



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Antonija Hanžek, Angela Milanović

**Učinak kvercetina na vijabilnost MDA-MB-231 stanica
karcinoma dojke**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Józsefa Petrika u okviru Sveučilišne financijske potpore pod nazivom „Ekspresija gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze i glikoliza u stanicama karcinoma dojke“ i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017/2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. KARCINOM DOJKE	1
1.2. <i>IN VITRO</i> MODELI KARCINOMA DOJKE	3
1.3. MDA-MB-231 STANIČNA LINIJA KARCINOMA DOJKE	5
1.4. REPROGRAMIRANJE METABOLIZMA U TUMORSKIM STANICAMA	5
1.5. APOPTOZA.....	9
1.6. UČINAK FLAVONOIDA NA STANICE KARCINOMA	11
1.7. KVERCETIN.....	15
1.8. UČINAK KVERCETINA NA STANICE KARCINOMA.....	16
2. CILJ RADA	18
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. KORIŠTENJE KEMIKALIJE	19
3.2. MDA-MB-231 STANIČNA LINIJA.....	20
3.3. PROCJENA CITOTOKSIČNIH UČINAKA MTT TESTOM	22
3.4. DETEKCIJA APOPTOZE TUNEL METODOM.....	23
3.5. PRIKAZ I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	26
4. REZULTATI	27
4.1. PROCJENA CITOTOKSIČNIH UČINAKA MTT TESTOM	30
4.2. KARAKTERIZACIJA MORFOLOŠKIH PROMJENA STANICA BOJANJEM HEMATOKSILINOM I EOZINOM.....	38
4.3. DETEKCIJA APOPTOZE TUNEL METODOM.....	42
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČCI	48
7. ZAHVALE	49
8. POPIS LITERATURE	50

9. SAŽETAK	53
10. SUMMARY	55

1. UVOD

1.1. KARCINOM DOJKE

Karcinom dojke najčešće je dijagnosticirana maligna bolest žena današnjice i veliki javnozdravstveni problem u Republici Hrvatskoj. Prema podacima Državnog registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, stope incidencije i mortaliteta za rak dojke u Hrvatskoj, u stalnom su porastu posljednja dva desetljeća i rastu s dobi bolesnica. S incidencijom od 119/100 000 te stopom mortaliteta 48/100 000 (<https://www.hzjz.hr>) karcinom dojke jedan je od vodećih uzroka smrtnosti, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti.

Heterogena priroda i kompleksnost karcinoma dojke predstavljaju izazov za znanstvena istraživanja usmjerena na proučavanje karcinoma dojke. Ona dovode do napretka u razumijevanju patofiziologije i molekularnih mehanizama bolesti rezultirajući specifičnijim i osjetljivijim dijagnostičkim metodama za što ranije otkrivanje bolesti, kao i identifikacijom novih, učinkovitijih i manje toksičnih opcija postojeće terapije s ciljem povećanja stupnja preživljenja i poboljšanja kvalitete života.

Dojka je parni simetrični organ smješten na prednjoj strani prsnog koša koji oblikuje dva osnovna tipa tkiva: žljezdano tkivo te potporni dio. Žljezdano tkivo mliječne žlijezde uloženo je u potpurnu vezivnu strumu te obloženo pripadajućim masnim tkivom, sustavnom limfnih i krvnih žila i odgovarajućim živcima. Mliječnu žlijezdu čine alveotubularne žlijezde (lat. *lobi glandulae mammariae*) od kojih svaka sadrži izvodni kanal (lat. *ductus lactiferi*) koji se otvara na bradavici dojke. Režnjevi se dijele na manje režnjiće (lat. *lobuli glandulae mammariae*), odijeljene vezivnim pregradama (Sharma i sur., 2010).

Tumori se mogu razviti ovisno o vrsti tkiva i mogu bit dobroćudni i zloćudni. Zloćudni tumor dojke najčešće je upravo karcinom epitelnog podrijetla. S obzirom na odnos malignih stanica prema bazalnoj membrani, karcinomi mogu biti neizvazivni ukoliko ne prelaze bazalnu membranu ili invazivni ukoliko njihov rast i proliferacija uzrokuju degradaciju bazalne membrane i širenje putem limfe ili krvi.

Postoje brojne podjele, podtipovi i klasifikacije zloćudnih tumora ovisno o histomorfološkim i molekularnim obilježjima koje ukazuju na agresivnost i prirodu tumora. Mogu biti korisne kao prediktivni čimbenik preživljenja te omogućuju klasifikaciju pacijentica u skupine za adekvatan odabir liječenja.

Najčešći patohistološki tip raka dojke je duktalni karcinom koji čini preko 80% svih karcinoma dojke i razvija se iz stanica koje su lokalizirane oko kanala. Mogu biti lobularni, medularni, mucinozni i papilarni. Pojedina vrsta može biti invazivna ili infiltrirajuća ukoliko degradira bazalnu membranu i prodire u okolno masno i vezivno tkivo ili ima sposobnost metastaziranja u limfne čvorove i organe ili ne-invazivna, lokaliziran na jednom mjestu (Sharma i sur., 2010).

Karcinom dojke nastaje kao rezultat utjecaja vanjskih, tj. okolišnih čimbenika na genetski predisponiranu osobu. Nakon primarne inicijacije, intaktna stanica podliježe malignoj transformaciji i promovira se u tumorski promijenjenu stanicu koju karakterizira nekontrolirani autonomni rast i proliferacija, promijenjeni metabolizam i sposobnost infiltracije i metastaziranja. Čimbenici rizika su spol, dob, genetska predispozicija, utjecaj karcinogena i mutagena, visoka razina hormona, alkohol i pretilost.

Rak je genetska bolest koja nastaje uslijed genetskih promjena onih gena koji sudjeluju u kontroli načina na koji stanice funkcioniraju, posebice onih koji sudjeluju u rastu, diobi, popravku genetskog materijala i staničnoj smrti. Svi tumori nose somatske mutacije u svom genomu, međutim postoje interindividualne razlike što predstavlja dodatni izazov pri pravilnom odabiru liječenja. Međutim, postoji korelacija između broja mutacija, dobi kada je tumor dojke dijagnosticiran i histološke građe tumora (Stephens i sur., 2012).

U etiologiji i patogenezi nastanka tumora prisutne su genetske abnormalnosti vezane za mehanizme popravka pogrešaka u DNA i mogu biti nasljedne ili stečene. Potrebno je više genetskih mutacija kako bi se stanica maligna transformirala. Kasnije dolazi do nakupljanja daljnjih mutacija koje rezultiraju nekontroliranom diobom, gubitkom kontaktne inhibicije i međusobne adhezije stanica što dovodi do odvajanja i metastaziranja u organe. Neke od mutacija uključene u molekularnu patofiziologiju karcinoma dojke su *BRCA1* i *BRCA2* mutacije koje su povezane sa povećanim rizikom

te predstavljaju temeljnu osjetljivost za razvoj raka dojke. Prisutne su vrlo heterogene mutacije p53 koji može biti identificiran u preko 30% raka dojke.

Nadalje, žene nositeljice mutacije *PTEN* gena imaju povišen rizik za nastanak karcinoma dojke. Gubitak PTEN funkcije uključen je u proces formiranja tumora, ali i rezistenciju na terapiju (Karami i Mehripour, 2013).

Postoje 5 glavnih vrsta karcinoma dojke ovisno o genu koji je u tkivu eksprimiran, a temelje se na ekspresiji estrogenskog (ER), progesteronskog (PR) hormonskog receptora, HER2 receptora (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) te proteina Ki-67 koji je uključen u kontrolu proliferacije stanica (www.breastcancer.org). Svaki od njih ima svojstvenu brzinu rasta, a posljedično i drugačiju prognozu te najbitnije drugačiji, pravilan odabir liječenja.

Izazov u liječenju predstavlja trostruko-negativan karcinom dojke budući da je hormonski neovisan rak koji pokazuje visok stupanj malignosti. Uspoređujući ih sa drugim molekularnim podtipovima, ima visoku tendenciju metastaziranja, visok udio stanične proliferacije i posljedično lošu prognozu. Pokazuje agresivniji klinički tijek u odnosu na ostale karcinome dojke (Dent i sur., 2007).

Prema sadašnjim spoznajama, izuzev klasične kemoterapije ili radioterapije, ne postoji odgovarajuća specifična meta i opcija terapije ovakvog tipa karcinoma dojke stoga je bitno usmjeriti interes na istraživanje ove vrste raka dojke što nam omogućuje istraživanje na *in vitro* modelu- staničnoj liniji MDA-MB-231.

1.2. IN VITRO MODELI KARCINOMA DOJKE

Rak dojke kompleksna je skupina bolesti Brojne studije i istraživanja pokazuju da progresija tumora, kao i odgovor na terapiju variraju zbog heterogenosti tumora uzrokovanih genetskim mutacijama i aberantnom proteinskom ekspresijom, a također su pod utjecajem lokalnog tumorskog mikrookoliša. Da bi se uspješno identificirali novi ciljevi razumijevanja karcinoma, kao i otkrile potencijalne nove mete i poboljšale postojeće opcije terapije s ciljem smanjenja stope smrtnosti, potrebni su *in vitro* sustavi staničnih kultura.

Stanične kulture karcinoma predstavljaju modelne sustave koji omogućuju otkrivanje različitih mutagenih i kancerogenih čimbenika, istraživanje stanica raka, njihova rasta, proliferacije, metastaziranja i metabolizma. Također, mogu predvidjeti kliničke odgovore što može poslužiti za razvoj novih metoda dijagnostike te otkrivanja novih potencijalnih antitumorskih lijekova, kao i za poboljšanje postojeće kemoterapije (Gillet i sur., 2013).

Kulture stanica dobivaju se izravnim uklanjanjem tumorskog dijela organa ili tkiva. Mogu se izdovoljiti mehaničkim ili enzimatskim metodama nakon čega slijedi izolacija stanica te uzgoj u odgovarajućim kontroliranim *in vitro* uvjetima. Takve kulture nazivamo primarnim kulturama, a njihova je prednost direktna izolacija iz tumora. Ukoliko su stanice izvedene iz kulture koja je već uspostavljena, dobivamo sekundarne ili tercijarne stanične linije koje karakterizira ograničen životni vijek. Povećanje broja stanica svakom diobom dovodi do iscrpljivanja supstrata i hranjivih tvari u mediju, a stanična aktivnost povećava razinu toksičnih metabolita u kulturi što inhibira daljnji rast stanica.

Stanične linije karcinoma dojke mogu biti dobivene iz primarnog karcinoma dojke, ovisno o lokalizaciji i vrsti tumora, ili iz tumorskih metastaza dobivenih iz pleurnog izljeva ili ascitesa. Većina metastatskih staničnih linija vezana je za progresivne tipove karcinoma dojke ili kasnije stadije bolesti budući da pokazuju veću agresivnost i broj stanica.

Studije ukazuju da stanične kulture vjerno reflektiraju većinu važnih genomskih i transkripcijskih abnormalnosti nađenih u primarnom tumoru dojke te analiza karakteristika i genoma takvih stanica korelira i pridonosi razumijevanju patofiziologije karcinoma dojke (Neve i sur., 2006). Međutim, ipak postoji određena vjerojatnost nastanka genotipskih i fenotipskih odstupanja. Ipak, zbog jednostavnosti korištenja te gotovo neograničenih količina zastupljen su *in vitro* model u laboratorijskim istraživanjima bolesti i tumora. Prednost također predstavlja mogućnost manipulacije i kontrole točno definiranih uvjeta u kojima stanice rastu što ne bi bilo moguće postići u kontekstu čitavog organizma, a uvelike pridonosi razumijevanju karcinoma dojke. *In vitro* modeli ne predstavljaju kompleksno fiziološko stanje karcinoma u sklopu čitavog organizma. Nužno je vjerodostojno interpretirati rezultate i imati mogućnost primjene ispitivanja s istim ciljem u *in vivo* uvjetima.

Postoje različite vrste staničnih linija koje se koriste za istraživanje raka dojke ovisno o njihovim histološkim i morfološkim karakteristikama, od kojih su neke stanične linije invazivnog dukalnog karcinoma MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, T-47D.

1.3.MDA-MB-231 STANIČNA LINIJA KARCINOMA DOJKE

MDA-MB-231 je stanična linija humanog raka dojke izvedena iz pleuralnog izljeva 51-godišnje žene, bjelkinje sa metastatskim adenokarcinomom. MDA-MB-231 je agresivan, invazivan i slabo diferenciran trostruko-negativan rak dojke. Negativan je na ekspresiju estrogenskog (ER) i progesteronskog (PR) receptora, kao i na HER2 (humani epidermalni faktor rasta) receptorsku amplifikaciju.

Kao i kod ostalih agresivnih tumorskih staničnih linija, invazivnost MDA-MB-231 stanica praćena je protelitičkom degradacijom izvanstaničnog matriksa. Pokazuje niski stupanj ekspresije biljega proliferacije Ki-67, a karakterizira je povišena razina biljega povezanih sa epitelno-mezenhimalnom tranzicijom i ekspresijom povezanom sa tumorom matičnih stanica raka dojke (CSCs), kao što su CD44+ CD24-/niski fenotip (www.phe-culturecollections.org.uk).

Jedna je od najčešćih staničnih linija humanog raka dojke korištenih u medicinskim znanstvenim istraživanjima kao *in vitro model* hormonski neovisnog karcinoma dojke.

1.4.REPROGRAMIRANJE METABOLIZMA U TUMORSKIM STANICAMA

Promjene u metabolizmu i adaptacije tumorskih stanica intenzivno se proučavaju u posljednjem stoljeću. Tumorske stanice pokazuju metabolizam znatno drugačiji od onog u stanicama od kojih same potječu. Reprogramiranje metabolizma omogućava tumorskim stanicama održavanje visoke stope proliferacije, doprinosi progresiji i širenju tumora te obrani od signala stanične smrti. Poznavanje metaboličkih fenotipova pojedinih vrsta tumora ima implikacije, kako u razumijevanju osnovne patofiziologije tumora, tako i u kliničkoj onkologiji, budući nam može poslužiti za oslikavanje tumora,

pružanje prognostičke informacije i terapiju tumora (Vander Heiden i DeBerardinis, 2017; Tennant i sur., 2010).

U ljudskom organizmu, proliferacija stanica je stalno prisutna, naročito u procesima embriogeneze te rasta i obnavljanja tkiva, ali isto tako i u onkogenezi. Normalne, zdrave stanice na proliferaciju bivaju potaknute signalima rasta iz okoline koji u njima izazivaju promjene koje će im omogućiti da ispune sve energetske zahtjeve procesa proliferacije. Zapravo, ukoliko signal rasta izostane, stanica nije u mogućnosti održati unos nutrijenata potreban za ovako energetski zahtjevan proces, zbog čega limitiranu količinu nutrijenata koristi za „puko preživaljavanje“. Za razliku od normalnih stanica, tumorske stanice imaju povećanu metaboličku autonomiju, tj. za poticanje proliferacije i metaboličkih puteva koji će im osigurati svu potrebnu energiju i gradivne biomolekule ne trebaju vanjski signal. Naime, iako su signalni putevi u tumorskim stanicama očuvani, prilikom nastanka stanice tumora često stječu mutacije koje kronično aktiviraju signalne puteve, bez prethodne ekstracelularne stimulacije (DeBerardinis i sur., 2008).

Metabolizam proliferirajućih stanica razlikuje se od stanica u mirovanju. Odlikuju ga povećan unos nutrijenata, veća stopa glikolize, proizvodnje laktata te biosinteze makromolekula. Međutim, važno je pritom naglasiti da metabolizam stanica tumora, iako sličnih/istih značajki/odlika, ne možemo poistovjetiti s metabolizmom stanica u procesu proliferacije. Neke od prepoznatljivih značajki tumorskih stanica su (deregulirani) povećan unos glukoze i aminokiselina, uporaba oportunističkih načina pribavljanja nutrijenata, uporaba međuprodukata glikolize i ciklusa trikarboksilnih kiselina za biosintezu i proizvodnju NADPH, povećana potreba za dušikom, promjene genske regulacije ovisne o metabolizmu te metabolička interakcija s mikrookolinom (Tennant i sur., 2010; Pavlova i Thompson, 2016).

Još 1920ih godina, njemački fiziolog, Otto Warburg, primijetio je da tumorske stanice značajno više troše glukozu u odnosu na neproliferirajuće stanice, čak i u prisutnosti dovoljne količine kisika. Ovaj fenomen poznat je kao „Warburg-ov efekt“ ili aerobna glikoliza. Iako je u svojim prvim radovima ustanovio kako je za ubijanje tumorske stanice uskraćivanjem energije potrebno spriječiti dotok i glukoze i kisika, Warburg je kasnije tvrdio kako je trajni defekt u mitohondrijima uzrok aerobne glikolize. Smatrao je kako su nefunkcionalni mitohondriji primarni uzrok raka (Warburg, 1956; Warburg i

sur., 1927; Warburg, 1925). Njegove tvrdnje demantirale su mnoge kasnije studije koje nisu dokazale defekt u respiraciji kao opću značajku tumorskih stanica, ali su (potvrdile pojačanu glikolizu) došle do zaključka kako su respiracija i druge mitohondrijske aktivnosti potrebne za tumorski rast. Spoznaja da je aerobna glikoliza regulirana signalima čimbenika rasta te da je Warburgov efekt reverzibilni fenomen i u ostalim proliferirajućim stanicama navelo je znanstvenike na zaključak da je poremećaj regulacije signalima čimbenika rasta pokretač onkogeneze (Liberti i Locasale, 2016; Vander Heiden i DeBerardinis, 2017).

Također, GLUT1 transporter za unos glukoze u tumorskim stanicama prekomjerno je eksprimiran. Genetičke promjene u receptorskim tirozin kinazama te signalnim putevima fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) dovode do konstitutivno povećanog unosa i potrošnje glukoze u raznim vrstama tumora. PI3K signalni put povezan je sa kontrolom rasta te metabolizma glukoze budući da regulira unos i mobilizaciju glukoze. Čak i u o inzulinu neovisnim tkivima, PI3K/Akt/mTOR potiče ekspresiju mRNA za GLUT1 te translokaciju GLUT1 proteina na površinu stanice (DeBerardinis i sur., 2008; Pavlova i Thompson, 2016).

Povećana potrošnja glukoze koristi se kao izvor ugljika za anaboličke procese potrebne za održavanje proliferacije stanice. Međuprodukti nastali razgradnjom glukoze koriste se za sintezu nukleotida, lipida i proteina. Osim *de novo* sinteze makromolekula, povećan unos glukoze omogućava i povećanu sintezu reducirajućih ekvivalenata (NADPH) u putu pentoza fosfata. NADPH stanica dalje koristi u reduktivnoj biosintezi, poglavito *de novo* sintezi lipida. Još jedna biosintetska funkcija Warburgovog efekta bila bi regeneracija NAD^+ iz NADH pretvorbom piruvata u laktat kako bi se glikoliza mogla održati. Međutim, većina ugljika nastalog aerobnom glikolizom ne koristi se za biosintezu nego biva izbačena iz stanice u obliku laktata pa se smatra da je TCA ciklus glavni izvor supstrata za biosintezu nukleotida, aminokiselina i lipida (Liberti i Locasale, 2016).

U aerobnoj glikolizi, u reakciji kataliziranoj laktat-dehidrogenazom piruvat se prevodi u laktat. Pojačana razgradnja glukoze fermentacijom dovodi do proizvodnje laktata u suvišku koji se zatim izbacuje iz stanice pomoću monokarboksilatnih transportera (MCT) za koje je pronađeno da su pojačano eksprimirani u tumorskim stanicama. Višak laktata izbačen iz stanica u hipoksičnim uvjetima služi kao metaboličko gorivo

tumorskim stanicama u blizini krvnih žila koje imaju obilje kisika pa možemo zaključiti da laktat nije samo otpad. Osim toga, laktat također aktivno stimulira migraciju tumorskih stanica, pojačava glikolizu i inducira angiogenezu u tumorima (Jiang, 2017). Nagomilavanje laktata u izvanstaničnom prostoru dovodi do kroničnog zakiseljavanja mikrookoliša tumorskih stanica. Nadalje, dokazano je da se acidoza iz tumorskog tkiva širi u okolno zdravo tkivo zbog difuzije H^+ iona niz koncentracijski gradijent. Zdrave stanice koje nemaju mehanizme prilagodbe na izvanstaničnu acidozu ne mogu preživjeti u ovakvim uvjetima što za tumorske stanice predstavlja selektivnu prednost. Usporedimo li neinvazivne MCF-7 stanice karcinoma dojke koje imaju nižu stopu aerobne glikolize i invazivne MDA-MB-231 stanica karcinoma dojke s visokom stopom aerobne glikolize, mogli bismo zaključiti kako navedeni uvjeti pogoduju invazivnosti tumora. Osim s povećanom invazivnošću, metabolički fenotip s pojačanom aerobnom glikolizom povezan je i s povećanom incidencijom metastaziranja (Jiang, 2017; Gatenby i Gillies, 2004).

Okolišni pH također utječe i na imunski odgovor organizma na tumor. T limfociti koji infiltriraju tumor za vrijeme aktivacije također povećavaju unos glukoze te potrebnu energiju proizvode aerobnom glikolizom pa se s tumorskim stanicama moraju natjecati za resurse. Niski pH i visoka koncentracija laktata porijeklom iz tumorskih stanica inhibiraju izlučivanje laktata iz T limfocita zbog čega je njihova proliferacija sve slabija, a lučenje citokina smanjeno kao i sposobnost eradikacije aberantnih stanica. Na ovaj način tumorske stanice si osiguravaju imunost te uspješno izbjegavaju imunski odgovor organizma. Konačno, povećano preživljavanje stanica raka prilikom radioterapije i nekoliko kemoterapijskih lijekova podržano je općenitim antioksidativnim svojstvima laktata koji inhibira citotoksične učinke ROS nastalih tijekom terapija (Jiang, 2017; Liberti i Locasale, 2016).

Na temelju navedenih saznanja, aktivno se proučavaju i razvijaju lijekovi koji bi ciljali metabolizam tumorskih stanica. Najčešća prepreka kod ovog pristupa razvoju lijekova pitanje je selektivnosti. Ipak, sve je više dokaza da hiperbolička ovisnost tumorskih stanica o glikolizi čini mnoge glikolitičke enzime, kao i glukozne transportere, pogodnim kandidatima za razvoj antitumorske terapije (Granchi i Minutolo, 2012).

1.5.APOPTOZA

Proces programirane stanične smrti, ili apoptoze, te pravilno i pravodobno odvijanje ovog mehanizma nužno je za fiziološko funkcioniranje organizma, ali je i prepoznati čimbenik u etiologiji i patogenezi različitih bolesti. Smatra se vitalnom komponentom različitih procesa, uključujući regulaciju broja i prometa stanica, pravilan razvoj i funkciju imunskog sustava i posredovanje u embrionalnom razvoju. Homeostaza broja i integriteta svih stanica i tkiva definirana je ravnotežom između sinteze i vijabilnosti novih stanica te uklanjanja starih, oštećenih ili nepotrebnih stanica. Apoptoza je ključna kao proces fiziološkog, prirodnog uklanjanja i obnavljanja stanica i tkiva. Poremećaji na razini usporene ili ubrzane apoptoze mogu biti čimbenik u nastanku brojnih patoloških stanja, od neurodegenerativnih i autoimunih bolesti, ishemijskih oštećenja ili različitih tumora (Kiraz i sur., 2016).

Istraživanja usmjerena na proučavanje apoptoze, analizu kontrole staničnog ciklusa i signalnih puteva uključenih u programiranu staničnu od velike su važnosti jer je upravo modulacija života ili smrti stanica prepoznata zbog velikog dijagnostičkog i terapijskog potencijala. Karakterizira ju složenost različitih makromolekularnih, biokemijskih i enzimskih sustava koji u njoj sudjeluju, a praćena je vidljivim morfološkim i biokemijskim promjenama. Pojave koje karakteriziraju stanice u apoptozi su kondenzacija kromatina i stvaranje mjehurića na membranama, aktivacija kaspaza i fragmentacija DNA na lomove veličine nukleosoma te razlaganje citoskeleta sa posljedičnim formiranjem apoptotičkih tjelešaca. Apoptoza je uključena u patogenezu nastanka i progresije tumora. Reducirana, prespora ili izbjegnuta programirana stanična smrt povezana je sa smanjenom eliminacijom malignih stanica, hiperplazijom i progresijom tumora, kao i rezistencijom na antitumorsku terapiju (Elmore,2007).

Proces apoptoze je veoma kompleksan, a stimulirana je i započinje posredstvom dva različita signalna puta. Vanjski ili mitohondrijski put nastaje uslijed otpuštanja citokroma c iz membrane mitohondrija što rezultira aktivacijom kaspaza ili vanjskim putem koji nastaje kao rezultat vezanja Fas liganda, tzv. liganda smrti, na odgovarajuće receptore kao odgovor na egzogene signale (Kiraz i sur., 2016).

Postoje brojni mehanizmi kako maligno transformirana stanica može ispoljiti smanjenje stupnja apoptoze ili rezistenciju na istu. Povećana proliferacija i ubrzan rast

posljedica su narušene ravnoteže pro-apoptotičkih i anti-apoptotičkih proteina s pojačanom ekspresijom anti-apoptotičkih i smanjenom ekspresijom pro-apoptotičkih proteina. Može biti posljedica gubitka ili smanjene aktivnosti ili funkcije kaspaza, mutacija i disfunkcija p53 te poremećaja na razini stanične signalizacije receptora za ligande stanične smrti (Wong, 2011).

Tehnike i metode detekcije i određivanja temelje se na morfološkim, biokemijskim, molekularnim ili imunološkim obilježjima i promjenama stanica uslijed apoptoze. Morfološke karakteristike specifične za apoptozu su smanjenje volumena stanica, piknoza, fragmentacija stanične jezgre i pupanje stanične membrane te su mogu vizualno uočiti u histološkim preparatima nakon bojanja hematoksilinom i eozinom.

Ostale metode mogu biti protočna citometrija, promjena koncentracija staničnog kalcija, proučavanje disfunkcije mitohondrija, promjene propusnosti membrane ili promjene na staničnoj membrani kao što su prisutnost fosfatidilserina na vanjskoj membrani stanice. Nadalje, može se pratiti aktivnost kaspaza korištenjem fluorogenim ili kromogenih supstrata za razlikovanje aktivnih kaspaza ili imunohistokemijskim tehnikama korištenjem antitijela usmjerenih na neoepitope koji nastaju nakon proteolitičke degradacije kaspazama.

Budući da je internukleosomna fragmentacija DNA osnovno obilježje apoptoze i sama detekcija najčešće se temelji na toj činjenici. Aktivirane endonukleaze kidaju DNA na lomove veličine višekratnika 180-200 parova baza što se može uočiti elektroforezom na agaroznom gelu. Također, određivanje sadržaja DNA može biti pomoću protočne citometrije ili na temelju označavanja lomova lanca DNA korištenjem obilježenim dUTP-ova fluorescentnim bojama, biotinom ili digoksigeninom. Apoptoza na staničnoj razini otkriva se pomoću TUNEL metode (engl. *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) za detekciju jednostrukih i dvostrukih lomova DNA u tkivnim preparatima ili staničnim suspenzijama (Petrik i sur., 2003).

1.6. UČINAK FLAVONOIDA NA STANICE KARCINOMA

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva različitih u strukturi, funkcijama i karakteristikama. Ovim je supstancama zajedničko obilježje benzo-piranska struktura i ubikvitarni su spojevi u biljkama.

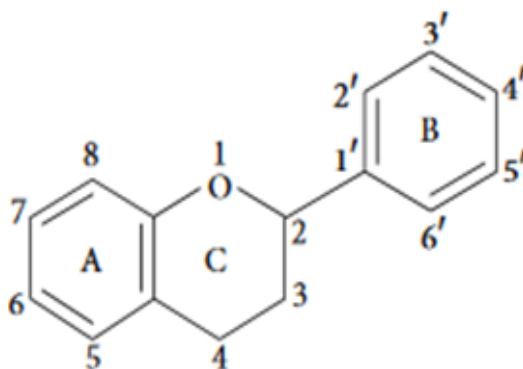
Danas sa novim spoznajama, raste interes za izolaciju i znanstveno istraživanje flavonoida. Netoksičnost za ljudski organizam sa širokim spektrom biološke i farmakološke aktivnosti čini ih zanimljivom skupinom spojeva za proučavanje u kontekstu prevencije i terapije različitih bolesti. Protuupalno, antimikrobno, antioksidativno, antiproliferativno, antitumorsko djelovanje, zaštita od slobodnih radikala te antihipertenzivno djelovanje uz povoljan učinak na kardiovaskularni sustav samo su neki od učinaka flavonoida.

Sekundarni metaboliti biljaka, flavonoidi, odgovorni su za različite procese u biljkama. Sintetiziraju se kao odgovor na mikrobnu infekciju, a zaštita od biljnih patogena jedna je od uloga. Nadalje, uključeni su rast i razvojne procese, utječu na izgled, boju i aromu cvijeta te svojstva ploda da privuče oprašivače. Štite biljku od biotika i abiotičkih procesa djelujući kao UV filter za zaštitu od svijetlosti.

Budući da su sastavni dijelovi biljaka, sveprisutne su sastavnice ljudske prehrane. Prisutni su u hrani i piću, kao što su voće, povrće, čaj, kakao i vino i kao takvi referirani su kao flavonoidi iz hrane. Nutritivni flavonoidi odgovorni su za okus, boju i aromu hrane, prevenciju oksidacije masti i zaštitu vitamina i enzima.

Ono što se intenzivno istražuje je upravo njihov učinak na zdravlje konzumacijom flavonoida iz hrane. Opisani su pozitivni učinci na životinjsko i ljudsko zdravlje i trenutna su tema interesa kao opcija prevencije i terapije različitih bolesti.

Glavni mehanizam je visoki antioksidativni potencijal pokazan u *in vitro* i *in vivo* sustavima. Imaju sposobnost indukcije ljudskih protektivnih enzimskih sustavima te se predlažu kao zaštitni agensi u prevenciji virusnih i bakterijskih infekcija, degenerativnih i kardiovaskularnih bolesti i tumora.



Slika 1. Struktura flavonoida (preuzeto iz: Kumar i Pandey, 2013)

Biološka aktivnost flavonoida ovisi o kemijskoj strukturi. Osnovni prsten čini kostur od 15 ugljikovih atoma organiziranih kao 2-fenil-benzopiran ili flavanska struktura koja sadrži dva benzenska prstena A i B koja su povezana sa heterocikličnim prstenom piranom (Slika 1.). Supstituenti mogu biti vezani na različite položaja unutar aromatskih prstena i određuju vrstu flavonoida. Različite klase ovise o stupnju oksidacije i obrascu supstitucije, a individualne komponente unutar skupa o supstitucijama na A i B prstenu.

Generalno, dijelimo ih u grupe ovisno o ugljiku prstena C na kojem je prsten B vezan te prema stupnju nezasićenosti i oksidacije prstena C. Flavonoidi u kojima je prsten B povezan u položaju 3 prstena C nazivaju se izoflavoni. Oni u kojima je B prsten vezan na položaju 4 su neoflavoni, dok su oni u kojima je B prsten povezan na položaju 2 mogu se podijeliti u nekoliko podskupina ovisno o strukturnim značajkama C prstena. Ove grupe su flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli ili katehini, antocijanini i kalkoni. Flavonoli se razlikuju od flavonona na temelju hidroksilne skupine na položaju 3 i dvostrukoj C2-C3 vezi. Osim različite supstituiranosti, mogu biti različito hidroksilirani, konjugirani i polimerizirani. Često su hidroksilirani na položajima 3, 5, 7, 2, 3', 4' ili 5' i upravo je hidroksilacija važna u antioksidativnom potencijalu.

Prisutni su kao aglikoni, glikozidi i metilni derivati. Metilni i acetilni esteri alkoholne grupe također postoje u prirodi. Temeljnu strukturu čini aglikozid, a ukoliko formiraju glikozide, glikozidna veza je locirana na položaju 3 ili 7, a vezani ugljikohidrat može biti

L-ramnoza, D-glukoza, glukoramnoza, galaktoza ili arabinoza (Panche i sur., 2016; Kumar i Pandey, 2013).

Ono što je nužno za imati na umu i proučiti je mogućnost iskorištenja iz hrane, razinu apsorpcije, biotransformacije te u konačnici biodostupnosti koja ispoljava učinak. Apsorpcija flavonoida iz hrane koje dobivamo žvakanjem zbiva se u tankom i debelom crijevu ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima spojeva kao što su molekularna masa, topljivost, lipofilnost i pKa. Također, apsorpcija ovisi o obliku flavonoida, a većina onih biljnih vezano je za šećere. Aglikoni se lako apsorbiraju u tankom crijevu, dok se složeniji glikozidi moraju prevesti u jednostavne aglikone.

Kvercetin i ostali hidrofilni glikozidi transportiraju se putem tankog crijeva putem intestinalnog Na⁺-ovisnog glukoza kotransportera (SGLT1). Alternativni mehanizam uključuje hidrolizu laktat florizin hidrolazom (LPH), glukozidazom prisutnom na membrani stanica tankog crijeva koja oslobađa slobodni aglikon koji se potom absorbira, a afinitet prema supstratu ovisi o složenosti tj. ugljikohidratnoj komponenti flavonoida. Oni glikozidi koji nisu supstrati ovih enzima, transportiraju se dalje do debelog crijeva gdje pod utjecajem crijevne bakterijske mikroflore također dolazi do hidrolize i kidanja prstena do oslobođenih aglikona. Međutim, razina apsorpcije na razini debelog crijeva manje je značajna. Oligomerni flavonoidi mogu se biotransformirati u jednostavnije dimerne i monomerne oblike i pod utjecajem želučane kiseline, a dimerizacija smanjuje apsorpciju. Svi oni oblici koji se ne mogu metabolizirati i absorbirati, izlučuju se preko žuči (Kumar i Pandey, 2013).

Nakon apsorpcije, dolazi do biotransformacije u jetri glukuronidacijom, sulfatacijom i metilacijom ili pretvorbom u manje fenolne produkte. Zbog navedenih reakcija, slobodne aglikonske forme gotovo se ne mogu naći u plazmi ili urinu, osim katehina (Kumar i Pandey, 2013). Ovisno o izvoru biljnih flavonoida, vrsti hrane i samom obliku flavonoida, biodostupnost varira. Stoga je upravo kemijska struktura ta koja određuje njihov biološki potencijal i farmakološku aktivnost.

Ono što je zanimljivo je kemoprotektivno i antitumorsko djelovanje flavonoida. Kao prehrambeni čimbenik, konzumacija ovih prirodnih polifenolnih spojeva predlaže se kao jedan od mogućih načina prevencije tumora, ali i drugih bolesti. Njihova povećana konzumacija i viša koncentracija u serumu koreliraju sa smanjenjem rizika za nastanak nekoliko vrsta tumora. Konzumacija luka i jabuka, glavnih izvora kvercetina,

povezuje se sa sniženim rizikom za nastanak tumora i obrnuto korelira sa stupnjem incidencije raka pluća, želuca, prostate i dojke (Batra i Sharma, 2013).

Neki od predloženih mehanizama su: učinak na stanični ciklus, inhibicija stanične proliferacije i oksidativnog stresa, učinak na indukciju protektivnih enzima i apoptoze. Imaju učinak na stadij inicijacije i promocije karcinogeneze kao modulatori metabolizma. Pretvorba pro-karcinogena u karcinogen ključni je korak koji inhibiraju flavonoidi. Djeluju na dva načina različitim mehanizmima: interakcijom sa CYP450 enzimskim sustavom faze I koji su uključeni u metaboličku aktivaciju pro-karcinogena. Drugi mehanizam je detoksifikacija i uklanjanje karcinogena putem indukcije faze II enzima, kao što su UDP-glukuronil transferaza, kinon reduktaza i glutation S-transferaza (Batra i Sharma, 2013).

Najčešća genetska abnormalnost koja može dovesti do nastanka raka je mutacija p53, a inhibicija njegove ekspresije može dovesti do zaustavljanja stanica karcinoma u G2-M fazi staničnog ciklusa. Pronađeni su flavonoidi koji reguliraju ekspresiju mutiranog p53 proteina u humanim stanicama raka dojke. Nadalje, pokazuju učinak na inhibiciju tirozin kinazne aktivnosti i smanjenje signalnih puteva uključenih u stanični rast. Inhibitori tirozin kinazne aktivnosti su antitumorski agensi bez citotoksičnih nuspojava konvencionalne kemoterapije, a flavonoid s ovim učinkom je kvercetin. *In vitro* studije na 7 različitih staničnih linija pokazale su da kvercetin zaustavlja stanični ciklus i djeluje kao inhibitor rasta malignih stanica, stoga može biti zanimljiv antiproliferativan agens. (Kumar i Pandey, 2013)

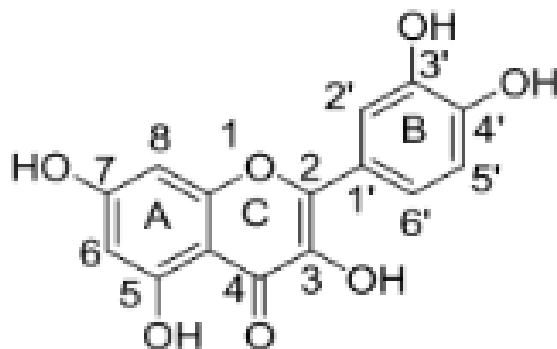
Na molekularnoj razini, flavonoidi se ističu kao inhibitori enzima i ligandi receptora uključenih u prijenos signala. Ključno obilježje flavonoida kao potencijalnog antitumorskog lijeka je upravo interakcija s proteinima zajedno sa antioksidativnim učinkom. Strukturno gledajući, fenolna jezgra je povoljna za stvaranje različitih vrsta nekovalentnih interakcija s proteinima. Redoks reakcije flavonoid-protein mogu biti rezultat oksidacije jednog ili dva elektrona flavonoida uslijed autooksidacije, posredstvom reaktivnih kisikovih spojeva ili enzimskom oksidacijom (Batra i Sharma; 2013). Povoljno antioksidativno djelovanje, kao kombinacija uklanjanja slobodnih radikala i interakcija sa enzimskim sustavima je jedna od velikih pozitivnih djelovanja na ljudsko zdravlje i prednost flavonoida kao terapeutika.

Upravo zbog mogućeg antitumorskog i kemoprotektivnog djelovanja, proučavali smo učinak kvercetina na MDA-MB-231 stanice humanog karcinoma dojke.

1.7.KVERCETIN

Kvercetin je ključan član porodice polifenola, a pripada flavonolima, razredu flavonoida. Uglavnom ga nalazimo u raznom povrću i voću poput crvenog luka, bobičastog voća, citrusa i jabuka. Karakterizira ga benzo- γ -pironska struktura koja se sastoji od 15 C-atoma ($C_{15}H_{10}O_7$) organiziranih u dva benzenska prstena povezana šesteročlanim heterocikličkim pironskim prstenom (Slika 2.). Kvercetin je 3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksi-flavonol što znači da u svojoj strukturi sadrži ukupno pet hidroksilnih (OH) skupina na pojedinim C-atomima, a njegova biokemijska i farmakološka aktivnost ovisi o supstituciji hidroksilnih skupina različitim funkcionalnim skupinama. Kvercetin može postojati u slobodnom obliku aglikona ili u obliku derivata konjugiran sa šećerima dajući glikozide, alkoholima i sulfatnom skupinom stvarajući etere i sulfate ili pak lipidima tvoreći prenilirani kvercetin.

Prema dosadašnjim studijama smatra se da se kvercetin unesen hranom apsorbira putem gastrointestinalnog trakta, biva transportiran limfnim sustavom nakon čega se metabolizira do odgovarajućih metabolita. Osim toga, smatra se da se metaboliti kvercetina distribuiraju i nakupljaju u različitim organima u niskim koncentracijama uslijed dugotrajnog uzimanja kvercetina (Khan i sur., 2016).



Slika 2. Struktura kvercetina. (Preuzeto iz: Khan i sur., 2016.)

Budući da oponaša strukturu endogenog estrogena (17β -estradiola), kvercetin se ponaša kao fitoestrogen, a poznat nam je i njegov protuupalni, antioksidativni i protutumorski učinak. Zbog smanjene osjetljivosti i stvaranja rezistencije tumorskih stanica na kemoterapeutike, pojavljuje se sve veća potreba za otkrivanjem prirodnih spojeva koji bi uništili tumorske stanice, a imali minimalan ili nikakav štetan učinak na normalne stanice. Upravo jednim od takvih spojeva smatra se i kvercetin (Ranganathan i sur., 2015).

1.8. UČINAK KVERCETINA NA STANICE KARCINOMA

Kvercetin je dobro poznat po svojim antitumorskim svojstvima. Važno je istaknuti utjecaj kvercetina na unos glukoze u stanicu te njeno iskorištenje. Glukoza u stanice sisavaca ulazi pomoću membranskog transportera iz porodice GLUT u koju ubrajamo 14 izoformi transportera identificiranih u čovjeka. GLUT transporteri mogu se podijeliti u tri razreda. Prvi razred čine 4 člana, GLUT1-GLUT4 čiji je primarni supstrat glukoza, dok su transporteri iz drugog (GLUT5) i trećeg razreda (GLUT6, 8, 10, HMIT) selektivniji za druge šećere. GLUT transporteri su prekomjerno eksprimirani u tumorskim stanicama u odnosu na normalne stanice, poglavito GLUT1 i GLUT3. GLUT1 odgovoran je za bazalni unos glukoze u stanice, a njegova pojačana ekspresija u stanicama tumora povezana je visokim indeksom proliferacije te slabijim preživljenjem. Imajući u vidu ulogu GLUT u tumorskim stanicama, inhibicija navedenih transportera čini se izvrsnim načinom za izgladnjivanje tumora i njegovo posljedično uništavanje. Međutim, vrlo je teško postići inhibiciju GLUT transportera isključivo u tumorskim stanicama, bez učinka na one u normalnim stanicama, zbog čega je do danas vrlo malo GLUT inhibitora razvijeno (Granchi i Minutolo, 2012).

Prirodni spojevi iz porodice flavonoida pokazuju inhibitorni učinak na glukozne transportere. Kvercetin i njegov glukozidni analog izokvercitrin dokazano inhibiraju GLUT2, izoformu transportera koja je najviše prisutna u crijevima pokazujući tako potencijalni antidijabetski učinak. Nadalje, smatra se kako kvercetin inhibira i GLUT1 te inhibira aktivaciju Akt i translokaciju GLUT4. Kao posljedica djelovanja kvercetina u *in vitro* kulturama tumorskih stanica javlja se nakupljanje glukoze u mediju te smanjeno stvaranje laktata (Granchi i Minutolo, 2012; Gao i Chen, 2015).

Osim inhibitornog učinka na GLUT, kvercetin pokazuje i primjetnu inhibitornu aktivnost prema monokarboksilatnom transporteru koji laktat nastao aerobnom glikolizom iz tumorskih stanica izbacuje pasivnim laktat-proton simportom. Izoforme MCT1-MCT4 najbolje su opisane, dok je MCT4 prekomjerno izražen u stanicama koje ovise o glikolitičkom metabolizmu glukoze. Inhibicija MCT1 i MCT4 kvercetinom dokazano uzrokuje značajno smanjenje invazivnosti tumora (Granchi i Minutolo, 2012).

Nadalje, dokazano je da kvercetin negativno utječe na proliferaciju stanica raznih vrsta karcinoma iskazujući citotoksični učinak ovisan o koncentraciji. Pokazano je kako kvercetin produljuje životni vijek životinje s tumorom čak do 5 puta u odnosu na životinju s tumorom koja nije tretirana (Srivastava i sur., 2016).

Smatra se kako kvercetin djeluje proapoptotički. Čini se kako dolazi do zastoja staničnog ciklusa u S fazi zbog mogućih oštećenja DNK koja su posljedica interkalacije kvercetina između lanaca DNK. Citotoksični efekt kvercetin postiže indukcijom apoptoze stanica, kako rane tako i kasne. Pokazano je kako je indukcija stanične smrti uzrokovana promjenama u potencijalu membrane mitohondrija, a ne povećanom proizvodnjom ROS. Zbog povećane koncentracije p53, otpuštanja citokroma c te povišenih aktivnosti kaspaze-3 i 9 može se zaključiti kako se radi o aktivaciji intrinzičkog signalnog puta apoptoze (Srivastava i sur., 2016).

Mnogobrojni mehanizmi, od kojih su odabrani prethodno opisani, kojima kvercetin negativno djeluje na stanice tumora čine kvercetin izvrsnim kandidatom za antitumorski agens.

2. CILJ RADA

U Hrvatskoj godišnje od karcinoma dojke obolijeva oko 2500 žena, od čega umire više od 900. Terapija karcinoma dojke provodi se ovisno o stadiju i vrsti bolesti. Veliki izazov predstavlja upravo „trostruko negativan“ karcinom dojke koji pokazuje tendenciju izrazito brzog rasta i proliferacije, odnosno visok stupanj agresivnosti i metastaziranja te vjerojatnost recidiva što rezultira naglim kliničkim tijekom bolesti i slabijom prognozom.

Postoji opravdani interes za istraživanjem i primjenom prirodnih bioflavonoida kao potencijalnih preventivnih i terapijskih agensa u liječenju raka. Kvercetin je jedan od djelotvornijih bioflavonoida poznat po antioksidativnom i antitumorskom potencijalu. Pored značajne antiupalne i antioksidativne aktivnosti te sprečavanja zgrušanja krvi, kvercetin usporava razvoj tumora i napredovanje različitih vrsta karcinoma kao što su leukemija, rak dojke, debelog crijeva, jednjaka, endometrija i dr. Antikancerogena svojstva kvercetina posljedica su kompleksnog učinka na stanične signalne puteve i njegove sposobnosti inhibicije enzima odgovornim za aktivaciju karcinogenih spojeva.

Tumorske stanice reprogramiraju svoj energetski metabolizam, pri čemu smanjuju efikasnost iskorištavanja energije. Troše velike količine glukoze, pri čemu povećavaju ekspresiju transportera GLUT1 za unos glukoze u stanicu. Uzevši u obzir fundamentalnu ulogu GLUT transportera za preživljavanje tumorskih stanica, inhibicija GLUT1 mogla bi biti atraktivna meta za antitumorski napad blokadom unosa nutrijenata blokirajući stupanj glikolize i promovirajući staničnu smrt „izgladnjivanjem“ stanica. Kvercetin inhibira transporter GLUT1 te modulira energetski metabolizam tumorskih stanica. Također, moguće antitumorsko djelovanje posljedica je i učinka kvercetina kao potencijalnog induktora apoptoze.

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak kvercetina na stanice karcinoma dojke uz različite bioenergetske uvjete. U ovom radu pratili smo učinak kvercetina uz različite koncentracije glukoze na vijabilnost stanica, morfološke promjene i na apoptozu MDA-MB-231

3. MATERIJALI I METODE

3.1. KORIŠTENJE KEMIJE

Odmrzavanje, presađivanje i tretiranje stanica:

- DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich)
- Fetal bovine serum (FBS), (Gibco)
- Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma-Aldrich)
- L- glutamat (Sigma-Aldrich)
- PBS (engl. *phosphate buffered saline*), otopina fosfatnog pufera: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,4mM KH₂PO₄, 4.3mM Na₂HPO₄ x 7H₂O; sterilno filtrirano
- 0,05% tripsin - EDTA (Gibco)
- kvercetin (Sigma-Aldrich)

Procjena preživljavanja stanica metodom MTT:

- Matična otopina reagensa MTT (Sigma-Aldrich); sterilno filtrirano
- Dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma-Aldrich)

Karakterizacija morfoloških promjena stanica bojanjem stanica hematoksilin – eozinom:

- Hematoksilin (MERCK)
- Eozin (Biognost)
- H₂O, destilirana H₂O
- 70% otopina etanola (Kemika)
- 96% otopina etanola (Kemika)
- 100% etanol (Kemika)
- Kanadski balzam (Kemika)

TUNEL metoda (ili detekcija apozoze):

Za detekciju apoptotskih stanica korišten je test komplet „*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*“ (Roche, kataloški broj 11 684 795 910).

Sadržaj kompleta:

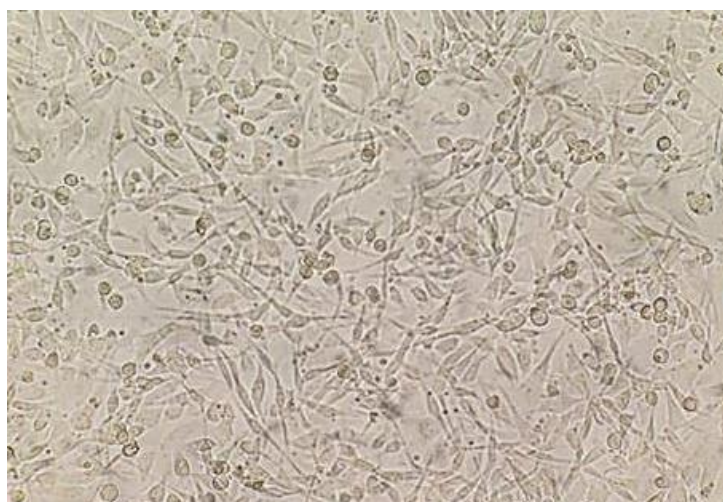
- otopina enzima: terminalna deoksinukleotidil transferaza (EC 2.7.7.31.), rekombinantna iz E.Coli, u puferu, 10x koncentrirana
- otopina fluoresceinom obilježenih proba; smjesa nukleotida u puferu, 1x koncentrirano

Potrebna dodatna oprema:

- PBS (engl. *phosphate buffered saline*), otopina fosfatnog pufera: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,4mM KH₂PO₄, 4.3mM Na₂HPO₄ x 7H₂O; otopina za ispiranje
- 4% p-formaldehid u PBS-u, pH 7,4; otopina za fiksaciju
- 0.1% Triton X-100 u 0.1% Na-citrata; otopina za permeabilizaciju (Roche)

3.2. MDA-MB-231 STANIČNA LINIJA

MDA-MB-231 stanična je linija humanog karcinoma dojke. Stanice su epitelnog podrijetla i predstavljaju model proučavanja hormon neovisnog raka dojke. To je agresivan, invazivan i slabo diferenciran trostruko-negativan rak dojke. Karakteristika rasta i uzgoja je adherentnost, stanice rastu u jednom sloju, pričvršćene za podlogu. Uzgajaju se u DMEM tekućem mediju u koji se dodaje 10% FBS (engl. *fetal bovine serum*) na temperaturi od 37°C. Ukoliko se pohranjuju, zamrzavaju se u 5 ili 10 % otopini DMSO-a (dimetilsulfoksida) (www.phe-culturecollections.org.uk).



Slika 3. Stanična linija MDA-MB-231 karcinoma dojke slikana inverznim mikroskopom Leitz Wetzler, Germany pri povećanju od 200x; nativno.

Postupak kultiviranja:

Ampula koja sadrži staničnu liniju MDA-MB-231 izvadi se iz spremnika s tekućim dušikom u kojem je pohranjena na -196°C . Nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, stanice se u sterilnim uvjetima pipetom prenesu u epruvetu od 15 mL te se doda 10 mL potpunog hranjivog medija.

Medij sadrži DMEM, antibiotik, antimikotik, FBS, faktore rasta i glutamat. Stanična se suspenzija centrifugira 5 minuta na 500g, a potom se hranjivi medij uklanja vakuum pumpom. Talog se resuspendira u 9 mL hranjivog medija te se stanična suspenzija podjeli na 3 jednaka dijela i prenese u bočice za uzgoj stanica u koje dodano po 3mL potpunog hranjivog medija kako bi ukupan volumen bio 6 mL. Suspenzije stanica promatraju se pod inverznim mikroskopom Leitz Wetzler, Germany te se pohranjuju u inkubator pri 37°C pri 5% CO_2 . Tijekom rasta stanica potrebno je promijeniti hranjivi medij tako da se stari hranjivi medij ukloni vakuum pumpom i pipetom doda 6mL svježeg (novog) hranjivog medija. Morfologija i konfluentnost stanične kulture prati se promatranjem pod inverznim mikroskopom.

Nakon postignute odgovarajuće konfluentnosti, hranjivi medij se uklanja te se stanice ispiru jednokratno sa 3 mL PBS-a koji se nakon toga ukloni. Potom se dodaje se 1 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Bočica sa stanicama stavlja se u inkubator na 3 minute nakon čega se mehanički protrese. Stanična se suspenzija razrjeđuje dodatkom 11 mL hranjivog medija kako bi se postigao ukupan volumen od 12 mL i spriječilo daljnje štetno djelovanje tripsina (budući da medij sadrži inhibitore tripsina). Stanična suspenzija se resuspendira te se polovica volumena suspenzije odvoji (presađuje) u novu bočicu za uzgoj stanica. Potrebno je izdvojiti reprezentativan uzorak stanične suspenzije za brojanje stanica pomoću hemocitometra. Kapljica stanične suspenzije prenosi se automatskom pipetom tako da se vrh pipete postavi uz rub pokrovnice i tekućina kapilarnim efektom ulazi ispod stakalca.

Iz poznate veličine kvadratića i količine pripremljene suspenzije izračuna se broj stanica u suspenziji.

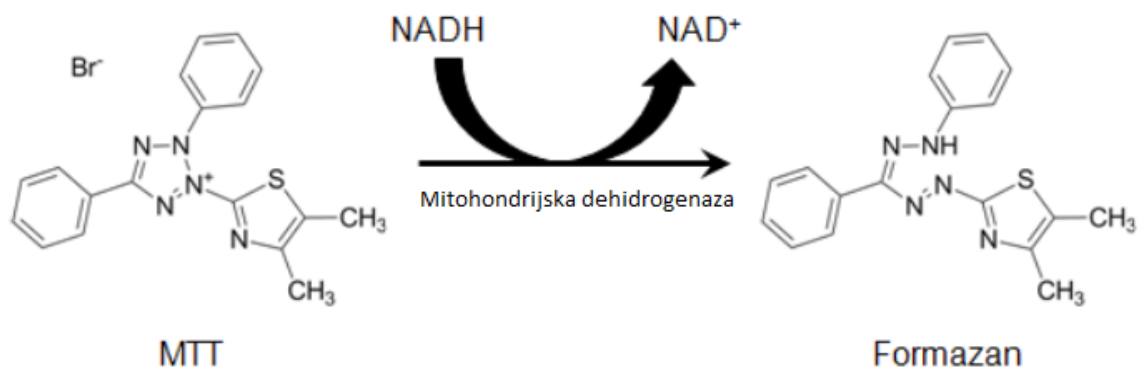
Postupak kultivacije i tretiranja stanica u različitim reakcijskim uvjetima:

Suspenzija stanica razrijeđena je odgovarajućim volumenom kompletnog medija na način da 200 µL suspenzije koja se pipetira u svaku od 96 jažica (bunarića) mikrotitarske pločice sadrži 10,000 stanica, dok 2 mL suspenzije koja se dodaje u svaku od 6 jažica pločice sadrži 100,000 stanica. Nakon toga, slijedi inkubacija na 37°C uz 95% vlažnosti i 5% CO₂ tijekom 24 sata.

Hranjivi mediji s odgovarajućim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) pripreme se tako da se pomiješaju odgovarajući volumeni medija s 0, 25 i 12,5 mM glukoze. Matična otopina kvercetina priredi se otapanjem odvage kvercetina u krutom stanju u odgovarajućem volumenu etanola. Stanice MDA-MB-231 paralelno se kultiviraju uz različite koncentracije glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) te uz različite koncentracije glukoze i uz 100 µM kvercetina tijekom 24, odnosno 48 sati. Zatim se procjenjuje vijabilnost stanica MTT testom.

3.3. PROCJENA CITOTOKSIČNIH UČINAKA MTT TESTOM

Preživljenje stanica, odnosno učinak toksičnih ili potencijalno terapijskih supstanci na stanice može se utvrditi na više načina, a jedan od njih je MTT test. To je standardni kolorimetrijski test koji se koristi za mjerenje aktivnosti mikrosomnih enzima dehidrogenaza. Dehidrogenaza reducira žuti, MTT (3-(4,5-dietilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) u ljubičasti formazan. MTT reduciraju samo žive stanice pa ovim testom mjerimo redukcijski potencijal stanica tj. metaboličku aktivnost stanica. Kako je MTT topiv u vodi, a formazan nije, pojavljuje se u obliku ljubičastih kristala unutar stanica. Stanična membrana živih stanica nepropusna je za kristale formazana pa tek nakon otapanja kristala u DMSO formazan prodire u medij i boji ga. Apsorbancija nastalog obojenja mjera je metaboličke aktivnosti, odnosno vijabilnosti stanica.



Slika 4: Prikaz reakcije (Preuzeto iz: Riss i sur., 2016).

Matična otopina MTT priprema se otapanjem odgovarajuće količine krutog MTT u sterilnom PBS da se dobije koncentracija 5 mg/mL. Pripremljenu otopinu potrebno je sterilno profiltrirati kroz 0.2 µm filter, zaštititi od svjetla i pospremiti na +4°C. Zatim se priređuje 5% otopina MTT reagensa u DMEM-u miješanjem odgovarajućih volumena reagensa i hranjivog medija. Tretiranim se stanicama nakon 24satne i 48satne inkubacije uklanja medij, dodaje se 200 µL pripremljenog MTT reagensa te stanice inkubiraju 2h i 30 min na 37°C uz 95% vlažnosti i 5% CO₂. Nakon inkubacije reagens se uklanja te se dodaje 200 µL sterilnog DMSO. Pločica za uzgoj stanica inkubira se 30 minuta na tresilici kako bi se kristali formazana u potpunosti otopili. Nakon toga, vrši se spektrofotometrijsko mjerenje pri 595 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Victor 3, Perkin Elmer). Preživljavanje tretiranih stanica izračuna se kao postotak u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

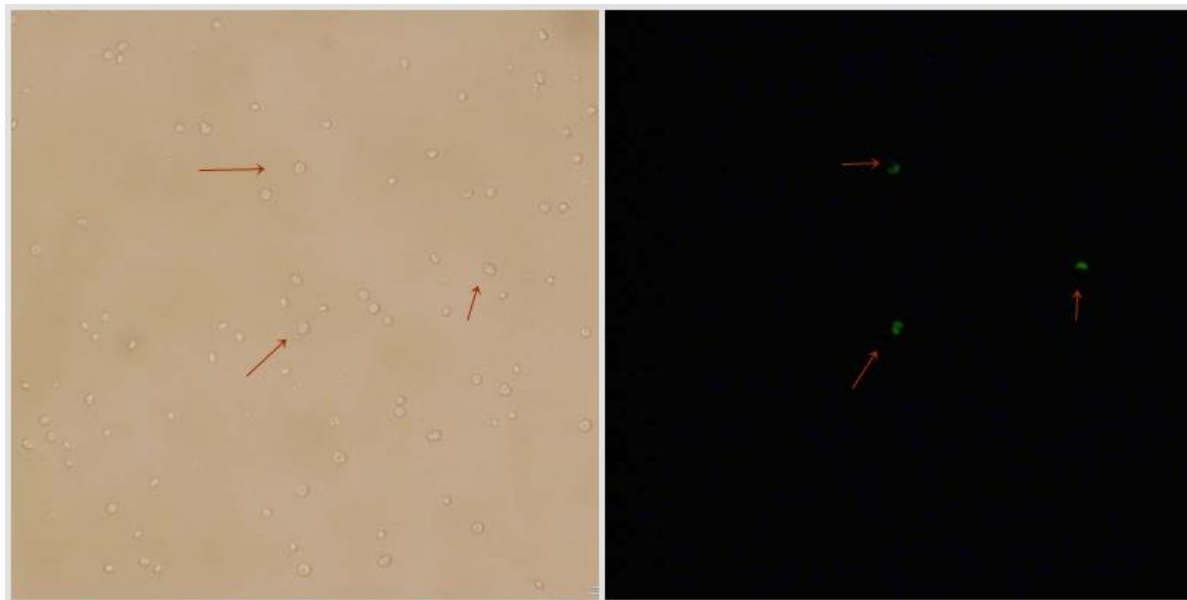
3.4. DETEKCIJA APOPTOZE TUNEL METODOM

TUNEL metoda (engl. *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) je metoda detekcije i kvantifikacije apoptoze, programirane stanične smrti, na staničnoj razini u tkivnim preparatima ili staničnim suspenzijama. Temelji se na detekciji obilježenih DNA lomova te analizi fluorescencijskom mikroskopijom ili protočnom citometrijom. To je brza, precizna, jednostavna ne-radioaktivna metoda detekcije apoptoze u stanicama ili tkivima. Omogućuje kvantifikaciju apoptoze u

uzorcima, diferencijaciju apoptoze od nekroze ili detekciju DNA lomova koji nastaju indukcijom citostatskih agensa, radijacije ili nekog drugog egzogenog čimbenika. Lomovi genomske DNA tijekom apoptoze mogu rezultirati dvolančanim, nisko-molekularnim DNA fragmentima, mono ili oligo-nukleosomima, kao i jednolančanim lomovima u visoko-molekularnoj genomskoj DNA. Takvi DNA lomovi mogu biti identificirani označavanjem slobodnog 3'-OH terminalnog kraja modificiranim nukleotidima u enzimskoj reakciji.

U prvoj fazi zbiva se obilježavanje DNA lomova. Reakciju dodavanja obilježenih proba katalizira enzim terminalna deoksinukleotidil transferaza (TdT) koja vrši polimerizaciju obilježenih nukleotida na slobodni terminalni 3'-OH kraj DNA lanca. Vezivanje dUTP obilježenog fluoresceinom označava prekid u lancu DNA.

U drugoj fazi, stanične jezgre s ugrađenim fluorescentnim obilježivačem u molekuli DNA se detektiraju i kvantificiraju pomoću fluorescentnog mikroskopa ili protočne citometrije.



Slika 6: *Detekcija apoptoze TUNEL metodom uz fluorescentnu mikroskopiju; primjer pozitivne reakcije apoptotičkog procesa na preparatima leukocita bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti; Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta.*

Na prethodno pripremljene pločice od 6 jažica za uzgoj stanica nasade se stanice stanične linije MDA-MB-231 i inkubiraju na 37°C uz 95% vlažnosti i 5% CO₂ tijekom 24 sata. Potom se stanice kultiviraju uz različite koncentracije glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) te uz različite koncentracije glukoze i uz 100 μM kvercetina tijekom 48h. Nakon uklanjanja medija, preparati se suše na zraku 60 minuta, nakon čega slijedi fiksacija dodatkom 4% otopine p-formaldehida u PBS-u. Nakon ispiranja sa PBS-om, preparati se inkubiraju s Triton X otopinom za permeabilizaciju 2 minute na +4°C. Slijedi dvokratno ispiranje PBS-om i sušenje. Nadalje, dodaje se 50 μL TUNEL reakcijske smjese na uzorke koja sadrži enzim terminalnu deoksinukleotidil transferazu (TdT) i fluorescein obilježene probe. Slijedi inkubacija u mraku 60 minuta na 37°C. Slijedi trokratno ispiranje sa PBS-om te promatranje preparata pod fluorescentnim mikroskopom.

3.5. PRIKAZ I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati ispitivanja koja karakteriziraju morfološke promjene prikazani su reprezentativnim nalazom (mikrografijom).

Brojčani rezultati su statistički obrađeni i izraženi kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama.

Testiranje značajnosti promjena u ispitivanim pokusnim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu provedeno je Studentovim t-testom na razini značajnosti od $p < 0,05$.

4. REZULTATI

Procjena vijabilnosti stanica MTT testom

MDA-MB-231 stanice karcinoma dojke kultivirane su u potpunom mediju te su nasađene na mikrotitarske pločice s 96 jažica pločica i inkubirane na 37°C uz 95 % vlažnosti i 5 % CO₂ tijekom 24 sata do postizanja približno 70 % konfluentnosti. Zatim su paralelno kultivirane uz različite koncentracije glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50mM) te uz različite koncentracije glukoze i uz 100μM kvercetina tijekom 24, odnosno 48 sati.

U tablicama prikazani su rezultati utjecaja različitih koncentracija glukoze nakon 24 sati (Tablica 1.) i 48 sati (Tablica 3.) te različite koncentracije glukoze uz dodatak kvercetina tijekom 24 sati (Tablica 2.) i 48 sati (Tablica 4.) na MDA-MB-231 stanice. Prikazani su dobiveni rezultati MTT testom tj. vrijednosti apsorbancije kao mjere vijabilnosti odnosno metaboličke aktivnosti stanica.

Rezultate smo i grafički prikazali kao odnos tretiranih stanica različitim koncentracijama glukoze nakon 24 i 48 sati (Slika 9.) te odnos tretiranih stanica različitim koncentracijama glukoze uz dodatak kvercetina nakon 24 i 48 sati (Slika 10.) Prikazali smo učinak kvercetina na MDA-MB-231 kao odnos netretiranih stanica kvercetinom u različitim koncentracijama glukoze i tretiranih stanica u različitim koncentracijama glukoze uz dodatak kvercetina pojedinačno za 24 (Slika 7.) i 48 sati (Slika 8.).

Morfološka karakterizacija nakon bojanja hematoksilinom i eozinom

Koristili smo 2 ploče za uzgoj stanica sa 6 jažica za pripremu preparata adherentnih stanica koje su rasle na sterilnim pokrovnim stakalcima te obojane hematoksilinom i eozinom i analizirane svjetlosnom mikroskopijom s ciljem morfološke karakterizacije stanica. Napravljene su mikrografije stanične linije MDA-MB-231 kultivirane u mediju različitih koncentracija glukoze (Slika 11. i Slika 13.) i različitih koncentracija glukoze uz dodatak kvercetina. (Slika 12. i Slika 14.).

Detekcija apoptoze TUNEL metodom

Koristili smo 2 ploče za uzgoj stanica sa 6 jažica za pripremu preparata adherentnih stanica koje su rasle na sterilnim pokrovnim stakalcima za TUNEL metodu (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche). Preparati su analizirani pomoću svjetlosne i fluorescentne mikroskopije s ciljem detekcije apoptotičkih stanica. Napravljene su slike stanične linije MDA-MB-231 kultivirane u mediju različitih koncentracija glukoze i različitih koncentracija glukoze uz dodatak kvercetina na povećanju od 400x.(Slika 15.)

Naši rezultati ukazuju na sljedeće:

Različite koncentracije glukoze, kao i kvercetin u različitim koncentracijama glukoze, odnosno bioenergetskim uvjetima pokazuju utjecaj na vijabilnost MDA-MB-231 stanica. Postoji statistički značajna razlika između uzoraka tretiranih s različitim koncentracijama glukoze te stanica koje su bile izložene kvercetinu uz različite koncentracije glukoze.

Dodatakom 100 mM kvercetina smanjila se vijabilnost stanica pri svim koncentracijama glukoze. Najjači učinak kvercetina uočava se u bioenergetskim uvjetima koji odgovaraju koncentraciji glukoze od 5 mM nakon 24 sata gdje je preživljenje stanica smanjeno za 30 %.

Smanjenje vijabilnosti stanica dodatno se pojačava s duljinom izloženosti stanica, odnosno dolazi do pada metaboličke aktivnosti nakon 48 h u odnosu na 24 h pri svim koncentracijama glukoze bez i sa dodatkom kvercetina.

Dodatno, učinak kvercetina pri svim koncentracijama glukoze pojačao se nakon 48 h u odnosu na 24 h. Najintenzivniji učinak kvercetina uočava se u bioenergetskim uvjetima koji odgovaraju koncentraciji glukoze od 0 mM nakon 48 sata gdje je preživljenje stanica smanjeno za 47 %. Dakle, u svim uzorcima nakon provođenja MTT testa, može se pretpostaviti citotoksičan učinak kvercetina.

Preparati obojeni hematoksilinom i eozinom pokazuju promjene broja i morfoloških karakteristika MDA-MB-231 stanica sa i bez kvercetina u različitim koncentracijama glukoze.

TUNEL metodom nakon analize preparata fluorescentnom mikroskopijom nije zabilježena pozitivna reakcija na apoptozu niti u jednom preparatu MDA-MB-231 stanica.

4.1. PROCJENA CITOTOKSIČNIH UČINAKA MTT TESTOM

Tablica 1. Prikaz rezultata MTT testa: izmjerene apsorbancije na 595nm nakon 24h izlaganja stanica MDA-MB-231 različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM).

	G 0	G 1	G 5	G 10	G 25	G 50
1	1,228	1,391	1,344	1,301	1,387	1,228
2	1,250	1,465	1,541	1,330	1,356	1,250
3	1,358	1,530	1,560	1,349	1,337	1,358
4	1,433	1,655	1,608	1,394	1,533	1,433
5	1,449	1,716	1,661	1,520	1,328	1,449
6	1,491	1,752	1,685	1,538	1,415	1,491
7	1,473	1,747	1,646	1,538	1,497	1,473
8	1,474	1,664	1,655	1,450	1,450	1,474
9	1,201	1,376	1,358	1,256	1,231	1,201
10	1,270	1,451	1,396	1,353	1,392	1,270
11	1,280	1,435	1,415	1,256	1,231	1,280
12	1,335	1,619	1,538	1,271	1,286	1,335
13	1,417	1,698	1,540	1,340	1,307	1,417
14	1,238	1,684	1,598	1,433	1,408	1,238
15	1,336	1,706	1,607	1,435	1,306	1,336
16	1,395	1,703	1,495	1,440	1,405	1,395
Srednja vrijednost	1,299*	1,352	1,599	1,540*	1,388*	1,367*
± σ	± 0,092	± 0,098	± 0,134	± 0,111	± 0,096	± 0,086

Legenda: (*) statistički značajno odstupanje u odnosu na skupinu G 5, na razini značajnosti $p < 0.05$.

Skupina: **G 0** - stanice su kultivirane bez glukoze u hranjivom mediju;

G 1 - stanice su kultivirane s 1 mmol/L glukoze u hranjivom mediju;

G 5 - stanice su kultivirane s 5 mmol/L glukoze u hranjivom mediju;

G 10 - stanice su kultivirane s 10 mmol/L glukoze u hranjivom mediju;

G 25 - stanice su kultivirane s 25 mmol/L glukoze u hranjivom mediju;

G 50 - stanice su kultivirane s 50 mmol/L glukoze u hranjivom mediju.

Tablica 2. Prikaz rezultata MTT testa: izmjerene apsorbancije na 595nm nakon 24h izlaganja stanica MDA-MB-231 različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50mM) i 100 μ M kvercetina (Q).

	G 0 + Q	G 1 + Q	G 5 + Q	G 10 + Q	G 25 + Q	G 50 + Q
1	0,882	1,351	1,243	0,955	0,998	1,024
2	1,171	1,274	1,156	0,712	0,960	1,117
3	1,006	1,195	1,139	0,881	0,981	1,065
4	1,132	1,212	1,106	1,055	1,275	1,195
5	1,107	1,221	1,166	1,144	1,118	1,295
6	1,085	1,234	1,055	1,030	1,239	1,085
7	0,996	1,210	1,170	1,094	1,146	1,242
8	1,109	1,167	1,068	0,981	1,035	1,122
9	0,999	1,300	1,021	0,981	0,990	0,885
10	1,120	1,353	1,150	0,906	1,140	1,050
11	1,185	1,318	1,009	1,163	1,092	1,015
12	1,253	1,237	1,252	1,342	0,989	1,104
13	1,223	1,270	1,292	0,951	1,141	1,169
14	1,286	0,992	1,190	1,112	1,264	1,226
15	1,178	1,148	0,916	1,131	1,055	1,186
16	1,142	1,142	1,074	1,033	0,933	1,061
Srednja vrijednost	1,117	1,226	1,125*	1,029*	1,085*	1,115
$\pm \sigma$	$\pm 0,106$	$\pm 0,090$	$\pm 0,099$	$\pm 0,143$	$\pm 0,110$	$\pm 0,102$

Legenda: (*) statistički značajno odstupanje u odnosu na skupinu G 1, na razini značajnosti $p < 0.05$.

Skupina: **G 0+Q**- stanice su kultivirane bez glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

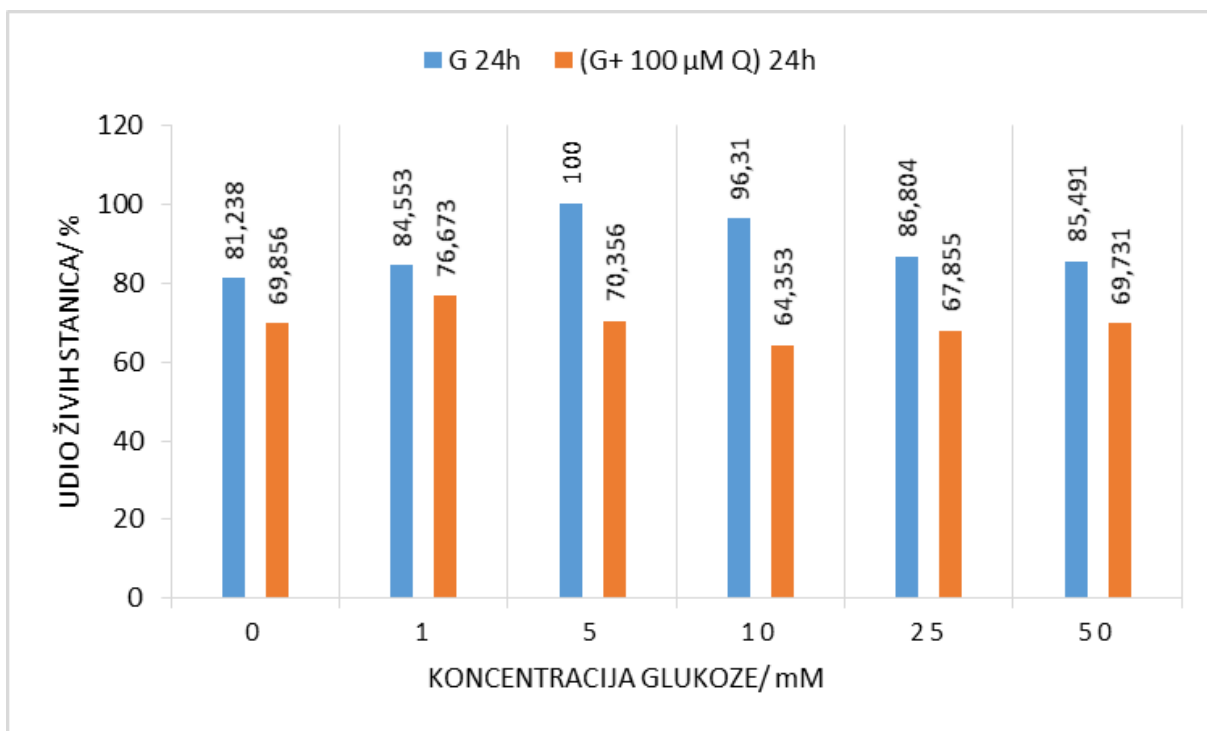
G 1+Q- stanice su kultivirane s 1 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

G 5+Q- stanice su kultivirane s 5 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

G 10+Q- stanice su kultivirane s 10 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

G 25+Q- stanice su kultivirane s 25 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

G 50+Q- stanice su kultivirane s 50 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina.



Slika 7. Prikaz rezultata MTT testa: Vijabilnost na temelju izmjerenih apsorbancija na 595 nm nakon 24h izlaganja stanica MDA-MB-231 različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) te različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) i 100 μM kvercetina (Q).

Tablica 3. Prikaz rezultata MTT testa: izmjerene apsorbancije na 595nm nakon 48h izlaganja stanica MDA-MB-231 različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM).

	G 0	G 1	G 5	G 10	G 25	G 50
1	0,403	0,863	0,957	0,998	0,815	0,838
2	0,351	0,808	1,087	1,014	1,039	0,958
3	0,329	0,672	1,079	1,066	1,014	0,917
4	0,368	0,673	1,085	1,055	1,083	0,955
5	0,334	0,757	1,030	0,949	1,051	1,029
6	0,357	0,727	1,068	0,945	0,885	1,018
7	0,418	0,795	0,964	0,891	0,865	1,017
8	0,484	0,905	1,056	0,719	0,969	0,865
9	0,451	0,718	0,930	0,948	0,910	0,824
10	0,410	0,679	1,047	1,138	0,935	0,873
11	0,413	0,704	0,987	1,055	0,972	0,837
12	0,378	0,771	1,030	1,031	1,025	0,813
13	0,426	0,749	0,957	1,035	1,043	0,763
14	0,647	0,647	0,977	1,028	1,015	0,873
15	0,675	0,742	1,017	0,882	0,900	0,626
16	0,699	0,729	0,901	0,831	0,851	0,791
Srednja vrijednost	0,446*	0,746*	1,011	0,974	0,961	0,875*
± σ	± 0,120	± 0,070	± 0,059	± 0,104	± 0,082	± 0,107

Legenda: (*) statistički značajno odstupanje u odnosu na skupinu G 5, na razini značajnosti $p < 0.05$.

Skupina: **G 0** - stanice su kultivirane bez glukoze u hranjivom mediju;

G 1 - stanice su kultivirane s 1 mmol/L glukoze u hranjivom mediju;

G 5 - stanice su kultivirane s 5 mmol/L glukoze u hranjivom mediju;

G 10 - stanice su kultivirane s 10 mmol/L glukoze u hranjivom mediju;

G 25 - stanice su kultivirane s 25 mmol/L glukoze u hranjivom mediju;

G 50 - stanice su kultivirane s 50 mmol/L glukoze u hranjivom mediju.

Tablica 4. Prikaz rezultata MTT testa: izmjerene apsorbancije na 595nm nakon 48h izlaganja stanica MDA-MB-231 različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) i 100 μ M kvercetina (Q).

	G 0 + Q	G 1 + Q	G 5 + Q	G 10 + Q	G 25 + Q	G 50 + Q
1	0,052	0,538	0,773	0,709	0,688	0,641
2	0,141	0,514	0,677	0,759	0,692	0,590
3	0,204	0,501	0,778	0,764	0,897	0,794
4	0,205	0,578	0,898	0,721	0,738	0,641
5	0,165	0,526	0,870	0,866	0,819	0,734
6	0,213	0,493	0,869	0,872	0,759	0,682
7	0,269	0,571	0,841	0,846	0,739	0,717
8	0,379	0,582	0,624	0,732	0,782	0,735
9	0,221	0,329	0,797	0,701	0,689	0,531
10	0,296	0,466	0,721	0,764	0,817	0,514
11	0,264	0,537	0,766	0,754	0,836	0,610
12	0,310	0,618	0,813	0,747	0,849	0,714
13	0,274	0,625	0,834	0,795	0,830	0,600
14	0,219	0,639	0,902	0,750	0,804	0,614
15	0,298	0,572	0,744	0,678	0,776	0,758
16	0,265	0,538	0,797	0,782	0,619	0,371
Srednja vrijednost	0,236*	0,539*	0,794	0,765	0,771	0,640*
$\pm \sigma$	$\pm 0,077$	$\pm 0,074$	$\pm 0,077$	$\pm 0,057$	$\pm 0,073$	$\pm 0,108$

Legenda: (*) statistički značajno odstupanje u odnosu na skupinu G 5, na razini značajnosti $p < 0.05$.

Skupina: **G 0+Q** - stanice su kultivirane bez glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

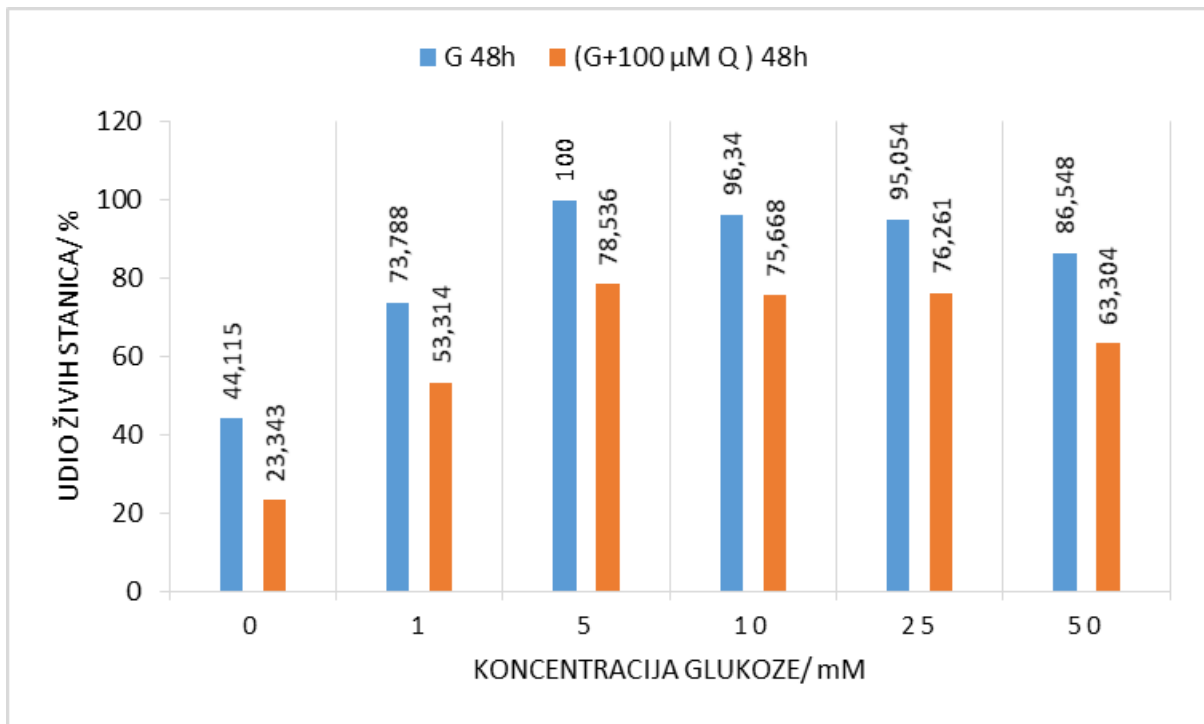
G 1+Q - stanice su kultivirane s 1 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

G 5+Q - stanice su kultivirane s 5 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

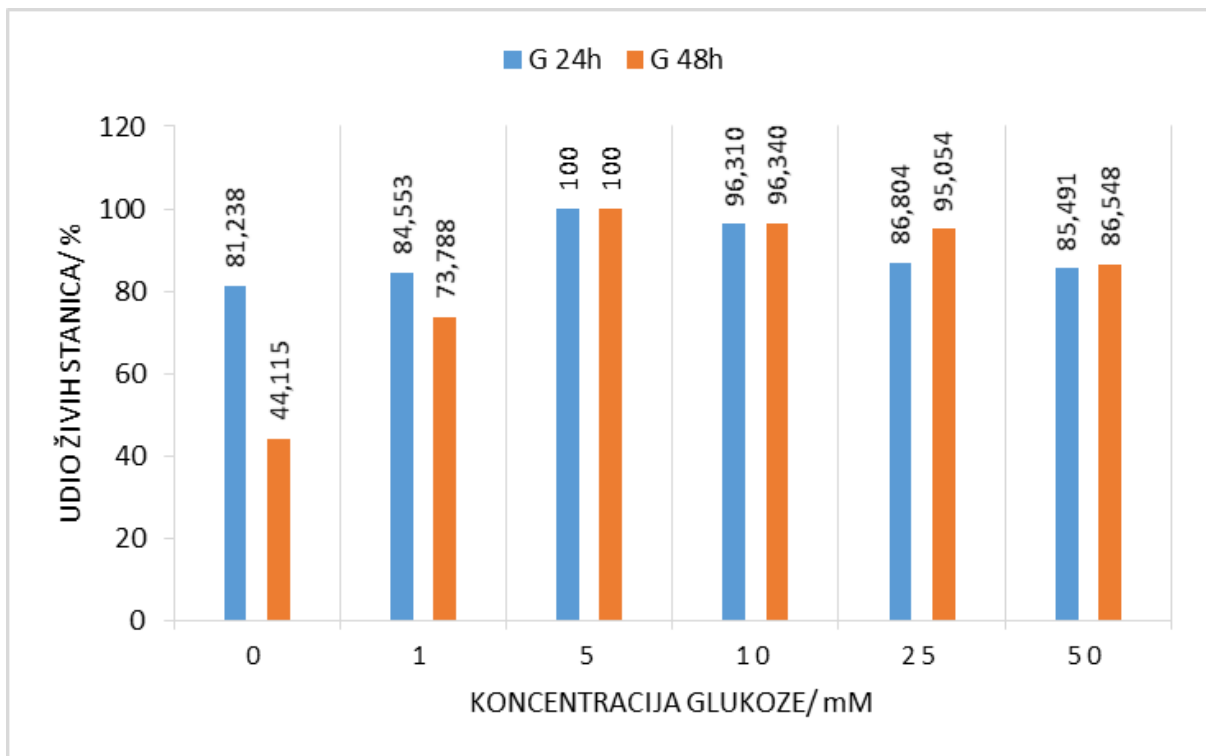
G 10+Q - stanice su kultivirane s 10 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

G 25+Q - stanice su kultivirane s 25 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina;

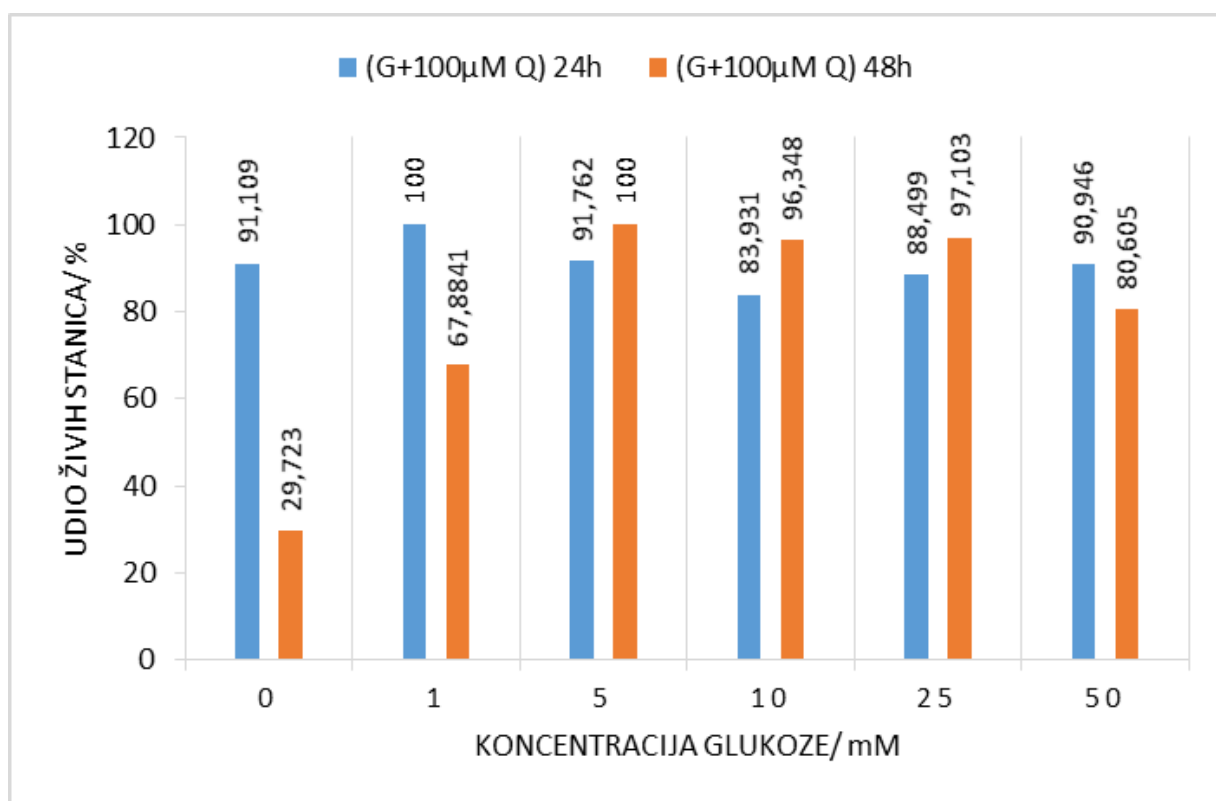
G 50 + Q - stanice su kultivirane s 50 mmol/L glukoze u hranjivom mediju uz 100 μ mol/L kvercetina.



Slika 8. Prikaz rezultata MTT testa: Vijabilnost na temelju izmjerenih apsorbancija na 595nm nakon 48h izlaganja stanica MDA-MB-231 različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) i te različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) i 100 μM kvercetina (Q).

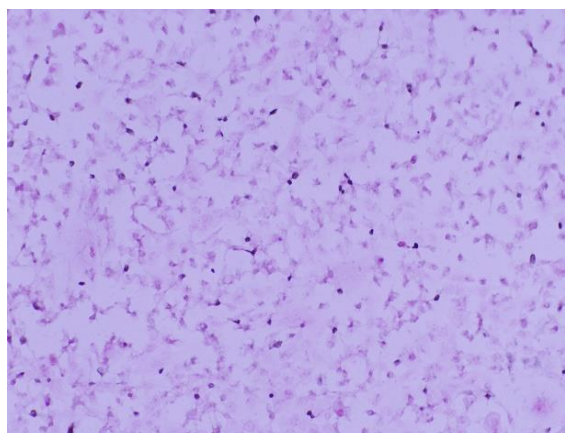


Slika 9. Prikaz rezultata MTT testa: Vijabilnost na temelju izmjerenih apsorbancija na 595nm nakon 24h u odnosu na 48 h izlaganja stanica MDA-MB-231 različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM).

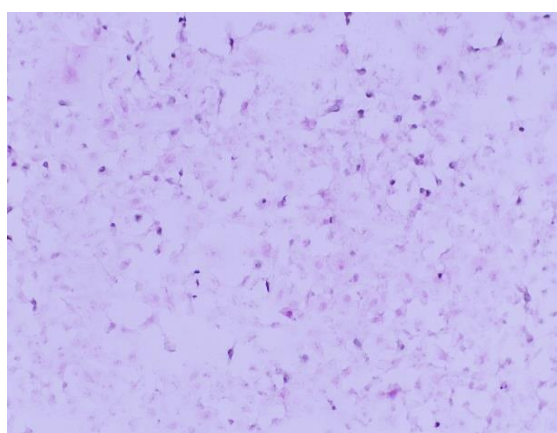


Slika 10. Prikaz rezultata MTT testa: Vijabilnost na temelju izmjerenih apsorbancija na 595nm nakon 24h u odnosu na 48 h izlaganja stanica MDA-MB-231 različitim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50mM) i 100μM kvercetina (Q).

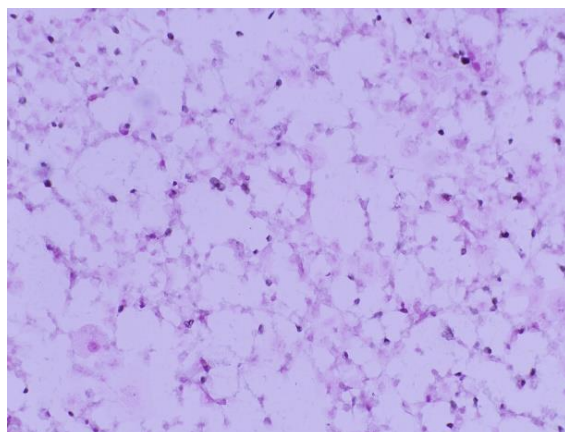
4.2. KARAKTERIZACIJA MORFOLOŠKIH PROMJENA STANICA BOJANJEM HEMATOKSILINOM I EOZINOM



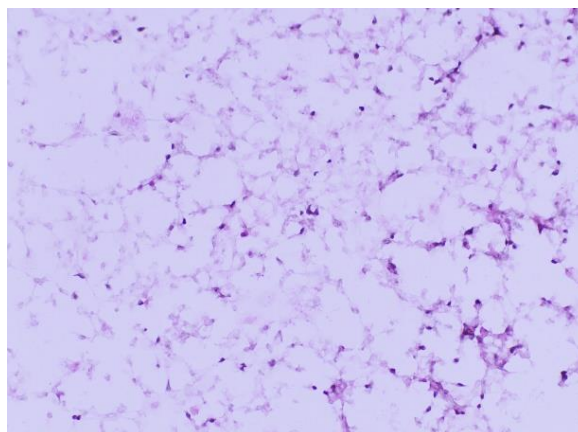
a)



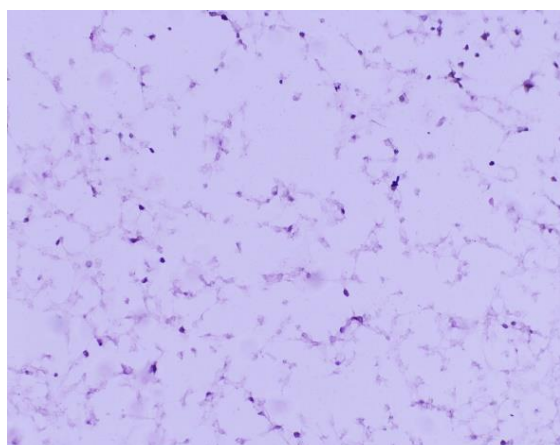
b)



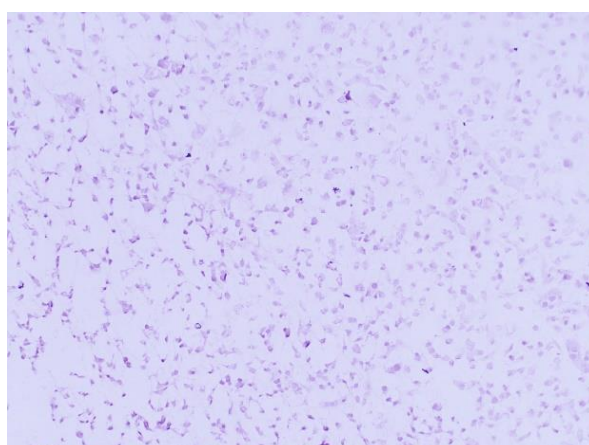
c)



d)

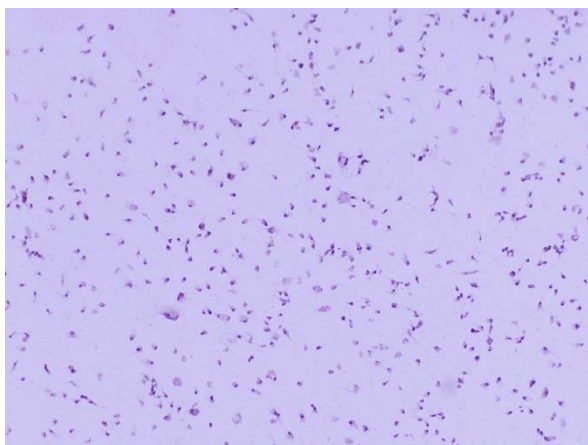


e)

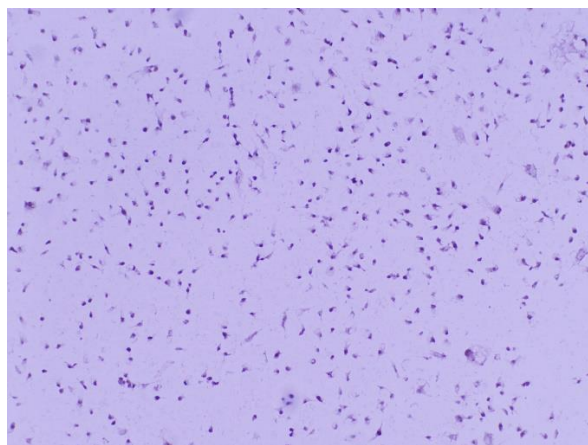


f)

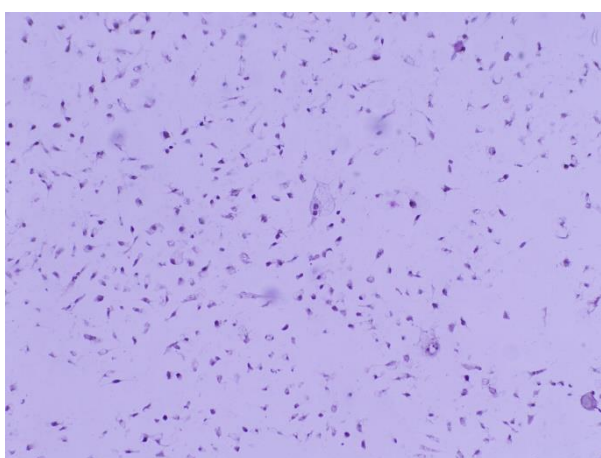
Slika 11. Mikrografija MDA-MB-231 stanične linije nakon bojanja preparata hematoksilinom i eozinom i analize svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 100x. Reprezentativne slike prikazuju MDA-MB-231 stanice kultivirane u mediju različite koncentracije glukoze: a) 0 mM glukoze; b) 1 mM glukoze; c) 5 mM glukoze d) 10 mM glukoze e) 25 mM glukoze f) 50 mM glukoze.



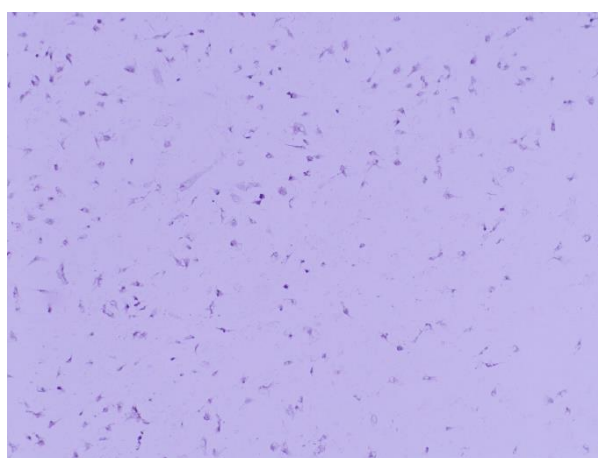
a)



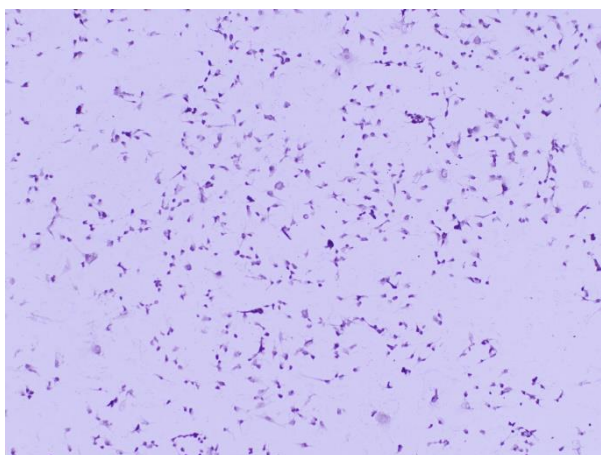
b)



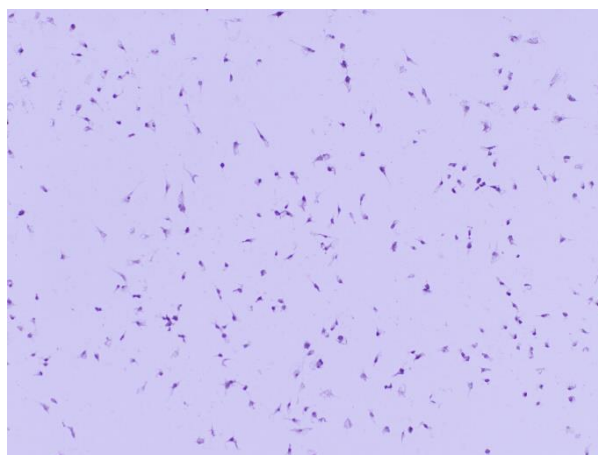
c)



d)

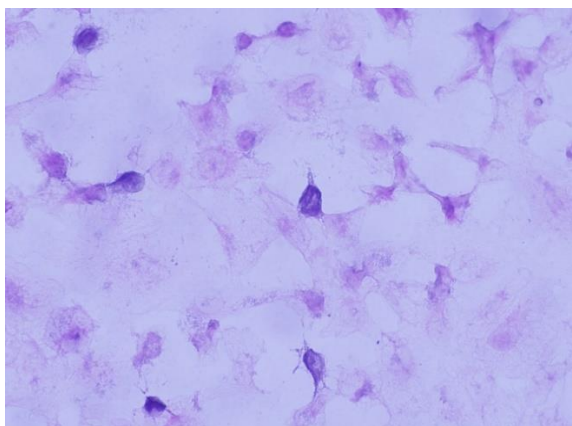


e)

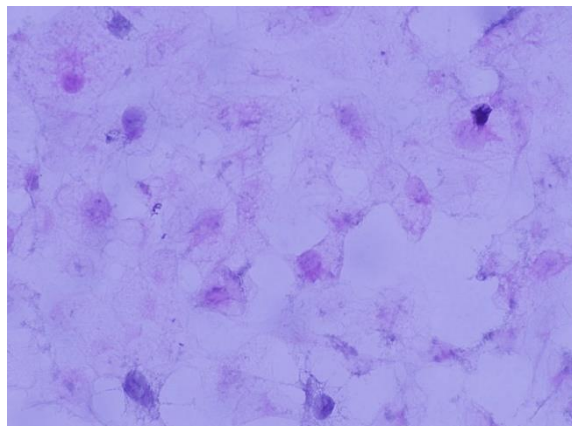


f)

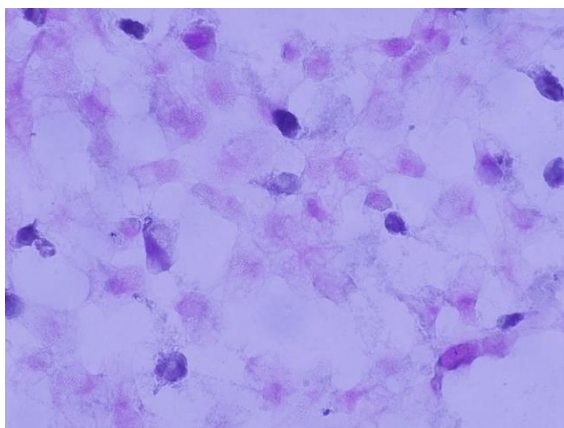
Slika 12. Mikrografija MDA-MB-231 stanične linije nakon bojanja preparata hematoksilinom i eozinom pri povećanju od 100x. Reprezentativne slike prikazuju MDA-MB-231 stanice kultivirane u mediju različite koncentracije glukoze uz dodatak 100 μ M kvercetina: a) 0 mM glukoze; b) 1 mM glukoze c) 5 mM glukoze d) 10 mM glukoze e) 25 mM glukoze f) 50 mM glukoze.



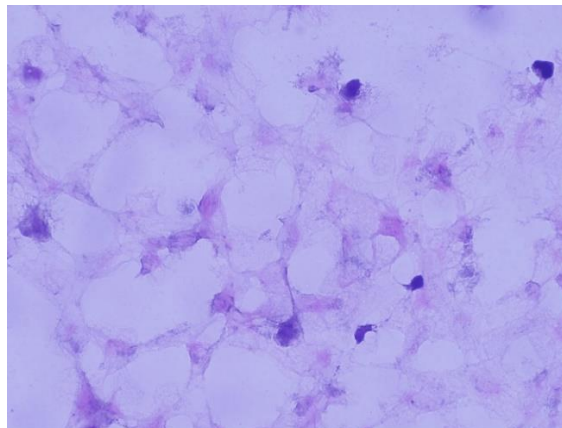
a)



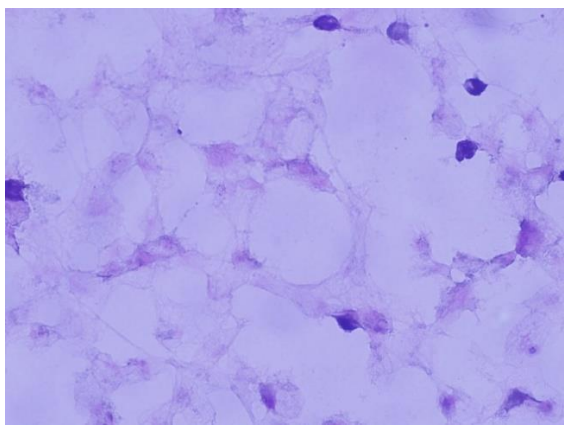
b)



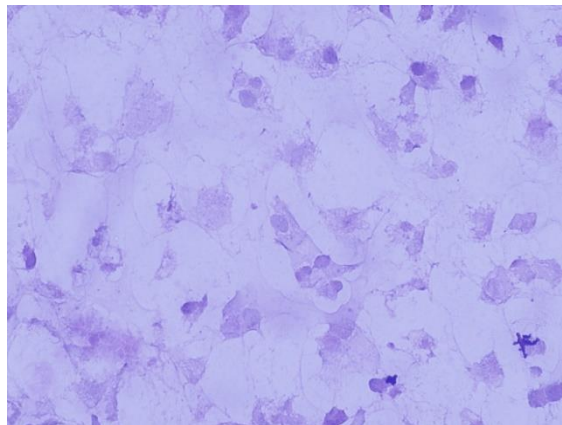
c)



d)

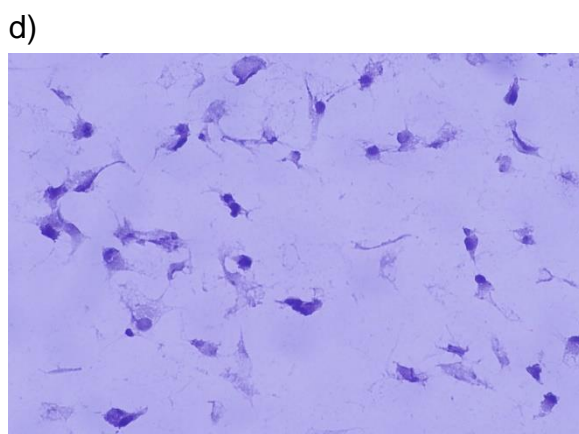
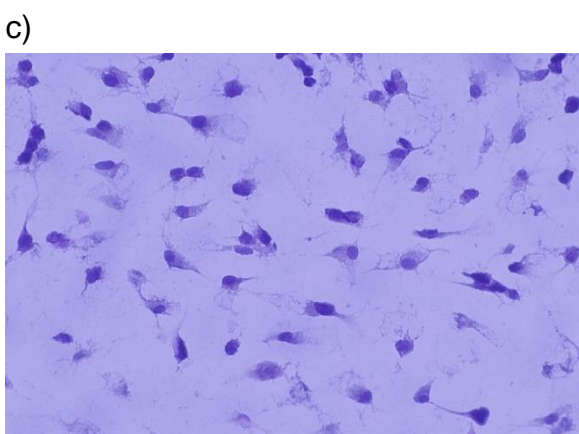
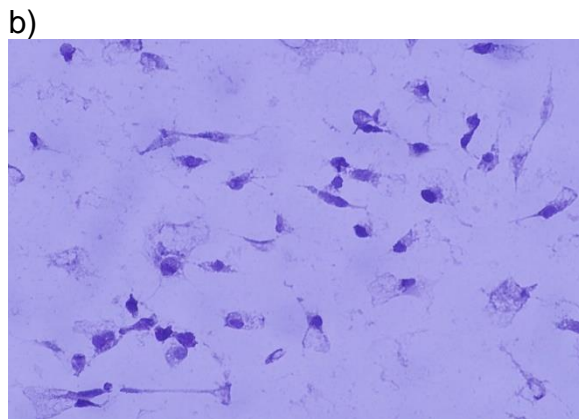
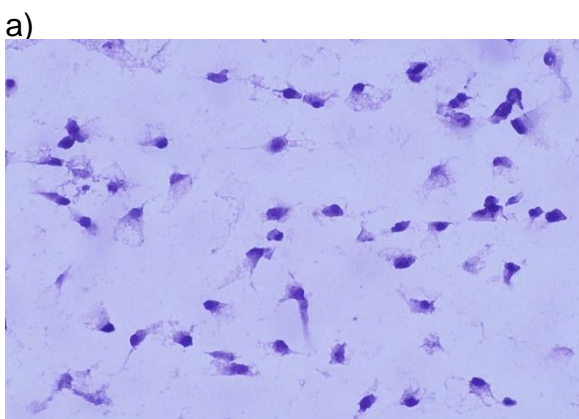
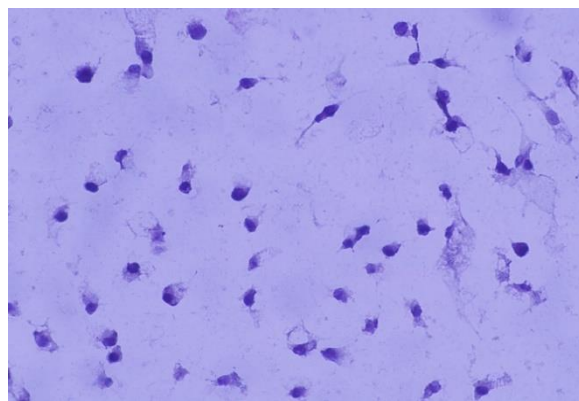
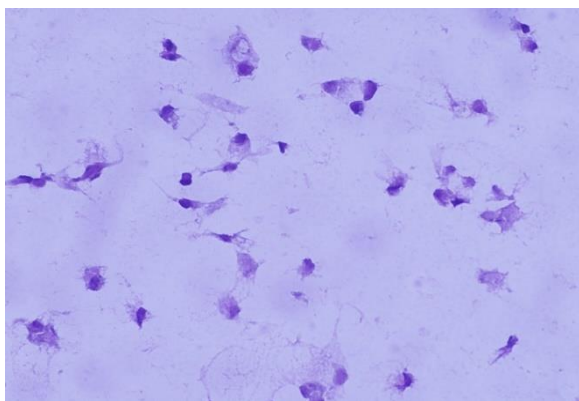


e)



f)

Slika 13. Mikrografija MDA-MB-231 stanične linije nakon bojanja preparata hematoksilinom i eozinom i analize svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 400x. Reprezentativne slike prikazuju MDA-MB-231 stanice kultivirane u mediju različite koncentracije glukoze: a) 0 mM glukoze; b) 1 mM glukoze; c) 5 mM glukoze d) 10 mM glukoze e) 25 mM glukoze f) 50 mM glukoze.

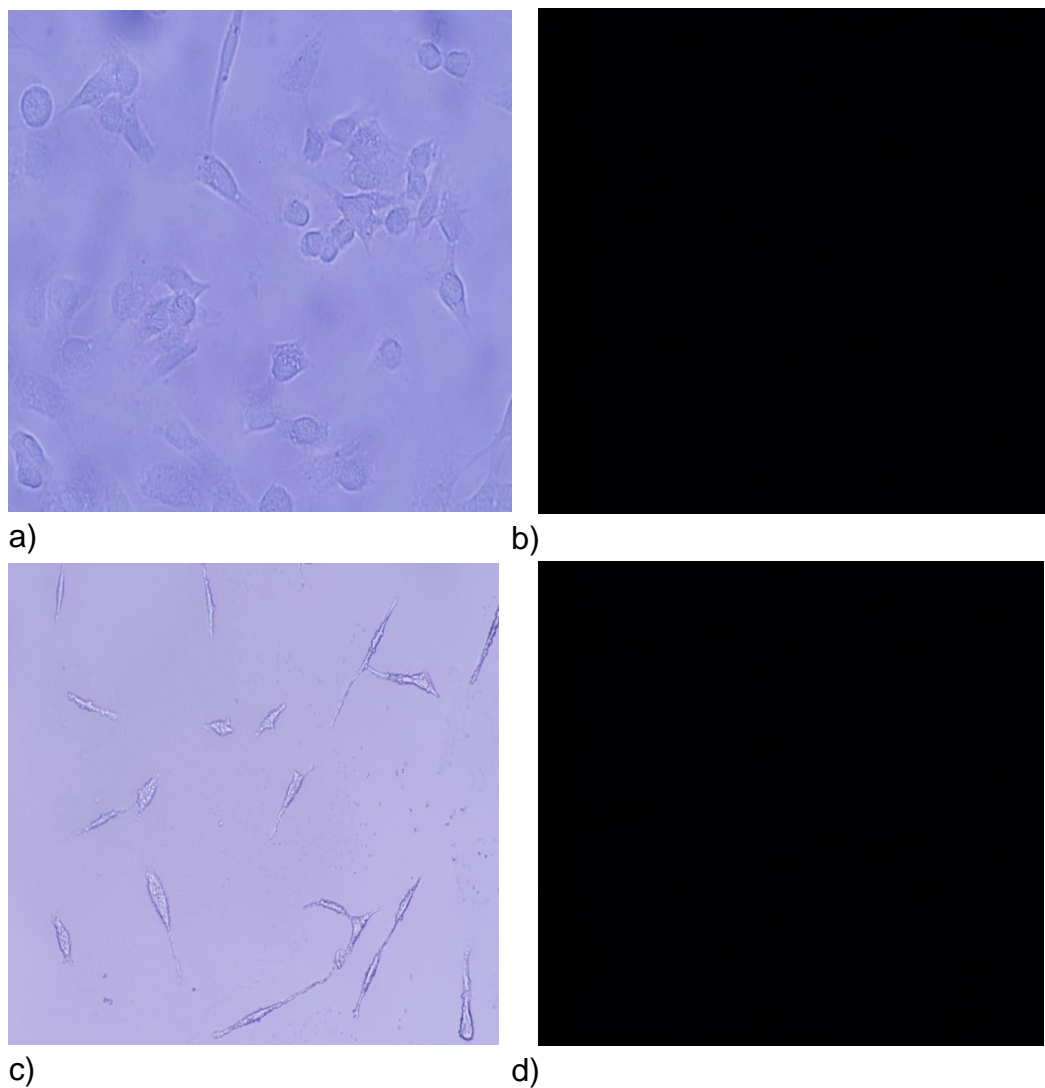


e)

f)

Slika 14. Mikrografija MDA-MB-231 stanične linije nakon bojanja preparata hematoksilinom i eozinom i analize svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 400x. Reprezentativne slike prikazuju MDA-MB-231 stanice kultivirane u mediju različite koncentracije glukoze uz dodatak 100 μ M kvercetina: a) 0 mM glukoze; b) 1 mM glukoze; c) 5 mM glukoze; d) 10 mM glukoze; e) 25 mM glukoze; f) 50 mM glukoze.

4.3. DETEKCIJA APOPTOZE TUNEL METODOM



Slika 15. Detekcija apoptoze TUNEL metodom: Reprezentativne mikrografije prikazuju preparate adherentnih MDA-MB-231 pri povećanju 400 x kultivirane u mediju a) koncentracije glukoze od 5 mM, nativni preparat; b) koncentracije glukoze od 5 mM; stanice pod fluorescencijom; c) koncentracije glukoze od 50 mM uz dodatak 100 μM kvercetina, nativni preparat; d) koncentracije glukoze od 50 mM uz dodatak 100 μM kvercetina, stanice pod fluorescencijom. U preparatima nisu nađene apoptotičke stanice.

5. RASPRAVA

Karcinom dojke najčešća je maligna bolest žena današnjice i jedan od vodećih uzroka smrtnosti zapadnog svijeta. Iako se svakim danom otkrivaju i karakteriziraju novi kemijski spojevi potencijalno antitumorskog djelovanja, heterogenost i kompleksnost karcinoma dojke predstavlja veliki izazov u liječenju. Terapija karcinoma ovisi o stadiju bolesti i vrsti samog tumora i definirana je na temelju lokalizacije i histomolekularnih obilježja stanica. Najčešće obuhvaća kirurški zahvat u kombinaciji sa radioterapijom i/ili kemoterapijom, hormonskom terapijom ili specifičnim metama, kao što su primjerice monoklonska protutjela. Unatoč znatnom napretku u uspješnosti liječenja, velik postotak smrtnosti i neadekvatan odgovor na terapiju i dalje su prisutni. Razvoj različitih nuspojava koje su rezultat nespecifičnosti djelovanja i mogućnosti ciljanja tumorskih, u odnosu na zdrave stanice također su česte. Nezadovoljavajući ishodi liječenja i visoka agresivnost trostruko-negativnog karcinoma daju dodatni poticaj i motivaciju za istraživanje ovog hormon neovisnog karcinoma dojke. Stoga smo ovo istraživanje provodili na MDA-MB-231 staničnoj liniji karcinoma dojke.

Za *in vitro* studije karcinoma dojke najčešće su korištene stanične linije kao što su MCF-7, T-47D i MDA-MB-231. MDA-MB-231 pokazuju viši stupanj agresivnosti i tendenciju metastaziranja u odnosu na ostale stanične linije (<http://breast-cancer-research.com>). Stanične linije predstavljaju ekperimentalni model za istraživanje karcinoma. One nisu savršene i ne predstavljaju repliku *in vivo* situacije u čitavom organizmu. Zbog svoje jednostavnosti i prihvatljivih sličnosti, ipak se koriste u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi. U ovom istraživanju ispitan je utjecaj bioflavonoida kvercetina na MDA-MB-231 staničnu liniju karcinoma dojke.

Općenito, od velike je važnosti prevencija karcinoma dojke. Zbog svojih pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi, kao vrlo bitni kandidati preventivnih i antitumorskih spojeva predlažu se flavonoidi. Brojne studije koje upućuju na njihove antioksidativne, antiupalne, antitumorske, antiproliferativne i kemoprotektivne mehanizme djelovanja (Batra i Sharma, 2011). Flavonoidi su prirodni polifenolni spojevi sveprisutni u hrani i piću. Nalazimo ih u voću, povrću, čaju, sjemenkama, vinu. Prema tome, osim što su prirodni, bioflavonoidi su lako dostupni. Osim navedenih učinaka, njihova prednost je netoksičnost za ljudski organizam sa širokim spektrom biološke i farmakološke

aktivnosti. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja svih mehanizama djelovanja, kao i svih karakteristika apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije koja utječu na biodostupnost flavonoida. Kao jedan od najpotentnijih flavonoida ističe se kvercetin. Prepoznat je zbog svog protuupalnog i antioksidativnog potencijala i mogućnosti protektivnog djelovanja na organizam uslijed zaštite od slobodnih radikala, odnosno reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva. Osim toga, poznato je njegovo, kemoprotektivno, antitumorsko, antiproliferativno djelovanje ispitano na brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama.

Energetski metabolizam tumora usmjeren je prema ubrzanoj proliferaciji stanica te prema izbjegavanju apoptoze. Središnju ulogu u takvom usmjeravanju energetskog metabolizma ima Warburgova aerobna glikoliza, pri čemu stanice za dobivanje energije više koriste glikolizu u odnosu na oksidativnu fosforilaciju.

MDA-MB-231 stanice su kultivirane u kompletnom mediju a potom nasađene u jažice mikrotitarskih pločica. Nakon što su stanice postigle odgovarajuću konfluentnost, paralelno su kultivirane uz različite koncentracije glukoze (0,1, 5, 10, 25 i 50mM) te uz različite koncentracije glukoze i uz 100µM kvercetina tijekom 24, odnosno 48 sati.

U prvom djelu eksperimenta fokusirali smo se na metabolički aspekt tumorskih stanica putem ispitivanja citotoksičnih učinaka kvercetina na MDA-MB-231 stanice karcinoma dojke koje smo kultivirali u mediju uz različite koncentracije glukoze. Upravo ovakvim *in vitro* istraživanjima, moguće je definirati bioenergetske uvjete i količinu glukoze kojima će stanice biti izložene i pratiti kako takve promjene na njih utječu.

Tumorske stanice moduliraju svoj energetski metabolizam. One troše velike količine glukoze, a glavni metabolički put je glikoliza. Pratili smo vijabilnost nakon kultivacije stanica nakon 24-satne i 48-satne izloženosti. Provođen je MTT test koji se temelji na činjenici da samo žive stanice mogu reducirati MTT reagens u obojeni formazan čiji se nastanak prati spektrofotometrijski. Praćena je absorbancija na 595 nm kao mjera metaboličke aktivnosti stanica. Primijećeno je kako i u mediju bez glukoze, stanice uspješno preživljavaju tijekom 24 i 48 sati. Pretpostavka je da koriste preostale zalihe energije ili druge metaboličke puteve i izvore energije. Prvenstveno, pokazalo se da ne postoje jednoznačni rezultati utjecaja glukoze na vijabilnost MDA-MB-231 u smislu kontinuiranog rasta. Porastom koncentracije glukoze povećava se i metabolička aktivnost do 5 mM, odnosno najveća vijabilnost stanica upravo je bila uz te

bioenergetske uvjete. Jednaki rezultati dobiveni su MTT testom nakon kultiviranja tijekom 24 i 48 h.

Jedna mogućnost antitumorskog djelovanja je inhibicija glikolize, odnosno unosa glukoze u stanicu blokadom GLUT1 transportera. Stanice tumora pojačano eksprimiraju GLUT1 transporter, a kvercetin ga inhibira. Na taj način modulira energetske metabolizam tumorskih stanica. Također, inhibira MCT transporter kojim se izbacuje laktat nastao aerobnom glikolizom iz tumorskih stanica. Nakupljanje laktata unutar maligne stanice smanjuje širenje i invazivnost tumora. Ovim indirektnim mehanizmom ispoljava se još jedan antitumorski potencijal kvercetina.

Dodatkom 100 μ M kvercetina u sve uzorke, od 0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM glukoze, uočava se smanjenje vijabilnosti stanica. Rezultati učinka na vijabilnost pri različitim koncentracijama glukoze variraju. Apsorbancija korelira sa metaboličkom aktivnosti, i ukazuje na djelovanje kvercetina. Djelovanje kvercetina tijekom 24 h uzrokuje smanjenje vijabilnosti MDA-MB-231 stanica od 9-30% prema odgovarajućoj kulturi stanica. Najizraženiji učinak kvercetina nakon 24 h primjećuje se u bioenergetskim uvjetima koncentracije glukoze od 5 mM, a najslabiji u koncentraciji glukoze od 1 mM. Nadalje, učinak kvercetina je više izražen nakon 48 sati. Promjena u odnosu netretiranih stanica kvercetinom u ovom slučaju je pad metaboličke aktivnosti za 20-47%. Najizraženiji učinak kvercetina nakon 48 sati primjećuje se u bioenergetskim uvjetima koncentracije glukoze od 0 mM, a najslabiji u koncentraciji glukoze 25 mM.

S obzirom na rezultate, pokazalo se da kvercetin zaista ima učinak na vijabilnost MDA-MB-231 pri svim koncentracijama glukoze. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima te potvrđuju antitumorski potencijal i sugeriraju antikarcinogeno, odnosno antiproliferativno djelovanje na stanice karcinoma dojke. Postavlja se pitanje sveukupnog mehanizma djelovanja kvercetina kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uvjetima. Inhibicija GLUT1 i MCT transportera smanjuje stupanj glikolize „izgladnjivanjem“ stanica. Međutim potrebna su dodatna istraživanja, primjerice specifično određivanje aktivnosti i lokalizacije pojedinih enzima glikolize, poput gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze koji pokazuje vrlo složeno djelovanje pored vrlo dobro poznatog u samoj glikolizi. Određivanje ekspresije specifičnih izoenzima u tumorskim stanicama te određivanje koncentracije pojedinih razgradnih produkata metabolizma zasigurno će pridonijeti boljem razumijevanju bioenergetskih procesa u karcinogenezi.

U ovom radu za morfološku karakterizaciju MDA-MB-231 stanica koristili smo bojanje s hematoksilinom i eozinom. Stanice su bile kultivirane paralelno uz različite koncentracije glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) te uz različite koncentracije glukoze i uz 100 μ M kvercetina. Preparati su promatrani svjetlosnim mikroskopom na povećanjima 100x, 200x i 400 x te su izrađene mikrografije. Promatrala se konfluentnost stanica te morfološka obilježja stanica, citoplazme i jezgre (400x). MDA-MB-231 stanice ne pokazuju promijenjenu morfologiju pri koncentracijama glukoze od 0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM stanice. Stanice su izdužene poput fibroblasta, citoplazma je roskaste boje, jezgre su pravilna oblika, bazofilne sa rahlim kromatinom. a vidljive su i jezgrice. Uočava se nekoliko manjih, plavih okruglih stanica sa zgusnutom jezgrom i kondenziranim kromatinom. U preparatima sa kvercetinom pri svim koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) može se primijetiti smanjenje broja stanica u odnosu na preparate bez kvercetina. Općenito su stanice manje s oskudnijom citoplazmom. Preparati se više plavo oboje što može ukazati na promjene u sadržaju citoplazme. Pojedine stanice imaju manje jezgre sa kondenziranim kromatinom što podsjeća na morfološke promjene koje se javljaju tijekom apoptotičkog procesa.

U trećem djelu rada, stanice MDA-MB-231 paralelno su kultivirane uz različite koncentracije glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM) te uz različite koncentracije glukoze i uz 100 μ M kvercetina. Ispitali smo mogući proapoptotički učinak kvercetina, te proveli smo detekciju apoptoze TUNEL metodom. Preparati su izrađeni prema protokolu za adherentne stanice „In Situ Cell Death Detection Kit“. TUNEL metoda detektira apoptozu na staničnoj razini tj. prisutnost jednolančanih i dvolančanih internukleosomalnih DNA lomova korištenjem fluorescein obilježih dUTP-a koje enzim terminalna deoksinukleotidil transferaza (TdT) dodaje na slobodni 3'-OH kraj. Međutim, tijekom analize fluorescentnom mikroskopijom, nisu nađene stanice u apoptozi. Kod svih bioenergetskih uvjeta, u svim koncentracijama glukoze (0,1, 5, 10, 25 i 50 mM), kao i u istim koncentracijama glukoze uz dodatak 100 μ M kvercetina nije detektirana apoptoza. Odsutnost reakcije ne isključuje prisutnost programirane stanične smrti, kao što ne isključuje proapoptotički učinak kvercetina. Studije na staničnim linijama karcinoma dojke, kao što su MCF-7 i MDA-MB-231 pokazale su kako kvercetin ima proapoptotički učinak, odnosno inhibira proliferaciju stanica karcinoma dojke.

Djeluje kao induktor apoptoze tumorskih stanica regulacijom Bcl-2 i bax proteina. (Duo i sur., 2011). Stoga, potrebna su daljnja istraživanja mehanizama apoptoze na MDA-MB-231 staničnoj liniji u različitim bioenergetskim uvjetima.

Unatoč velikim naporima znanstvenika usmjerenih u proučavanje i razumijevanje etiologije i patogeneze malignih bolesti s ciljem otkrivanja učinkovite i netoksične adjuvantne terapije, prevencija i liječenje karcinoma i dalje ostaje veliki izazov današnjice. Heterogenost stanica karcinoma dojke te kompleksne interakcije genske osnove i interindividualnost mutacija u kombinaciji sa različitim okolišnim čimbenicima predstavljaju još jednu prepreku koju treba savladati pri razumijevanju karcinoma dojke. Procesi karcinogeneze i uključenost signalnih puteva su složeni i još uvijek nedovoljno objašnjeni. Naglasak treba staviti i na prevenciju karcinoma dojke. Upravo bioflavonoidi, kao i kvercetin sa svojim antioksidativnim i antiupalnim učinkom ima pozitivno djelovanje na zdravlje. Ali treba imati u vidu i moguće nepoželjne učinke, zbog mogućih interakcija s antineoplasticima zbog ometanja biorasploživosti i metaboliziranja lijekova. Međutim, možda će se upravo kvercetin ili neki drugi flavonoidi pokazati korisnim kemoprotektivnim i antitumorskim agensima.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitan je utjecaj kvercetina na vijabilnost MDA-MB-231 stanica karcinoma dojke u različitim koncentracijama glukoze (0,1, 5, 10, 25 i 50 mM), odnosno definiranim bioenergetskim uvjetima. Na temelju rezultata vijabilnosti tretiranih stanica dobivenih MTT testom, bojanja stanica hematoksilinom i eozinom u svrhu morfološke karakterizacije i detekcije apoptoze TUNEL metodom može se zaključiti sljedeće:

- Kvercetin uzrokuje smanjenje vijabilnosti MDA-MB-231 stanica nakon 24 -satne izloženosti.
- Kvercetin uzrokuje pad vijabilnosti MDA-MB-231 stanica nakon 48 -satne izloženosti.
- Učinak kvercetina ovisi o duljini vremena izloženosti MDA-MB-231 stanica.
- Kvercetin pokazuje značajniji učinak nakon duljeg vremena izloženosti, odnosno veće smanjenje vijabilnosti nakon 48 -satne u odnosu na 24 -satnu izloženost.
- Najveći pad vijabilnosti uslijed djelovanja kvercetina bio je pri koncentraciji glukoze od 5 mM nakon 24-satne izloženosti i pri koncentraciji glukoze od 0 mM nakon 48- satne izloženosti.
- Kvercetin uzrokuje promjenu broja i morfoloških karakteristika MDA-MB-231 stanica nakon bojanja stanica hematoksilinom i eozinom.
- Kvercetin u testiranoj koncentraciji i u navedenim bioenergetskim uvjetima ne pokazuje utjecaj na apoptozu MDA-MB-231 stanica.
- Potrebna su dodatna istraživanja za razjašnjavanje mehanizma djelovanja kvercetina na MDA-MB-231 stanice u navedenim bioenergetskim uvjetima.

7. ZAHVALE

Posebno zahvaljujemo našem dragom mentoru prof. dr. sc. Józsefu Petriku na ideji, stručnom vodstvu, kao i utrošenom vremenu, trudu i strpljenju.

Iskrena zahvala i Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu kojeg je nastao ovaj rad.

8. POPIS LITERATURE

1. Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*. 2013, 3, 439-459.
2. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab*, 2008, 7, 11-20.
3. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res*, 2007, 13, 4429-4434.
4. Duo J, Ying GG, Wang GW, Zhang L. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep*, 2012, 5, 1453-1456.
5. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35, 495-516.
6. Gao JL, Chen YG. Natural Compounds Regulate Glycolysis in Hypoxic Tumor Microenvironment. *BioMed Research International*, 2015.
7. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 2004, 4, 891-899.
8. Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105, 452-458.
9. Granchi C, Minutolo F. Anti-cancer agents counteracting tumor glycolysis. *ChemMedChem*, 2012, 7, 1318–1350.
10. Jiang B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes & Diseases*, 2017, 4, 25-27.
11. Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. *Biomed Res Int*, 2013, vol. 2013.

12. Khan F, Niaz K, Maqbool F, Ismail Hassan F, Abdollahi M, Nagulapalli Venkata KC et al. Molecular Targets Underlying the Anticancer Effects of Quercetin: An Update. *Nutrients*, 2016, 8, 529.
13. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*, 2016, 37, 8471-8486.
14. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, vol. 2013, 1-16.
15. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 2016, 41, 211-218.
16. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 2006, 10, 515-527.
17. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016, 5.
18. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 2016, 23, 27-47.
19. Petrik J, Rumora L, Juretić D, Čepelak I. Apoptoza-detekcija i kvantifikacija. *Biochemia medica*, 2003, 13, 109-117.
20. Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram ND. Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 2015, 10.
21. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. U: Assay Guidance Manual. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., urednici. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004, str. 45.
22. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res*, 2010, 1, 109-126.
23. Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M et al. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and

- Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. Sci Rep, 2016, 6.
24. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. Nature, 2012, 486, 400-404.
 25. Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. Nat Rev Cancer, 2010, 10, 267-277.
 26. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. Cell, 2017, 168, 657-669.
 27. Warburg O, Wind Franz, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. J Gen Physiol, 1927, 8, 519-530. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. Science, 1956, 123, 309-314.
 28. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. Science, 1956, 123, 309-314.
 29. Warburg O. The metabolism of carcinoma cells. The Journal of Cancer Research, 1925, 9, 148-163.
 30. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30.
 31. www.breastcancer.org , pristupljeno 19. 4. 2018
 32. www.breast-cancer-research.biomedcentral.com , pristupljeno 19. 4. 2018
 33. www.hzjz.hr , pristupljeno 24. 3. 2018.
 34. www.phe-culturecollections.org.uk , pristupljeno 19. 4. 2018

9. SAŽETAK

Učinak kvercetina na vijabilnost MDA-MB-231 stanica karcinoma dojke

Antonija Hanžek i Angela Milanović

Karcinom dojke najčešća je maligna bolest žena današnjice od koje u Republici Hrvatskoj godišnje obolijeva oko 2500 žena, a umire njih više od 900. Terapija karcinoma dojke provodi se ovisno o stadiju i molekularnoj vrsti bolesti. Veliki izazov predstavlja trostruko negativan karcinom dojke za koji ne postoji specifična meta liječenja izuzev konvencionalnih opcija liječenja kirurškim zahvatom, radioterapijom ili kemoterapijom. MDA-MB-231 stanična je linija karcinoma dojke koji je negativan na ekspresiju receptora estrogenskog, progesteronskog i HER2 humanog epidermalnog faktora rasta. Karakterizira ga agresivnost, visok stupanj proliferacije i brzog rasta sa tendencijom metastaziranja što rezultira i lošijom prognozom. Prema najnovijim spoznajama, interes u kontekstu prevencije i antitumorske terapije usmjerava se na prirodne spojeve flavonoide. Bioflavonoidi su polifenolni spojevi sa pozitivnim učincima na zdravlje čovjeka. Kvercetin je predstavnik bioflavonoida sa širokim spektrom biološke i farmakološke aktivnosti. Pored značajne antiupalne i antioksidativne aktivnosti, kvercetin djeluje antikancerogeno i antiproliferativno usporavajući razvoj tumora i napredak različitih vrsta karcinoma. Tumorske stanice reprogramiraju svoj energetskei metabolizam i troše velike količine glukoze pojačano ekspimirajući GLUT transporter za unos glukoze u stanicu. Kvercetin djeluje kao inhibitor GLUT1 transportera reducirajući tako mogućnost malignih stanica za iskorištenje glukoze glikolizom. Kvercetin ima i proapoptičko djelovanje na maligne stanice karcinoma dojke. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak kvercetina na vijabilnost, odnosno metaboličku aktivnost, morfologiju i apoptozu MDA-MB-231 stanica karcinoma dojke pri različitim bioenergetskim uvjetima, odnosno koncentracijama glukoze (0, 1, 5, 10, 25 i 50 mM). Provođenjem MTT testa, pri svim koncentracijama glukoze pokazalo se da kvercetin uzrokuje pad vijabilnosti tumorskih stanica nakon 24-satne i 48-satne izloženosti. Nakon bojanja MDA-MB-231 staničnih preparata hematoksilinom i eozinom i mikroskopiranja pokazalo se da kvercetin utječe na broj i morfološke karakteristike stanica. Provođena je detekcija apoptoze TUNEL metodom (engl. *Terminal*

deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) uz analizu fluorescentnom mikroskopijom. Međutim, u navedenim bioenergetskim uvjetima i ispitanoj koncentraciji kvercetina od 100 mM nije zabilježena. Na temelju rezultata može se prepostaviti citotoksično i antitumorsko djelovanje bioflavonoida kvercetina na MDA-MB-231 stanice karcinoma dojke i može poslužiti kao osnova za daljnja ispitivanja mehanizama kvercetina na tumorske stanice.

Ključne riječi: karcinom dojke, kvercetin, MDA-MB-231, vijabilnost

10. SUMMARY

Effects of quercetin on the viability of MDA-MB-231 breast cancer cells

Antonija Hanžek and Angela Milanović

Breast cancer is the most common malignant disease among women. Approximately 2500 women are diagnosed annually in the Republic of Croatia and more than 900 of them die. Breast cancer therapy depends on the stage and the molecular type of the disease. Major challenge is a triple negative breast cancer. Except for conventional options including surgical treatment, radiotherapy or chemotherapy, there is no specific treatment target. MDA-MB-231 is a breast cancer cell line with negative expression of estrogen, progesterone and HER2 (human epidermal growth factor 2) receptors. It is characterized by its aggressive nature, high degree of proliferation and rapid growth with a high tendency of metastasis resulting in a poor prognosis. According to the latest findings, interest in the context of prevention and antitumor therapy is directed to natural flavonoid compounds. Bioflavonoids are polyphenolic compounds with positive effects on human health. Quercetin is bioflavonoid with a wide spectrum of biological and pharmacological activities. In addition to significant anti-inflammatory and antioxidant activity, quercetin has anticarcinogenic and antiproliferative potential. It is proven to slow down tumour growth and progression of various types of cancer. Tumor cells reprogram energy metabolism and consume large amounts of glucose by overexpressing GLUT transporter for glucose uptake into the cell. Quercetin acts as an inhibitor of GLUT1 transporter, thus reducing the ability of malignant cells to utilize glucose by glycolysis which affects invasiveness. Quercetin also has proapoptotic effect on malignant breast cancer cells. The aim of this experiment was to investigate the effect of quercetin on the viability or metabolic activity, morphology and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells at different bioenergy conditions defined by glucose concentrations (0, 1, 5, 10, 25 and 50 mM). MTT assay was performed and the results showed that at all glucose concentrations, quercetin caused a decrease in tumor cell viability after 24-hour and 48-hour exposure. After staining MDA-MB-231 cell preparations with haematoxylin and eosin and microscopy, quercetin has been shown to affect

number and morphological characteristics of cells. The Apoptosis detection was performed by TUNEL method (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) with fluorescence microscopy analysis. However, in these bioenergy conditions and the tested concentration of 100 μ M quercetin, apoptosis was not detected.

Based on the results, the cytotoxic and anti-tumor activity of the bioflavonoid quercetin on the MDA-MB-231 breast cancer cells is observed and this experiment can serve as a basis for further experiments of quercetin mechanisms on tumor cells.

Key words: breast cancer, quercetin, MDA-MB-231, viability