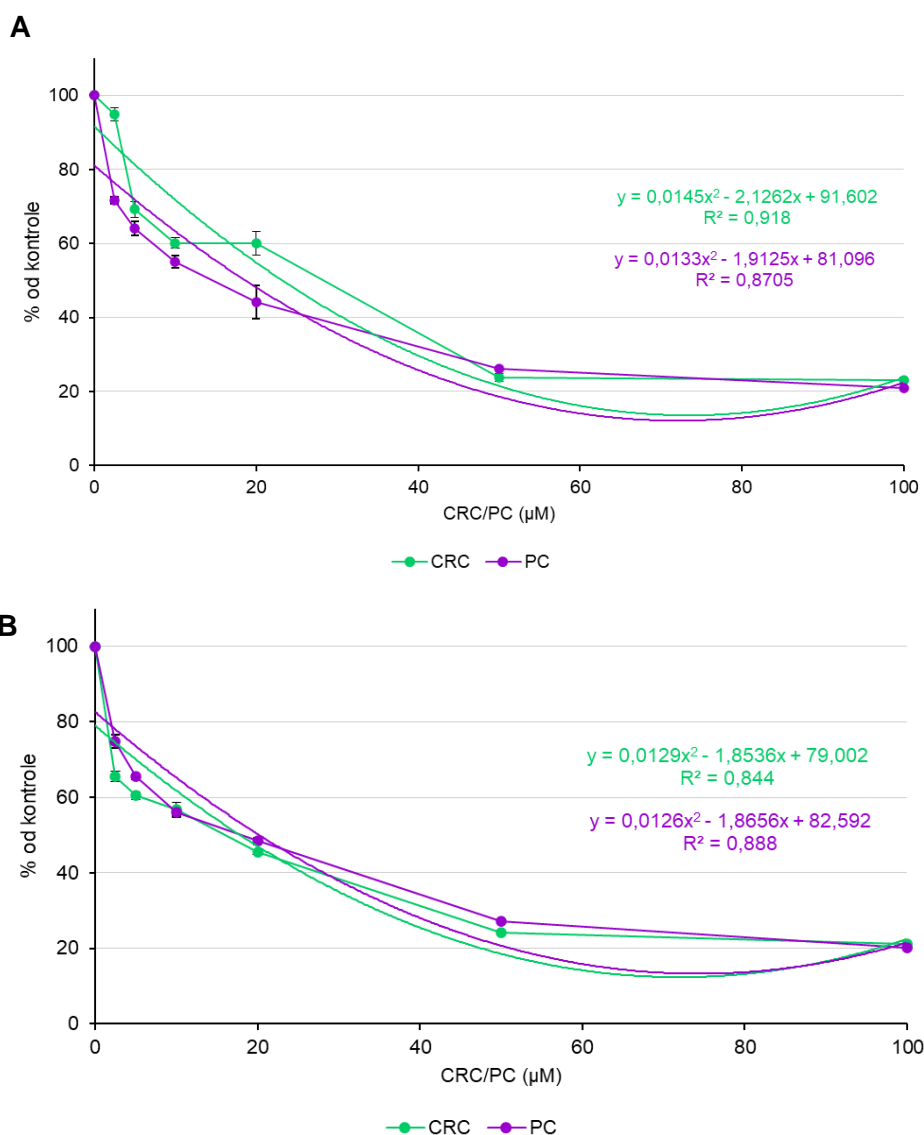
		CRC		PC	
		HGlcM	LGlcM	HGlcM	LGlcM
IC20	24h	4,41	/	77,64	36,81
	48h	0,90	4,28	66,39	35,26
	72h	3,93	7,50	26,84	21,40
	96h	2,35	1,03	19,21	15,00
IC50	24h	/	31,56	110,43	116,26
	48h	21,59	28,97	91,21	80,12
	72h	20,03	25,75	67,26	52,29
	96h	16,86	15,70	47,05	35,87
IC80	24h	/	/	134,62	221,44
	48h	/	/	109,51	115,60
	72h	49,37	/	107,90	104,86
	96h	38,95	37,81	94,32	72,25

HGlcM – DMEM *High Glucose* hranjivi medij; LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij

Ovisnost postotka preživljenja MCF-7 stanica o koncentraciji CRC-a/PC-a određena MTT metodom 72 sata nakon tretmana stanica (drugi način istraživanja gdje su stanice prvo formirale monosloj i tek onda bile tretirane spojem) prikazana je na slici 26 za stanice kultivirane u HGlcM i LGlcM medijima, odnosno na slici 27 za stanice kultivirane u HGlcM i LGlcM medijima razrijeđenim PBS-om. Iz grafičkih prikaza vidljivo je da porastom koncentracije oba spoja dolazi do pada u staničnoj vijabilnosti kod svih praćenih kombinacija medija. Uspoređujući učinak CRC-a i PC-a, iz slike 26 vidljivo je da PC jače inhibira proliferaciju stanica u HGlcM i LGlcM mediju. Prema slici 27, kod stanica uzgajanih u razrijeđenom HGlcM mediju također je zabilježen jači citotoksični učinak PC-a, dok je u razrijeđenom LGlcM s 1/3 PBS učinak oba spoja bio podjednak.



Slika 26. Vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u HGlcM (A) i LGlcM (B) mediju 72 sata nakon tretmana kurkuminom (CRC) i pirazolnim analogom kurkumina (PC) (2,5 – 100 μ M) u odnosu na kontrolne vrijednosti, određeno MTT metodom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Jednadžbe pripadaju interpoliranim polinomnim krivuljama s odgovarajućim R^2 vrijednostima.



Slika 27. Vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u $\frac{2}{3}$ HGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS (A) i $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju (B) 72 sata nakon tretmana kurkuminom (CRC) i pirazolnim analogom kurkumina (PC) (2,5 – 100 μM) u odnosu na kontrolne vrijednosti, određeno MTT metodom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Jednadžbe pripadaju interpoliranim polinomnim krivuljama s odgovarajućim R^2 vrijednostima.

IC vrijednosti za CRC i PC u HGlcM i LGlcM medijima te medijima razrijeđenim PBS-om određene su metodom MTT 72 sata nakon tretmana iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (slika 26 i slika 27) te su prikazane u tablici 3. IC vrijednosti za CRC i PC dobivene prilikom uzgoja stanica u LGlcM mediju niže su nego one dobivene za HGlcM medij, odnosno niža koncentracija dostupne glukoze u ovom slučaju dodatno pojačava inhibični učinak spojeva. Također, rezultati pokazuju da PC karakterizira jače citotoksično djelovanje u HGlcM i LGlcM medijima od CRC-a jer je za inhibiciju istog postotka populacije stanica potrebna manja doza spoja. S druge strane, ovaj trend nije vidljiv kod razrijeđenih medija. Dok PC u $\frac{2}{3}$ HGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju pokazuje jače inhibično djelovanje od CRC-a, u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju CRC

jače inhibira stanični rast. Uspoređujući rast stanica kultiviranih u izvornim i PBS-om razrijeđenim medijima, vidljivo je da su za CRC kod razrijeđenih HGlcM i LGlcM medija dobivene niže IC vrijednosti (jači citotoksični učinak) nego kod nerazrijeđenih medija. Sve navedeno upućuje na izmijenjenu biološku aktivnost novosintetiziranog analoga kurkumina u različitim uvjetima u staničnom okolišu (deprivacija nutrijenata) što rezultira njegovom promjenjenom citotoksičnošću u usporedbi s ishodnim spojem CRC-om.

Uspoređujući IC vrijednosti dobivene prvim (tablica 2) i drugim načinom istraživanja (tablica 3) gdje je ispitivan utjecaj CRC-a i PC-a u HGlcM i LGlcM mediju na proliferaciju stanica, vidljivo je da prvi način istraživanja, gdje su spojevi dodani u hranjivi mediji prije nego su stanice formirale monosloj, ukazuje na veću citotoksičnost CRC-a. S druge strane, rezultati dobiveni drugim načinom istraživanja pokazali su da u HGlcM i LGlcM medijima povećanu citotoksičnost ima PC. Navedeno ukazuje na jači inhibitorni učinak kurkumina dok su stanice još u procesu prihvaćanja za podlogu i formiranja staničnog monosloja, međutim jednom kada je monosloj formiran, na stanice će jače inhibitorno djelovanje imati njegov analog.

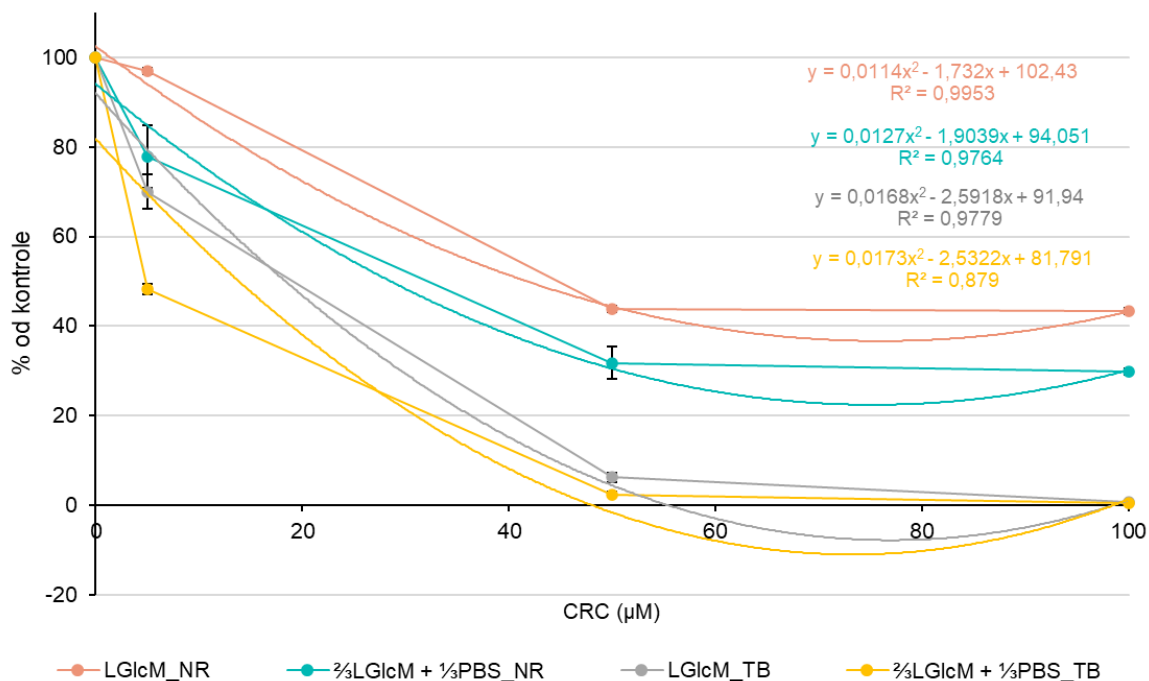
Tablica 3. Koncentracije kurkumina (CRC) i pirazolnog analoga kurkumina (PC) koje inhibiraju vijabilnost MCF-7 stanica u HGlcM i LGlcM medijima te medijima razrijeđenim PBS-om za 20, 50 i 80 %, određene metodama MTT nakon 72 sata. Tretman spojevima proveden je nakon formiranja staničnog monosloja.

		HGlcM	LGlcM	$\frac{2}{3}$ HGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS	$\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS
IC20	CRC	12,38	9,14	5,68	/
	PC	7,46	6,03	0,58	1,40
IC50	CRC	35,14	26,76	23,25	17,87
	PC	24,48	20,41	18,69	20,24
IC80	CRC	/	55,70	52,40	47,60
	PC	52,33	41,13	47,90	51,38

HGlcM – DMEM *High Glucose* hranjivi medij; LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij; PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*

Ovisnost postotka preživljenja MCF-7 stanica o koncentraciji CRC-a određena *Neutral Red* i *Trypan Blue* metodom 72 sata nakon tretmana prikazana je na slici 28 za stanice kultivirane u LGlcM i $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS medijima. Smanjena stanična proliferacija zabilježena je kod stanica kultiviranih u razrijeđenim LGlcM medijima i to kod obje metode.

IC vrijednosti za CRC u LGlcM i $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS medijima određene su iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (slika 28) te su prikazane u tablici 4. IC20 i IC50 vrijednosti dobivene *Neutral Red* i *Trypan Blue* metodom niže su u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju nego u nerazrijeđenom LGlcM mediju, odnosno CRC pokazuje jače inhibitorno djelovanje u uvjetima nutritivne deprivacije.



Slika 28. Vijabilnost MCF-7 stanica kultiviranih u LGlcM i 2/3 LGlcM + 1/3 PBS mediju 72 sata nakon tretmana kurkuminom (CRC) (2,5 – 100 µM) u odnosu na kontrolne vrijednosti, određeno *Neutral Red* i *Trypan Blue* metodom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Jednadžbe pripadaju interpoliranim polinomnim krivuljama s odgovarajućim R² vrijednostima.

Tablica 4. Koncentracije kurkumina koje inhibiraju vijabilnost MCF-7 stanica u LGlcM i 2/3 LGlcM + 1/3 PBS medijima za 20, 50 i 80 %, određene metodama *Neutral Red* i *Trypan Blue* nakon 72 sata.

	<i>Neutral Red</i>		<i>Trypan Blue</i>	
	LGlcM	2/3 LGlcM + 1/3 PBS	LGlcM	2/3 LGlcM + 1/3 PBS
IC20	14,30	7,78	3,34	0,71
IC50	41,74	25,59	15,61	13,87
IC80	/	/	/	30,94

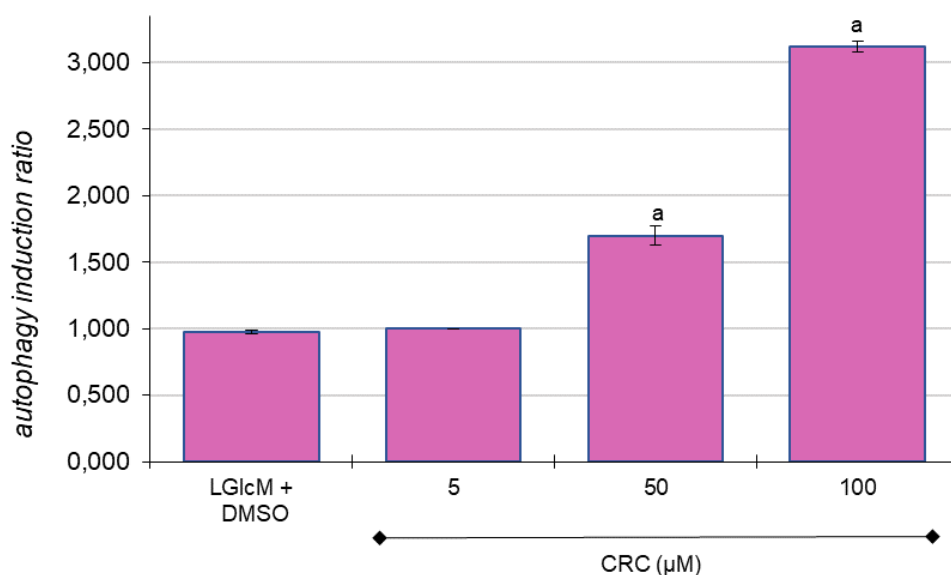
LGlcM – DMEM *Low Glucose* hranjivi medij; PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*

4.2.6. Učinak tretmana MCF-7 stanica kurkuminom uzgajanih u LGlcM ili 2/3 LGlcM + 1/3 PBS na indukciju autofagije

Učinak različitih koncentracija CRC-a na indukciju autofagije u MCF-7 staničnoj liniji kultiviranoj u LGlcM ili 2/3 LGlcM + 1/3 PBS mediju nakon 72 sata određen je metodom protočne citometrije i primjenom *Muse™ autophagy LC3-antibody based kit*-a. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na slici 29 i slici 30, dok su reprezentativni uzorci – histogrami (engl. *Autophagy induction profile*) za kontrole uzorke te stanice tretirane CRC-om (5 – 100 µM)

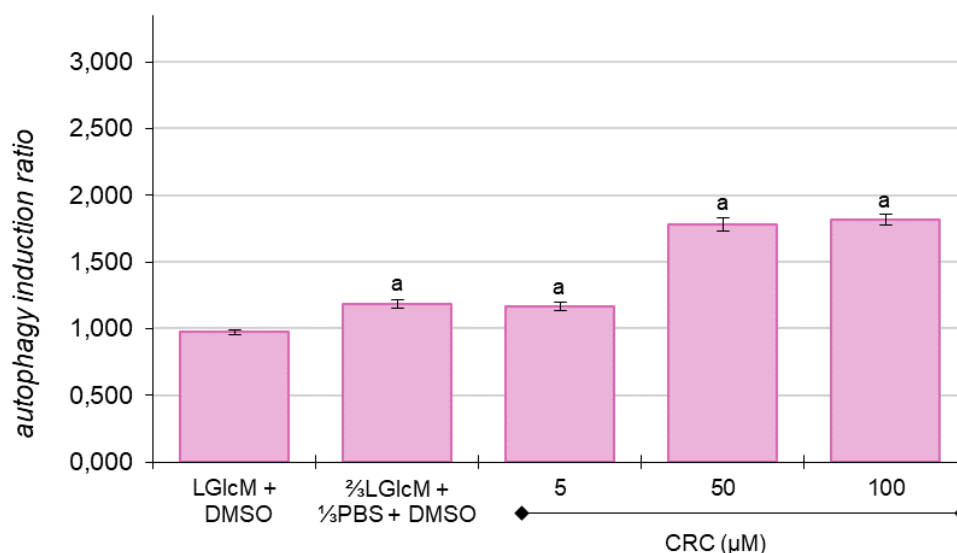
prikazani na slici 31 i slici 32.

Kod stanica kultiviranih u LGlcM mediju, povećanjem koncentracije CRC-a zapažen je značajan porast u broju stanica koje podliježu autofagiji (slika 29). Rezultati istraživanja Akkoç i sur. (2015) također su pokazali da kurkumin inducira autofagiju u MCF-7 staničnoj liniji, no kod normalnih uvjeta uzgoja. Koncentracija CRC-a od 50 μM uzrokovala je povećanje vrijednosti *autophagy induction ratio* na 1,70, dok je pri 100 μM ta vrijednost iznosila čak 3,12, pri čemu su oba rezultata statistički značajna ($p < 0,001$). Iz slike 30 vidljivo je da kod stanica uzgajanih u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju pri nižim dozama CRC-a (5 μM) dolazi do blage indukcije autofagije u odnosu na kontrolni uzorak, dok pri višim dozama (50 – 100 μM) dolazi do izraženijeg porasta udjela stanica koje odumiru autofagijom, a dobiveni rezultati statistički su značajni. Pri koncentraciji od 100 μM zabilježen je najveći *autophagy induction ratio* koji iznosi 1,82.



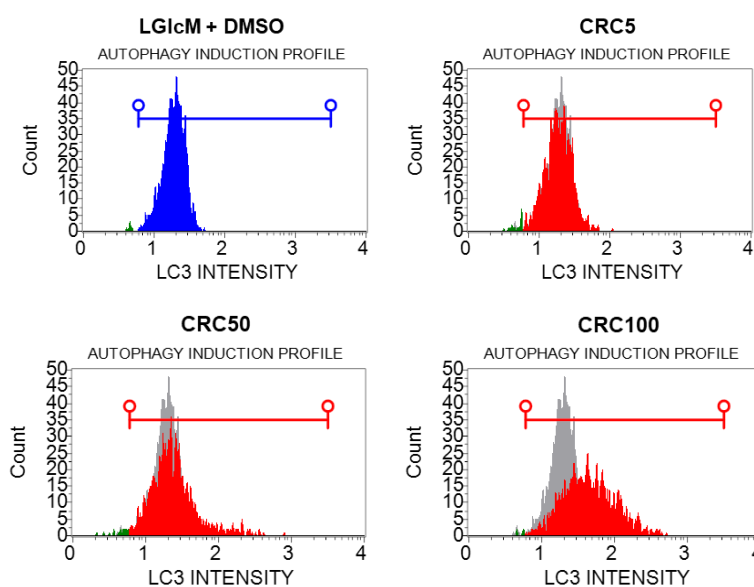
Slika 29. Procjena autofagije u MCF-7 stanicama uzgajanim u LGlcM mediju nakon tretmana kurkuminom (CRC) (5, 50 i 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (LGlcM + DMSO) (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

LGlcM + DMSO – stanice uzgajane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 μM .



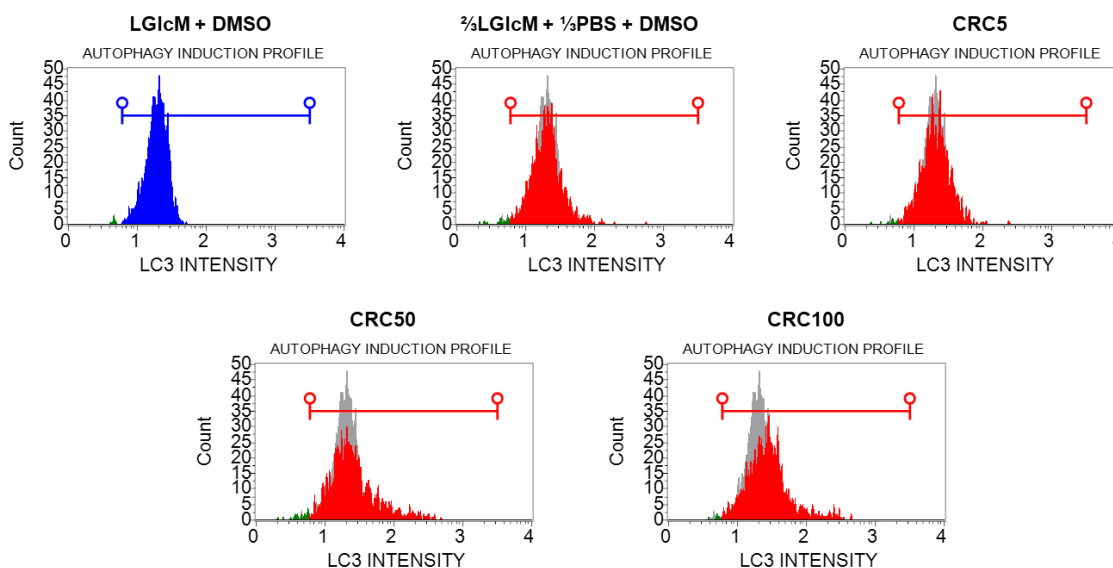
Slika 30. Procjena autofagije u MCF-7 stanicama uzgajanim u 2/3 LGlcM + 1/3 PBS mediju nakon tretmana kurkuminom (CRC) (5, 50 i 100 µM). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (LGlcM + DMSO) (Student *t*-test): ^ap<0,001.

LGlcM + DMSO – stanice uzgajane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 µL DMSO-a mL⁻¹ medija za uzgoj; 2/3 LGlcM + 1/3 PBS + DMSO – stanice kultivirane u 2/3 DMEM *Low Glucose* medija (10 % FBS) i 1/3 PBS-a te tretirane s 5 µL DMSO-a mL⁻¹ medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 µM.



Slika 31. Reprezentativni uzorci – histogrami (engl. *Autophagy induction profile*) dobiveni metodom protočne citometrije za kontrole uzorke (LGlcM + DMSO) i stanice tretirane kurkuminom (CRC) (5, 50 i 100 µM) kultivirane u LGlcM mediju.

LGlcM + DMSO – stanice uzgajane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 µL DMSO-a mL⁻¹ medija za uzgoj; CRC5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 µM.



Slika 32. Reprezentativni uzorci – histogrami (engl. *Autophagy induction profile*) dobiveni metodom protočne citometrije za kontrolu (LGlcM + DMSO) i stanice tretirane kurkuminom (CRC) (5, 50 i 100 μM) kultivirane u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju.

LGlcM + DMSO – stanice uzgajane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS + DMSO – stanice kultivirane u $\frac{2}{3}$ DMEM *Low Glucose* medija (10 % FBS) i $\frac{1}{3}$ PBS-a te tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; CRC5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 μM .

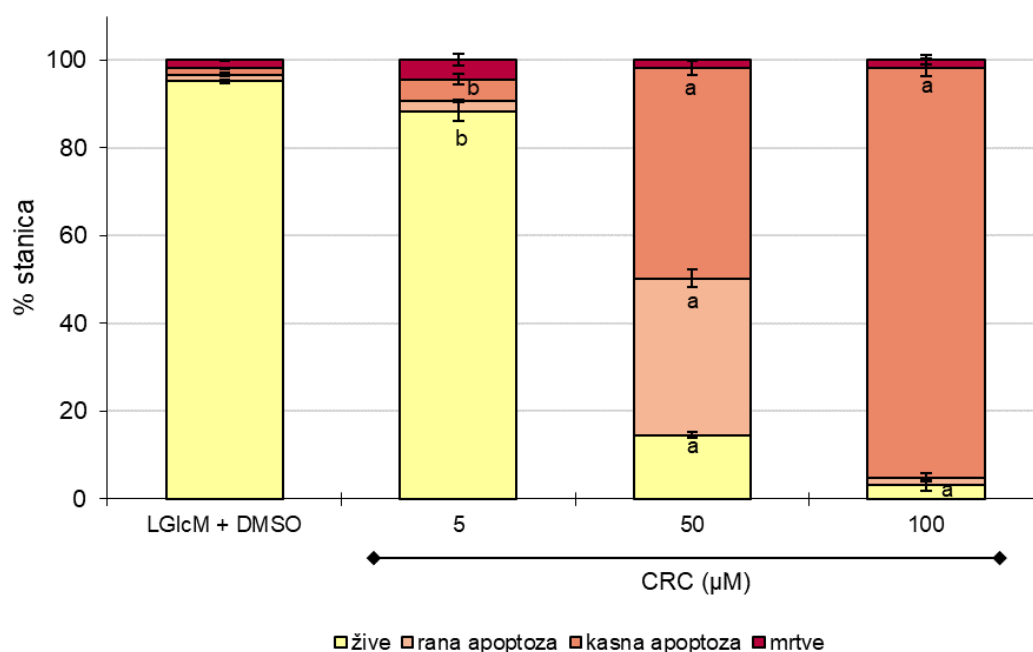
4.2.7. Učinak tretmana MCF-7 stanica kurkuminom uzgajanih u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS na indukciju apoptoze

Učinak CRC-a (5, 50 i 100 μM) na indukciju apoptoze u MCF-7 stanicama kultiviranim u LGlcM ili $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS određen je metodom protočne citometrije i primjenom *MuseTM Annexin V & Dead Cell Assay kit*-a. Suspenzije MCF-7 stanica u LGlcM mediju i u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju naciepljene su u volumenu od 4 mL u jažice 6-*well* ploče u koncentraciji od 1×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata, stanice su tretirane CRC-om kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije 5 – 100 μM . 72 sata nakon tretmana, primjenom *MuseTM* protočnog citometra provedena je kvantitativna analiza živih, apoptotičkih i mrtvih stanica.

Rezultati analize apoptoze kod MCF-7 stanica nakon tretmana CRC-om prikazani su kao udjeli živih i mrtvih stanica te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (slika 33 i slika 35), te kao reprezentativni *dot-plot* dijagrami sa četiri različite subpopulacije MCF-7 stanica (slika 34 i slika 36). Za određivanje učinka CRC-a u uvjetima nutritivne deprivacije provedeno je 4 – 6 mjerenja.

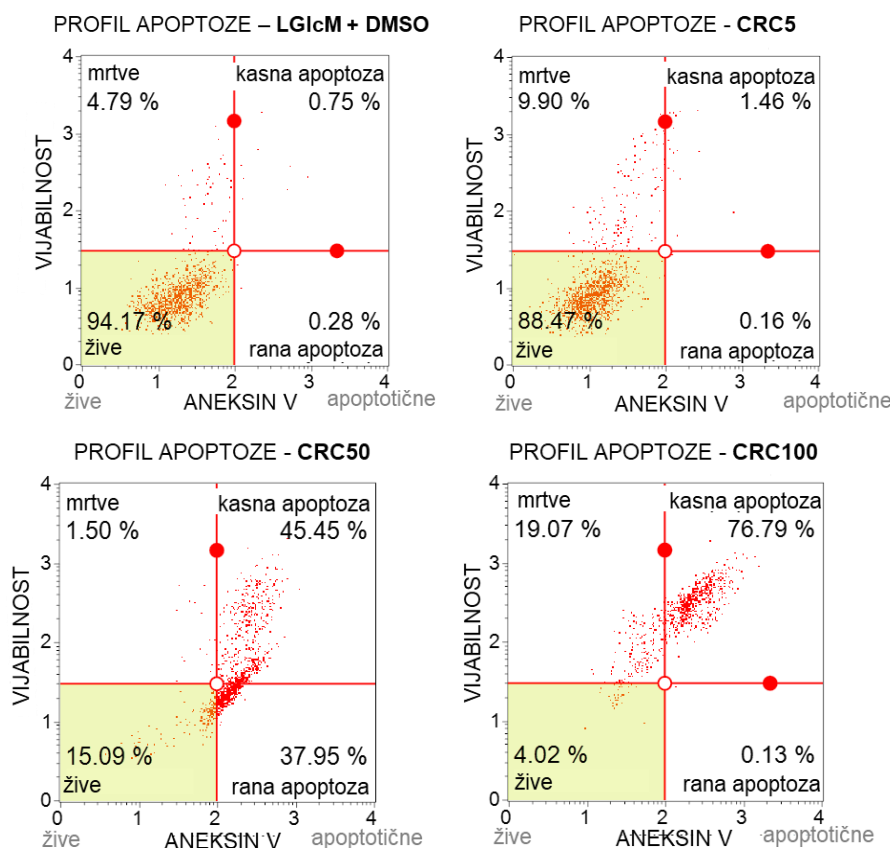
Iz slike 33 vidljivo je da kod stanica kultiviranih u LGlcM mediju, povećanjem koncentracije CRC-a dolazi do smanjenja postotka živih stanica. Kod kontrolnog je uzorka taj udio iznosio 95,15 %, pri 5 μM 88,30 % ($p < 0,025$), pri 50 μM 14,56 % ($p < 0,001$) i pri 100 μM 3,05 % ($p < 0,001$). Udio ukupnih apoptotskih stanica (rana i kasna apoptoza) u populaciji u odnosu na

kontrolni uzorak raste porastom koncentracije CRC-a. Kod netretiranih stanica taj je postotak iznosio 2,99 %, pri koncentraciji od 5 μM 7,36 % ($p < 0,005$), pri 50 μM raste do 83,65 % ($p < 0,001$), te kod 100 μM doseže postotak od 95,22 % ($p < 0,001$). Udio mrtvih stanica varira ovisno o primijenjenoj koncentraciji, pri čemu je najveći postotak zabilježen kod 5 μM CRC-a od 4,34 %, dok su kod ostalih koncentracije vrijednosti niže nego kod kontrolnog uzorka za koji je udio 1,86 %. Hu i sur. (2018) u svojem su istraživanju dokazali da kurkumin potiče apoptozu u MCF-7 staničnoj liniji u ovisnosti o dozi pri normalnim uvjetima uzgoja.



Slika 33. Udjeli živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica nakon tretmana MCF-7 stanica kurkuminom (CRC) (5, 50 i 100 μM) kultiviranih u LGIcM mediju. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (LGIcM + DMSO) (Student t -test): ^b $p < 0,025$, ^a $p < 0,001$.

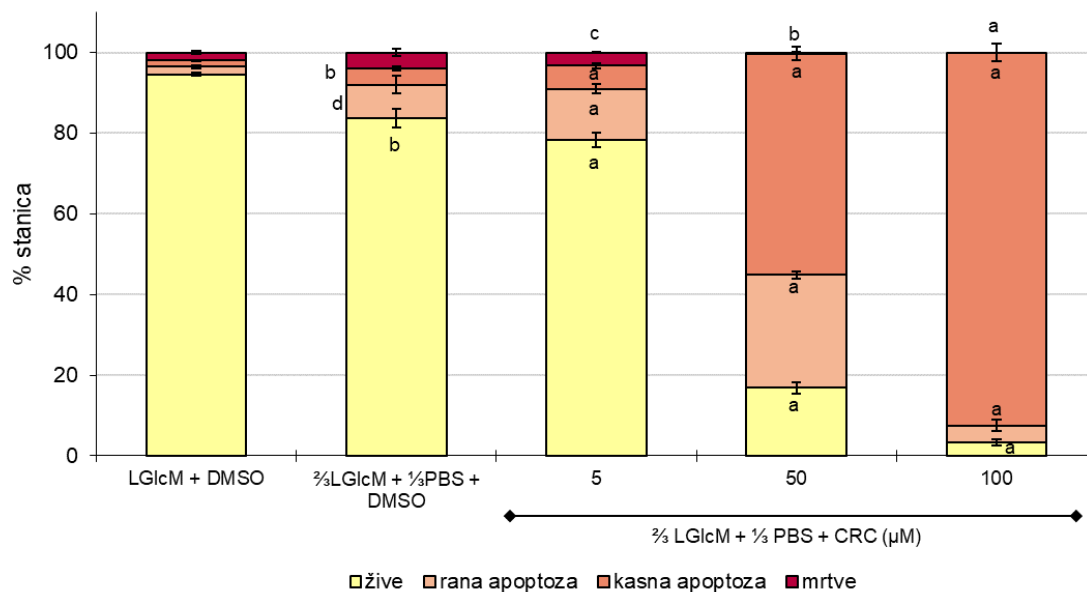
LGIcM + DMSO – stanice uzgajane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-
a mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 μM .



Slika 34. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami 72 sata nakon tretmana MCF-7 stanica kurkuminom (CRC) (5, 50 i 100 μM) kultiviranih u LGlcM mediju LGlcM + DMSO – stanice uzgajane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; CRC5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 μM .

Grafički prikaz na slici 35 prikazuje postotke stanica određene populacije nakon tretmana CRC-om i uzgoja u PBS-om razrijeđenom LGlcM mediju. Zabilježen je pad udjela živih stanica s 94,59 % u kontrolnom uzorku na 83,74 % u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju ($p < 0,005$). Tretman CRC-om rezultirao je daljnjim smanjenjem postotka živih stanica kako se njegova koncentracija povećavala te pri 100 μM pada na 3,38 % ($p < 0,001$). Udio ukupnih apoptotskih stanica raste povećanjem koncentracije CRC-a, s 3,46 % kod LGlcM medija, na 12,30 % kod $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS medija, na 18,37 % pri 5 μM , na 82,76 % pri 50 μM te sve do 96,59 % kod 100 μM CRC-a. Postotak mrtvih stanica varira ovisno o uvjetima – najveći je kod $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS medija gdje iznosi 3,96 %, dok je kod LGlcM medija taj postotak iznosio 1,95 %. Tretman CRC-om u dozama 50 i 100 μM uzrokuje staničnu smrt prvenstveno putem apoptoze, dok je odumiranje nekrozom zanemarivo.

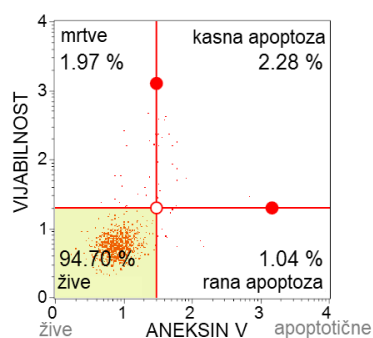
Iz rezultata se također može zaključiti da određene koncentracije CRC-a u uvjetima nižih koncentracija nutrijenata bolje induciraju apoptozu nego u uvjetima kada su svi nutrijenti dostupni (slika 33 i 35).



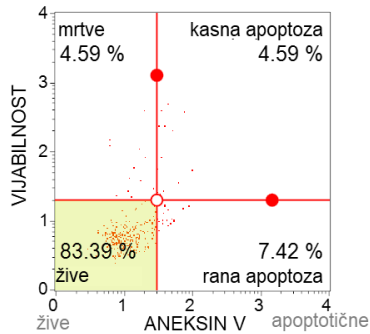
Slika 35. Udjeli živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica nakon tretmana MCF-7 stanica kurkuminom (CRC) (5, 50 i 100 μM) kultiviranih u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (LGlcM) (Student *t*-test): ^d $p < 0,05$, ^c $p < 0,01$, ^b $p < 0,005$; ^a $p < 0,001$.

LGlcM + DMSO – stanice uzgajane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS + DMSO – stanice kultivirane u $\frac{2}{3}$ DMEM *Low Glucose* medija (10 % FBS) i $\frac{1}{3}$ PBS-a te tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 μM .

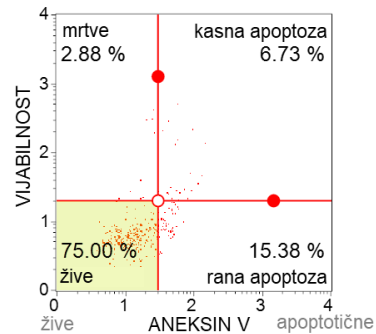
PROFIL APOPTOZE – LGlcM + DMSO



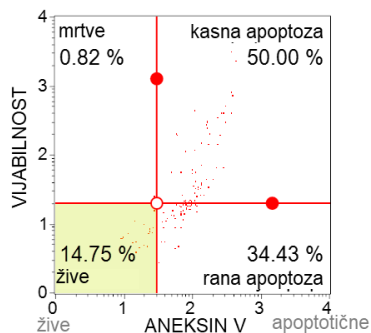
PROFIL APOPTOZE - $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS + DMSO



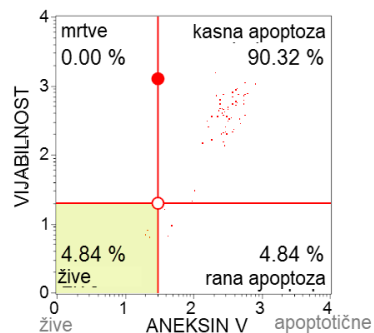
PROFIL APOPTOZE - CRC5



PROFIL APOPTOZE - CRC50



PROFIL APOPTOZE - CRC100



Slika 36. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami 72 sata nakon tretmana MCF-7 stanica kurkuminom (CRC) (5, 50 i 100 μM) kultiviranih u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS mediju LGlcM + DMSO – stanice uzgajane u DMEM *Low Glucose* mediju (10 % FBS) i tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS + DMSO – stanice kultivirane u $\frac{2}{3}$ DMEM *Low Glucose* medija (10 % FBS) i $\frac{1}{3}$ PBS-a te tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; CRC5 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama 5 – 100 μM .

5. ZAKLJUČCI

1. Razrjeđenje DMEM *High Glucose* i DMEM *Low Glucose* hranjivog medija s PBS ili HBSS puferom uzrokuje značajno smanjenje proliferacije MCF-7 stanica određeno MTT metodom. Metodom *Trypan Blue* nisu dobiveni statistički značajni rezultati, dok je metodom *Neutral Red* potvrđena niža vijabilnost stanica uzgajanih u PBS-om ili HBSS-om razrijeđenom HGlcM mediju.
2. Koncentracija dostupne glukoze nije se u većini eksperimenata pokazala kao parametar koji ograničava vijabilnost kanceroznih MCF-7 stanica, već je to ostvareno deprivacijom svih dostupnih nutrijenata.
3. Nutritivna deprivacija potiče autofagiju u MCF-7 kulturi stanica uzgojenoj u HGlcM mediju razrijeđenom s $\frac{1}{3}$ PBS.
4. Udjeli stanica u apoptozi viši su prilikom uzgoja stanica u LGlcM nego u HGlcM mediju, a najveći udio apoptotskih stanica određen je pri uzgoju MCF-7 stanica u LGlcM razrijeđenom s $\frac{1}{3}$ HBSS, iz čega se može zaključiti da je smanjena koncentracija glukoze u mediju za uzgoj stanica čimbenik koji može inducirati staničnu smrt apoptozom.
5. Uzgoj MCF-7 stanica u HGlcM ili LGlcM mediju, u koje je već tijekom samog naciepljivanja stanica dodan CRC ili PC (2,5 – 100 μ M) rezultira citotoksičnim učinkom oba spoja, pri čemu je CRC uzrokovao izraženiji pad u staničnoj vijabilnosti (pri koncentracijama 10 - 100 μ M) praćeno metodom MTT tijekom 96 sati. Smanjenje udjela glukoze u mediju nije rezultiralo pojačanim inhibitornim učinkom CRC-a/PC-a.
6. Učinak CRC-a i PC-a na stanice kultivirane u HGlcM i LGlcM medijima proveden je i na način da su stanice tretirane spojem 24 h nakon naciepljivanja (nakon formiranja staničnog monosloja) tako da se u mediju postignu koncentracije od 2,5 do 100 μ M (metoda MTT). Povećanjem koncentracije CRC-a/PC-a zamijećen je trend pada stanične proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak kod stanica uzgajanih u HGlcM ili LGlcM mediju, pri čemu se izražen citotoksični učinak postiže pri koncentracijama 50 – 100 μ M. Tretman stanica PC-om u koncentracijama od 10 do 100 μ M imao je statistički značajno jači inhibitorni efekt na rast stanica nego tretman istim koncentracijama CRC-a, što ukazuje na veću citotoksičnost novosintetiziranog PC-a u usporedbi s CRC-om.
7. Inhibitorno djelovanje CRC-a na rast stanica jače je na stanice kultivirane u $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS nego u LGlcM mediju određeno MTT, *Neutral Red* i *Trypan Blue* metodom, iz čega proizlazi zaključak da nutritivna deprivacija pojačava citotoksični učinak kurkumina. Značajna inhibicija rasta postiže se pri višim dozama (50 – 100 μ M).
8. CRC značajno inducira autofagiju u MCF-7 staničnoj liniji u LGlcM i $\frac{2}{3}$ LGlcM + $\frac{1}{3}$ PBS

medijima. *Autophagy induction ratio* raste porastom koncentracije CRC-a, pri čemu koncentracije od 5 i 50 μM jače potiču autofagiju u $\frac{2}{3}\text{LGlcM} + \frac{1}{3}\text{PBS}$ mediju, dok 100 μM koncentracija jače inducira autofagiju u LGlcM mediju.

9. Udio ukupnih stanica u apoptozi u LGlcM i $\frac{2}{3}\text{LGlcM} + \frac{1}{3}\text{PBS}$ medijima značajno raste povećanjem koncentracije CRC-a. Određene koncentracije (5 i 100 μM) bolje induciraju apoptozu u uvjetima nižih koncentracija nutrijenata.

6. LITERATURA

Akkoç Y, Berrak Ö, Arisan ED, Obakan P, Çoker-Gürkan A, Palavan-Ünsal N (2015) Inhibition of PI3K signaling triggered apoptotic potential of curcumin which is hindered by Bcl-2 through activation of autophagy in MCF-7 cells. *Biomed Pharmacother* **71**, 161–171.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.02.029>

Alberts B, Heald R, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K i sur. (2022) *Molecular Biology of the Cell*, 7. izd., W. W. Norton & Company, New York, str. 1089-1103

Arezki A, Chabot GG, Quentin L, Scherman D, Jaouen G, Brulé E (2011) Synthesis and biological evaluation of novel ferrocenyl curcuminoid derivatives. *MedChemComm* **2(3)**, 190-195.

<https://doi.org/10.1039/C0MD00231C>

Arshad L, Haque MA, Abbas Bukhari SN, Jantan I (2017) An overview of structure–activity relationship studies of curcumin analogs as antioxidant and anti-inflammatory agents. *Future Med Chem* **9(6)**, 605-626.

<https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0223>

Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A (2013) Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech* **6(6)**, 1353-63.

<https://doi.org/10.1242/dmm.011338>

Bose S, Zhang C, Le A (2021) *Glucose Metabolism in Cancer: The Warburg Effect and Beyond*. U: Le A (ured.) *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*, 2. izd., Springer, Baltimore, str. 3-15.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_1

Carneiro BA, El-Deiry WS (2020) Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*

17(7), 395-417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>

Choi HN, Jin HO, Kim JH, Hong SE, Kim HA, Kim EK i sur. (2013) Inhibition of S6K1 enhances glucose deprivation-induced cell death via downregulation of anti-apoptotic proteins in MCF-7 breast cancer cells.

Biochem Bioph Res Co **432(1)**, 123-128.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.074>

DeBerardinis RJ, Cheng T (2010) Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29(3)**, 313-24.

<https://doi.org/10.1038/onc.2009.358>

Demirel PB, Ozorhan U, Tuna BG, Cleary M, Dogan S (2019) Effects of different glucose concentrations on the leptin signaling pathway in MCF-7 and T47D breast cancer cells. *Annals*

of medical research **26(12)**, 2966. <https://doi.org/10.5455/annalsmedres.2019.09.542>

Feriotto G, Rondanin R, Marchetti P, Tagliati F, Beninati S, Tabolacc C i sur. (2023) Characterization of Stable Pyrazole Derivatives of Curcumin with Improved Cytotoxicity on Osteosarcoma Cell Lines. *Life* **13(2)** 431. <https://doi.org/10.3390/life13020431>

Furuta E, Okuda H, Kobayashi A, Watabe K (2010) Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *BBA Rev Cancer* **1805(2)**, 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.005>

Giordano A, Tommonaro G (2019) Curcumin and Cancer. *Nutrients* **11**, 2376. <https://doi.org/10.3390/nu11102376>

Green DR, Llambi F (2015) Cell Death Signaling. *CSH Perspect Biol* **7(12)**, a006080. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>

Gunnink LK, Alabi OD, Kuiper BD, Gunnink SM, Schuiteman SJ, Strohbahn LE i sur. (2016) Curcumin directly inhibits the transport activity of GLUT1. *Biochimie* **125**, 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.03.014>

Heras BL, Amesty Á, Estévez-Braun A, Hortelano S (2019) Metal complexes of natural product like-compounds with antitumor activity. *Anti-Cancer Agent Me* **19(1)**, 48-65. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180420165821>

Hu S, Xu Y, Meng L, Huang L, Sun H (2018) Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. *Exp Ther Med* **16(2)**, 1266-1272. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6345>

Khajah MA, Khushaish S, Luqmani YA (2022) Glucose deprivation reduces proliferation and motility, and enhances the anti-proliferative effects of paclitaxel and doxorubicin in breast cell lines in vitro. *PLoS One* **17(8)**, e0272449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272449>

Li T, Copeland C, Le A (2021) Glutamine Metabolism in Cancer. U: Le A (ured.) The Heterogeneity of Cancer Metabolism, 2. izd., Springer, Baltimore, str. 17-38. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_2

Liang G, Shao L, Wang Y, Zhao C, Chu Y, Xiao J i sur. (2009) Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both *in vitro* and *in vivo* as cytotoxic agents. *Bioorgan Med Chem* **17(6)**, 2623-2631. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.044>

Mari M, Boniburini M, Tosato M, Rigamonti L, Cuoghi L, Belluti S i sur. (2023) Development of Stable Amino-Pyrimidine-Curcumin Analogs: Synthesis, Equilibria in Solution, and Potential Anti-Proliferative Activity. *Int J Mol Sci* **24(18)**, 13963. <https://doi.org/10.3390/ijms241813963>

Martel F, Guedes M, Keating E (2016) Effect of polyphenols on glucose and lactate transport by breast cancer cells. *Breast Cancer Res Tr* **157**, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3794-z>

Medina RA, Owen GI (2002) Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* **35(1)**, 9-26. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602002000100004>

Moghaddam NSA, Oskouie MN, Butler AE, Petit PX, Barreto GE, Sahebkar A (2019) Hormetic effects of curcumin: What is the evidence? *J Cell Physiol* **234(7)**, 10060-10071. <https://doi.org/10.1002/jcp.27880>

NHGRI (2024) Apoptosis. NHGRI-National Human Genome Research Institute, Bethesda, Maryland), <https://www.genome.gov/genetics-glossary/apoptosis>. Pristupljeno 15. svibnja 2024.

Park JK, Coffey NJ, Limoges A, Le A (2021) The Heterogeneity of Lipid Metabolism in Cancer. U: Le A (ured.) *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*, 2. izd., Springer, Baltimore, str. 39-56. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_3

Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antiox Redox Sign* **20(3)**, 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>

Pateras IS, Williams C, Gianniou DD, Margetis AT, Avgeris M, Rousakis P i sur. (2023) Short term starvation potentiates the efficacy of chemotherapy in triple negative breast cancer via metabolic reprogramming. *J Transl Med* **21(1)**, 169. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03935-9>

Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB (2014) Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat* **46(1)**, 2-18. <https://doi.org/10.4143/crt.2014.46.1.2>

Priyadarsini KI (2014) The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules* **19(12)**, 20091-20112. <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>

Pröhl M, Schubert US, Weigand W, Gottschaldt M (2016) Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy. *Coordin Chem Rev* **307**,

32–41. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.09.001>

Shakeri A, Panahi Y, Johnston TP, Sahebkar A (2019) Biological properties of metal complexes of curcumin. *BioFactors* **45(3)**, 304-317. <https://doi.org/10.1002/biof.1504>

Shakeri A, Sahebkar A (2016) Optimized curcumin formulations for the treatment of Alzheimer's disease: A patent evaluation. *J Neurosci Res* **94(2)**, 111-113. <https://doi.org/10.1002/jnr.23696>

Song Q, Mao B, Cheng J, Gao Y, Jiang K, Chen J i sur. (2015) YAP enhances autophagic flux to promote breast cancer cell survival in response to nutrient deprivation. *PloS One* **10(3)**, e0120790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120790>

Szablewski L (2013) Expression of glucose transporters in cancers. *BBA-Rev Cancer* **1835(2)**, 164-169. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.12.004>

Tsai PY, Lee MS, Jadhav U, Naqvi I, Madha S, Adler A i sur. (2021) Adaptation of pancreatic cancer cells to nutrient deprivation is reversible and requires glutamine synthetase stabilization by mTORC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118(10)**, e2003014118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003014118>

Urošević M, Nikolić L, Gajić I, Nikolić V, Dinić A, Miljković V (2022) Curcumin: Biological Activities and Modern Pharmaceutical Forms. *Antibiotics* **11(2)**, 135. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020135>

Walker A, Singh A, Tully E, Woo J, Le A, Nguyen T i sur. (2018) Nrf2 signaling and autophagy are complementary in protecting breast cancer cells during glucose deprivation. *Free Radical Bio Med* **120**, 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.009>

Wang H, Xu Y, Sun J, Sui Z (2021) The Novel Curcumin Derivative 1g Induces Mitochondrial and ER-Stress-Dependent Apoptosis in Colon Cancer Cells by Induction of ROS Production. *Frontiers in oncology* **11**, 644197. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.644197>

Warburg O (1956) On the Origin of Cancer Cells. *Science* **123**, 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

White E, DiPaola RS (2009) The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* **15(17)**, 5308-16. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5023>

Yun CW, Lee SH (2018) The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci* **19(11)**, 3466. <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>

Zoi V, Kyritsis AP, Galani V, Lazari D, Sioka C, Voulgaris S i sur. (2024) The Role of Curcumin in Cancer: A Focus on the PI3K/Akt Pathway. *Cancers* **16(8)**, 1554. <https://doi.org/10.3390/cancers16081554>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Laura Režek, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Laura Režek

Vlastoručni potpis