

# Protutumorsko djelovanje stearyl gliciretinata na stanice raka debelog crijeva

---

**Dobrić, Dorotea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:178454>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dorothea Dobrić

PROTUTUMORSKO DJELOVANJE STEARIL GLICIRETINATA NA  
STANICE RAKA DEBELOG CRIJEVA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dorothea Dobrić

PROTUTUMORSKO DJELOVANJE STEARIL GLICIRETINATA NA  
STANICE RAKA DEBELOG CRIJEVA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: prof. dr. sc. Robert Domitrović, dipl. ing. med. biokem.

Komentorica rada: dr. sc. Iva Suman, mag. sanit. ing.

Završni rad obranjen je dana 02.07.2024. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Marin Tota, mr. ph.
2. prof. dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl. ing. preh. teh.
3. prof. dr. sc. Robert Domitrović, dipl. ing. med. biokem.
4. dr. sc. Iva Suman, mag. sanit. ing.

Rad sadrži 43 stranice, 10 slika, 7 grafikona i 59 literaturna navoda.

## SAŽETAK

Rak debelog crijeva jedan je od vodećih uzroka pobola i pomora u svijetu sa gotovo 2 milijuna novooboljelih godišnje te treći najčešće dijagnosticirani oblik karcinoma. Cilj ovog istraživanja bio je pokazati učinak  $18\beta$ -gliciretinske kiseline ( $18\beta$ -GK) i stearil gliciretinata (SG) na stanice raka debelog crijeva HCT116. Bioaktivni pentaciklički triterpenoid,  $18\beta$ -GK i njezin stearil ester SG, analizom vitalnosti stanica (XTT test) pokazali su smanjenje stanične vitalnosti HCT116 stanica (rak debelog crijeva) ovisno o primjenjivanoj dozi.  $18\beta$ -GK postigla je  $IC_{50}$  vrijednost od 245,08  $\mu$ M dok je SG postigao pet puta nižu  $IC_{50}$  vrijednost od 35,28  $\mu$ M. Obzirom na bolji učinak u smanjenju vitalnosti tumorskih stanica SG u odnosu na  $18\beta$ -GK, u manjoj dozi, pokazani su mehanizmi kojima SG postiže svoje protutumorsko djelovanje. Western blot analizom pokazan je učinak SG na promjenu izražaja proteina od interesa. SG, ovisno o dozi (10, 15, 20 i 25  $\mu$ M) povećao je izražaj inhibitora staničnog ciklusa, p21. Izražaj p-AMPK $\alpha$  Thr172 (aktivacija AMPK $\alpha$ ), ovisno o dozi SG, se povisio ukazujući na sniženje količine ATP-a u stanicama, odnosno povećanje omjera AMP/ATP. Spektrofotometrijska analiza potrošnje glukoze mjerenjem u staničnom mediju pokazala je kako tretman SG-om umanjuje potrošnju glukoze ovisno o dozi. SG je sukladno tome povećao izražaj proteina autofagije, LC3B II. Analizom izražaja PARP-a, markera apoptoze u slučaju njegovog cijepanja, pokazano je kako stanice nisu aktivirale apoptozu, već autofagiju. Kotretman s 3-metiladeninom (3-MA), inhibitorom autofagije, pokazao je zaštitni učinak, sugerirajući aktivaciju citotoksične autofagije u tretmanu sa SG. Rezultati trenutnog istraživanja daju uvid u mehanizam djelovanja i antitumorski potencijal SG u liječenju tumora debelog crijeva kroz aktivaciju citotoksične autofagije.

Ključne riječi: HCT 116, stearil gliciretinat, autofagija

## SUMMARY

Colon cancer is one of the leading causes of illness and death in the world, with almost 2 million new cases per year, and the third most frequently diagnosed form of cancer. The aim of this study was to demonstrate the effect of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (18 $\beta$ -GA) and stearyl glycyrrhetinate (SG) on HCT116 colon cancer cells. The bioactive pentacyclic triterpenoid, 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid and its stearyl ester SG, showed a decrease in the cell viability of HCT116 cells (colon cancer) depending on the applied dose, using the cell viability analysis (XTT test). 18 $\beta$ -GA achieved an IC<sub>50</sub> value of 245,08  $\mu$ M while SG achieved a fivefold lower IC<sub>50</sub> value of 35,28  $\mu$ M. Considering the better effect in reducing the viability of SG tumor cells compared to 18 $\beta$ -GA, in a lower dose, the mechanisms by which SG achieves its antitumor effect have been demonstrated. Western blot analysis showed the effect of SG on the change in the expression of the protein of interest. SG, dose-dependently (10, 15, 20 and 25  $\mu$ M) increased the expression of the cell cycle inhibitor, p21. The expression of p-AMPK $\alpha$  Thr172 (AMPK $\alpha$  activation), depending on the dose of SG, increased, indicating a decrease in the amount of ATP in the cells, i.e. an increase in the AMP/ATP ratio. Spectrophotometric analysis of glucose consumption by measurement in the cell medium showed that treatment with SG reduces glucose consumption in a dose-dependent manner. Accordingly, SG increased the expression of the autophagy protein, LC3B II. Analysis of the expression of PARP, a marker of apoptosis in case of its cleavage, showed that the cells did not activate apoptosis, but autophagy. Co-treatment with 3-methyladenine (3-MA), an autophagy inhibitor, showed a protective effect, suggesting activation of cytotoxic autophagy in SG treatment. The results of the current research provide insight into the mechanism of action and the antitumor potential of SG in the treatment of colon tumors through the activation of cytotoxic autophagy.

Key words: HCT 116, stearyl glycyrrhetinate, autophagy

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 2  |
| 1.1. Onkogeneza .....                                  | 3  |
| 1.2. Dijagnostika i liječenje .....                    | 4  |
| 1.3. Stanična smrt .....                               | 5  |
| 1.3.1. Apoptoza .....                                  | 6  |
| 1.3.1.1. Ekstrinzični i intrinzični put apoptoze ..... | 7  |
| 1.3.2. Autofagija .....                                | 8  |
| 1.3.2.1. Makroautofagija.....                          | 9  |
| 1.4. Gliciretinska kiselina .....                      | 11 |
| 1.4.1 18β-gliciretinska kiselina .....                 | 12 |
| 1.4.2. Stearil gliciretinat.....                       | 13 |
| 2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....                  | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....                           | 15 |
| 3.1 Materijali .....                                   | 15 |
| 3.1.1. Laboratorijski pribor i posuđe .....            | 15 |
| 3.1.2. Laboratorijski uređaji.....                     | 15 |
| 3.1.3. Kemikalije.....                                 | 16 |
| 3.1.4. Stanična linija.....                            | 17 |
| 3.1.5. Primarna i sekundarna protutijela .....         | 17 |
| 3.2 METODE.....  | 18 |
| 3.1 Kultivacija i priprema stanica za tretman .....    | 18 |
| 3.2 Tretman stanica i test stanične vitalnosti .....   | 18 |
| 3.4 Izolacija proteina.....                            | 19 |
| 3.5 Određivanje koncentracije proteina .....           | 20 |
| 3.6 Western blot analiza.....                          | 20 |

|   |    |
|---|----|
| 3.7. Određivanje koncentracije glukoze GOD-POD metodom.....   | 21 |
| 4. REZULTATI.....   | 23 |
| 4.1. Utjecaj stearyl gliciretinata i 18 $\beta$ -gliciretinske kiseline na staničnu vitalnost HCT<br>116 stanične linije..... | 23 |
| 4.2. Koncentracije glukoze nakon 24-satnog tretmana sa stearyl gliciretinatom .....   | 24 |
| 4.3. Utjecaj tretmana stearyl gliciretinatom promjenu izražaja proteina apoptoze .....  | 25 |
| 4.3.1. PARP.....  | 25 |
| 4.4. Utjecaj tretmana stearyl gliciretinatom na promjenu izražaja proteina autofagije i<br>staničnog ciklusa.....             | 26 |
| 4.4.1. LC3 .....  | 26 |
| 4.4.2. AMPK.....  | 28 |
| 4.4.3. p21.....   | 29 |
| 4.5. Inhibicija autofagije.....   | 31 |
| 5. RASPRAVA.....  | 32 |
| 6. ZAKLJUČAK .....  | 37 |
| 7. REFERENCE .....  | 38 |



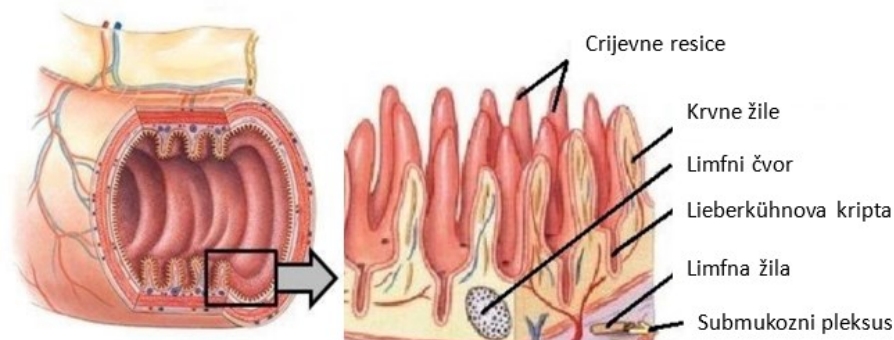
## 1. UVOD

Kolorektalni karcinom ili rak debelog crijeva (KRK; eng. *colorectal cancer, CRC*) je među vodećim uzrocima smrti u svijetu sa gotovo 2 milijuna novooboljelih godišnje i milijun slučajeva koji završe smrtnim ishodom. Treći je najčešće dijagnosticirani oblik raka, a 10% novootkrivenih na svjetskoj razini pripada raku debelog crijeva radi čega predstavlja javnozdravstveni problem današnjice. (1) Rak može biti uzrokovan aktivacijom različitih protoonkogenih, inaktivacijom tumor supresorskih gena, kromosomskom nestabilnošću kao i epigenetskim promjenama deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Spomenute genetske promjene u interakciji su s različitim čimbenicima okoliša uključujući prehranu s visokim udjelom zasićenih masti i ugljikohidrata, sjedilački način života, pretilost, pušenje i konzumaciju alkohola. Geografske varijacije u stopama incidencije i mortaliteta prvenstveno su određene s čimbenicima rizika poput pristupa zdravstvenoj skrbi i programima probira, prehranom i obrazovanjem, a potom i s genetikom. Prema navedenom, Azija ima najveću učestalost raka debelog crijeva koja iznosi 52% ukupnog svjetskog udjela, a slijede je Europa, Sjeverna Amerika, Latinska Amerika i Karibi te Afrika. (2) Prevalencija raka debelog crijeva uočena je kod populacije starije od 50 godine, ali i povećana incidencija kod mlađih populacija u posljednjem desetljeću što se dovodi u korelaciju sa promjenama u načinu života. Na pojavu raka debelog crijeva može utjecati i pozitivna klinička slika na upalne bolesti crijeva poput Kronove bolesti ili ulceroznog kolitisa gdje je vjerojatnost nastanka raka debelog crijeva dva puta veća nego kod negativne kliničke slike. (3, 4)

U Republici Hrvatskoj je radi promoviranja prevencije formiran Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva temeljem odluke Vlade 2007. godine. Rak debelog crijeva je najčešće dijagnosticiran među karcinomima te predstavlja drugi najčešći uzrok smrti od raka. Posljednji podaci prikupljeni iz Registra za rak Republike Hrvatske odnose se na 2021. godinu gdje je rak debelog crijeva otkriven kod 3706 osoba. Programom se nastoji ranim i pravovremenim otkrivanjem bolesti poboljšati učinkovitost liječenja i kvalitete života pošto je rak debelog crijeva u 9 od 10 slučajeva izlječiv ukoliko se otkrije pravovremeno. (5)

## 1.1. Onkogeneza

Postoje tri glavna prekursorska puta koja dovode do razvoja karcinom, a tradicionalni adenom-karcinom put dovodi do razvoja 96% karcinoma debelog crijeva. (6) Sluznica debelog crijeva obložena je mnogobrojnim Lieberkühnovim kriptama u čijim bazama matične stanice ili stanice slične matičnoj stanici pod utjecajem okolišnih i genetskih faktora te aktivacije onkogeni ili inaktivacije tumor supresorskih gena mogu biti podvrgnute brojnim genetskim i/ili epigenetskim promjenama (Slika 1). Navedene promjene im omogućuju hiperproliferaciju koja posljedično dovodi do razvoja raka debelog crijeva. (7)



Slika 1. Prikaz Lieberkühnovih kripti i strukture debelog crijeva

Preuzeto sa: [dn\\_campa\\_simona.pdf \(uni-lj.si\)](#)

Razvoj karcinoma adenom-karcinom putem započinje inaktivacijom tumor supresorskog gena APC (eng. *Adenomatous polyposis coli*) koji sprječava nekontroliranu diobu stanica te radi toga uzrokuje nastanak benignog polipa ili adenoma. Deset posto adenomatoznih polipa može postati maligno tvoreći adenokarcinom koji potom raste u volumenu i širi se na okolno tkivo. Potpunom razvoju karcinoma prethodi dodatna aktivacija, to jest inaktivacija ciljanih gena te je vremenski period razvoja ovakvog oblika karcinom određen u desetljećima. Također, postoji i mogućnost razvoja metastaza u limfne ili krvne žile, a s obzirom na stadij bolesti i prisutnost metastaza određuju se metode terapije. (6, 8)

## 1.2. Dijagnostika i liječenje

Opća bol u trbuhu, gubitak težine bez drugih specifični uzroka, slabost, nedostatak željeza, krvave stolice i anemija su najčešći simptomi te ovisе o položaju i stadiju tumora. Simptomi se javljaju kod kasnijih stadija bolesti te nisu nužno specifični za rak debelog crijeva. Najčešće zastupljena dijagnostička metoda kojom se prevenira ili potvrđuje rak debelog crijeva je kolonoskopija. Iako invazivna, pretraga ima visoku specifičnost i osjetljivost te omogućava uklanjanje rano uočenih polipa čime se sprječava nastanak raka. Također, kolonoskopija pruža mogućnost biopsije tkiva koje se potom podvrgava patohistološkoj analizi. Redovita kolonoskopska kontrola preporuča se pojedincima sa povećanim rizikom nastanka karcinoma poput onih s dugotrajnim ulceroznim kolitisom ili prethodno uklonjenim polipima dok se za opći probir na rak debelog crijeva mogu primijeniti i manje invazivne pretrage. (7)

Jedna od njih je CT kolonografija, to jest virtualna kolonoskopija. Tehnika je minimalno invazivna, a bazira se na korištenju složenog grafičkog računalnog softvera koji se primjenjuje na dobivenim CT podacima. Trodimenzionalne endoluminalne slike debelog crijeva dinamički se prikazuju na računalu dajući izgled "proletanja" koji korelirala onome što je vidljivo na tradicionalnoj kolonoskopiji. (9) Endoskopija video kapsulom ili kapsularna endoskopija još je jedna od neinvazivnih metoda koja omogućava pregled debelog crijeva. Kapsula sadrži jednu do dvije kamere koje prolazeći kroz probavni trakt, snimaju sluznicu crijeva i prenose slike na prijamnik koji pacijent nosi sa sobom. Analiza se može provesti i na stolici pacijenta izvođenjem fekalnog imunohistokemijskog testa (eng. *Fecal immunochemical test*, FIT) na okultno krvarenje koji se bazira na tome da se polipi mogu oštetiti stolicom i tako krvariti u količinama koje nisu vidljive ljudskim okom. (10, 11)

Ukoliko se pojava karcinoma ne uspije prevenirati, primjenjuju se terapijske metode poput kirurških zahvata, radijacije, kemoterapije i imunoterapije ovisno o tipu i stadiju karcinom. Ukoliko nije došlo do metastaziranja, širenja karcinoma na susjedne organe i tkiva, najčešće se podliježe kirurškoj resekciji ciljanog tkiva radi njegovog potpunog uklanjanja. Određene metode liječenja mogu se primjenjivati zasebno ili istovremeno poput primjene radijacije tijekom kirurškog zahvata na ciljano tkivo. U slučaju primjene kemoterapije, koja se najčešće sastoji od određenog broja ciklusa primjene, pacijent prima jedan ili više lijekova istovremeno kako bi se spriječio rast i širenje malignih stanica. Široko korišten kemoterapeutik je 5-fluorouracil (5-FU), zasebno ili s leukovorinom (folinska kiselina), vitaminom koji poboljšava učinkovitost 5-FU-a. Kemoterapija se može kombinirati i s drugim lijekovima poput

nesteroidnih protuupalnih lijekova i probiotika kako bi se ublažila bol pacijenta i nuspojave. (12) Kod sve većeg broja bolesnika s KRK-om uočava se pojava rezistencije na suvremenu kemoterapiju, smanjujući učinkovitost lijekova protiv raka i u konačnici dovodeći do neuspješnog liječenja radi čega je potreban novi pristup liječenju. Jedan od pristupa liječenja tumora je ciljano kemoterapija koja se bazira na poticanju ili suprimiranju signalnih putova rezultirajući promjenom staničnih procesa koji dovode do redukcije tumora kao što je stanična smrt.

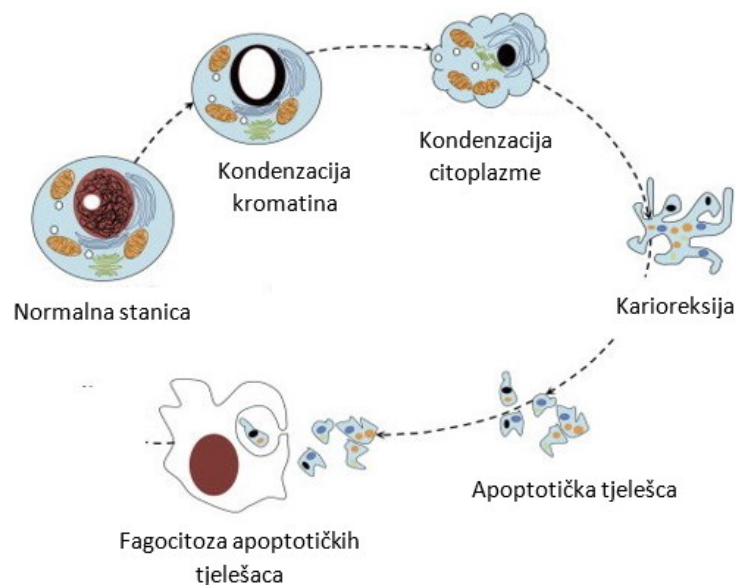
### 1.3. Stanična smrt

Stanična smrt sastavni je dio svih stanica ljudskog organizma kojim nastoje održati biološku homeostazu i obraniti organizam od patogenih tvari. U trenutku kada stanica prepozna abnormalnosti koje ne može popraviti započinje proces stanične smrti kako bi zaštitila preostale zdrave stanice. Prema morfologiji, biokemiji i funkciji, staničnu smrt možemo podijeliti na nereguliranu (slučajnu) staničnu smrt koja je potaknuta vanjskim čimbenicima poput ozljeda ili virusnih i bakterijskih infekcija te reguliranu staničnu smrt (eng. *Regulated cell death*, RCD) koju karakteriziraju kontrolirani signalni putevi koji igraju ključnu ulogu u obnovi tkiva.

Glavni oblik neregulirane stanične smrti je nekroza koja se javlja kao odgovor na razna oštećenja ili patološka stanja, ali ne tijekom normalnog razvoja stanice. Tijekom nekroze stanica i organeli bubre kompromitirajući strukturu membrane stanice koja se naposljetku raspadne uzrokujući ispuštanje staničnog sadržaja i oštećenje okolnih stanica. Prvi identificirani oblik regulirane stanične smrti je apoptoza koju slijedi autofagija, a s vremenom uočeni su i drugi oblici poput piroptoze, nekroptoze, ferroptoze i drugi. Signalni putevi navedenih oblika stanične smrti mogu se preklapati što dovodi do povezanosti između različitih tipova stanične smrti. (13, 14) U trenutku kada stanica nije u stanju popraviti pogreške koje se pojavljuju unutar normalnih unutarstaničnih procesa poput staničnog ciklusa, proliferacije ili kao odgovor na vanjske toksične učinke, cijeli RCD put je aktiviran. Jednako kako nekontrolirani stanični rast može dovesti do razvoja karcinoma, tako i nedostatak istog može uzrokovati stanja poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Kako bi razvoj učinkovitih tretmana za rak i druge bolesti definirane abnormalnostima u regulaciji stanične smrti bio moguć, potrebno je razumjeti različite puteve koji dovode do stanične smrti te njezine oblike. (13, 15)

### 1.3.1. Apoptoza

Apoptoza ili programirana stanična smrt mehanizam je svojstven većini sisavaca kojim održavaju konstantan broj stanica u organizmu radi održavanja homeostaze te uklanjaju one sa oštećenjima DNK-a. Uloga apoptoze vidljiva je tijekom embrionalnog razvoja gdje dolazi do uklanjanja viška tkiva među prstima. Apoptoza se normalno javlja tijekom razvoja i starenja organizma, ali je također i obrambeni mehanizam pri reakcijama imunološkog sustava ili prilikom uklanjanja oštećenih stanica. Tijekom apoptoze, stanica prolazi morfološke i biokemijske promjene koje uključuju početnu kondenzaciju kromatina, stvaranje zbijene mase kromatina, koja je poznata i kao piknoza jezgre. Piknoza je praćena fragmentacijom DNK. U sljedećoj fazi dolazi do pucanja jezgre stanice poznate kao karioreksija te kondenzacija citoplazme radi čega se stanica smežura. Potom, na membrani stanice dolazi do stvaranja okruglih izbočina koje se odvajaju sa površine stanice i tvore apoptotička tjelešca (eng. *Apoptotic bodies*, ApoBDs). Apoptotička tjelešca okružena su membranom i sadrže fragmente DNK te gusto pakirane stanične organele. Na kraju bivaju fagocitirani što označava završni korak ciklusa te je važnost posljednjeg koraka u sprječavanju doticaja apoptotičkih tjelešca sa okolnim zdravim stanicama (Slika 2). Vrijeme potrebno za potpuni ciklus od početka apoptoze do smrti stanice može biti 24 sata ili nekoliko dana. (15-17)



Slika 2. Prikaz apoptoze stanice.

Preuzeto sa: [https://www.researchgate.net/figure/Cytology-of-apoptosis-The-different-stages-of-apoptotic-cell-death-start-by-cellular\\_fig3\\_274013152](https://www.researchgate.net/figure/Cytology-of-apoptosis-The-different-stages-of-apoptotic-cell-death-start-by-cellular_fig3_274013152)

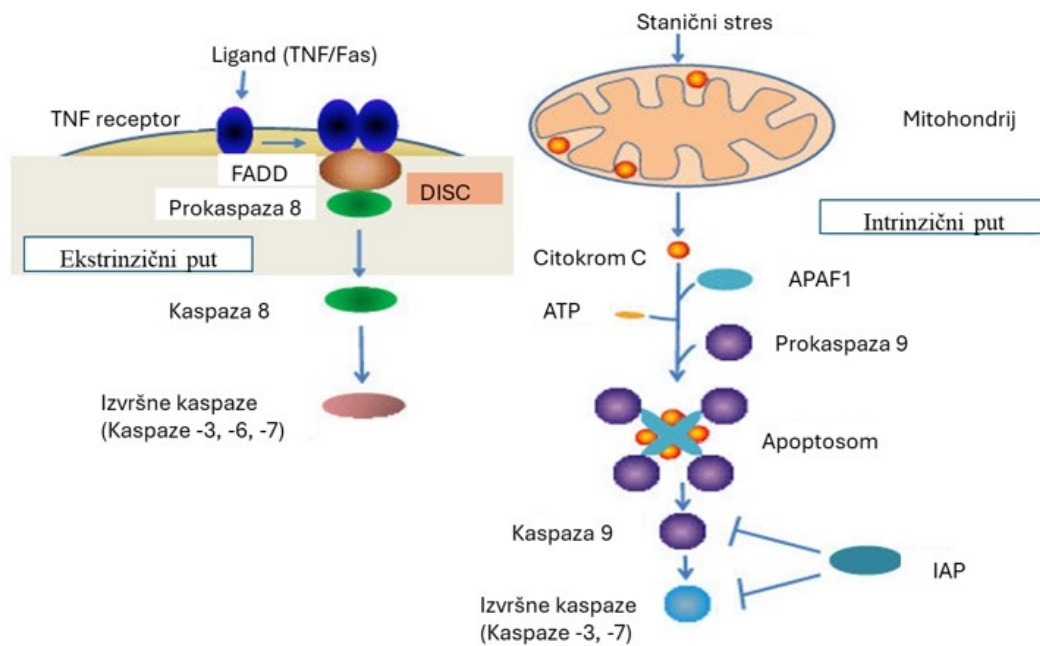
Središnju ulogu u inicijaciji i provođenju apoptoze imaju cistein-aspartične proteaze to jest kaspaze koje se dijele na inicijatorske ili pokretačke (kaspaze 2, 8, 9 i 10) te izvršne ili efektorske (kaspaze 3, 6 i 7). Prilikom oštećenja stanice potiče se aktivacija jedne ili više inicijatorskih kaspaza putem auto-proteolize koje potom cijepanjem (eng. *cleaving*) aktiviraju izvršne kaspaze i apoptozu. (16)

### 1.3.1.1. Ekstrinzični i intrinzični put apoptoze

Dva glavna puta apoptoze su vanjski, ekstrinzični, ili put posredovan receptorima te unutarnji, intrinzični, ili mitohondrijski put (Slika 3). Ekstrinzični put ovisan je o vanjskim signalima, to jest izvanstaničnim ligandima TNF (eng. *tumor necrosis factor*) koji djeluju preko receptora TNFR (eng. *tumor necrosis factor receptor*) transmembranskih proteina koji unutar stanice tvore interakcijsku domenu protein-protein poznatu kao i domenu smrti (eng. *death domain*, DD). Aktivacija ekstrinzičnog puta ovisi o dva glavna liganda: TNF i Fas. U trenutku vezanja liganda dolazi do konformacijskih promjena koje potom omogućuju naknadno regrutiranje TRADD-a (engl. *TNF receptor 1-associated via death domain*) i FADD-a (engl. *Fas-associated via death domain*) iz citoplazme na površinu stanice i njihovo vezanje za receptore. FADD ima ulogu mosta između receptora i prokaspaze 8 koja se na njega veže i tako stvara DISC (engl. *death-inducing signaling complex*) nakon čega dolazi do aktivacije kaspaze 8 koja može inducirati staničnu smrt cijepanjem izvršnih kaspaza. (17-20)

Glavni pokretač intrinzičnog puta apoptoze je stanični stres koji može biti izazvan oštećenjem DNK, oksidativnim stresom, zračenjem, hipoksijom ili nedostatkom hranjivih tvari. Kod svega navedenog dolazi do permeabilizacije vanjske membrane mitohondrija (eng. *mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) radi pro-apoptotskih proteina Bak i Bax koji stvaraju pore na membrani mitohondrija. Kao rezultat dolazi do smanjenja sinteze adenozin trifosfata (ATP) radi promjene membranskog potencijala te oslobađanja proteina iz mitohondrijske intermembrane u prostor citoplazme poput citokroma C i apoptogenih proteina (eng. *apoptosis inducing factor*, AIF). Citosolni citokrom C se veže za adaptorski protein APAF1 (eng. *apoptotic protease activating factor 1*) te stvara kompleks apoptosom. Apoptosom veže prokaspazu 9 i omogućava njeno cijepanje na aktivnu kaspazu 9 koja potom aktivira efektorsku kaspazu 3. Proteini koji su zaduženi za regulaciju MOMP-a pripadaju Bcl-2 obitelji proteina te neki imaju pro-apoptotičke funkcije, a drugi anti-apoptotičke. Omjer i ravnoteža između pro-apoptotskih i anti-apoptotskih proteina može odrediti sudbinu stanica na

takav način da povećanje anti-apoptotskih proteina može inhibirati apoptozu ili obrnuto. (17, 19)



Slika 3. Prikaz ekstrinzičnog i intrinzičnog puta apoptoze.

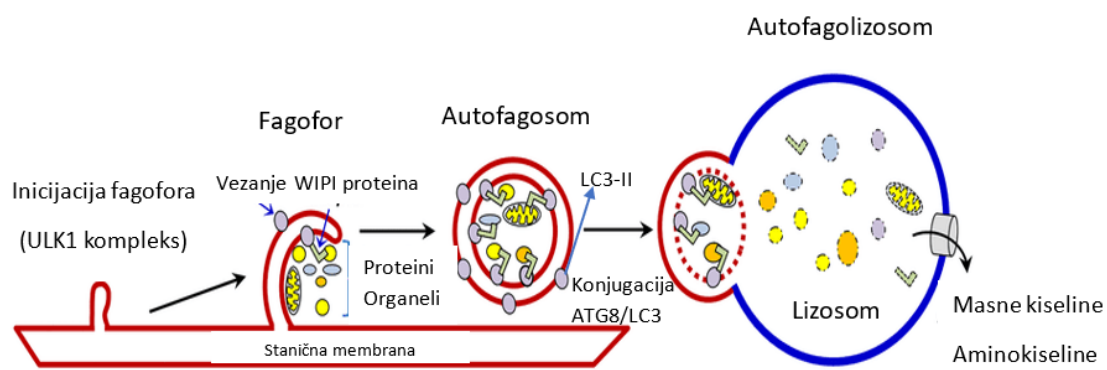
Preuzeto sa: [Extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. The two major apoptosis... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)

### 1.3.2. Autofagija

Autofagija je katabolički odgovor stanice na nedostatak nutrijenata i kisika. Tijekom procesa stanične komponente kao što su makroproteini ili cijeli organeli stanice bivaju izdvojeni u lizosome za razgradnju. Lizirani stanični sadržaj može služiti kao izvor energije na kraju razgradnje ili se recikliraju u nove stanične komponente radi čega se na autofagiju referira i kao evolucijski očuvan proces recikliranja. Za razliku od procesa apoptoze, tijekom autofagije nema značajnih promjena u jezgri stanice niti dolazi do fragmentacije stanice. Iako se autofagija često povezuje sa recikliranjem staničnih komponenti, može rezultirati i uništavanjem stanice i na taj se način povezuje s uklanjanje ostarjelih stanica iz ostarjelih tkiva i uništavanje neoplastičnih lezija. S obzirom na fiziološke funkcije i put prijenosa citoplazmatskog supstrata do lizosoma razlikujemo tri oblika autofagije: makroautofagija putem stvaranja autofosoma, mikroautofagija gdje citosolni materijal invaginacijom membrane direktno ulazi u lizosom te selektivna to jest autofagija posredovana šaperonom (engl. *chaperone mediated autophagy*, CMA) gdje se protein putem šaperona veže za receptor na membrani lizosoma. (21)

### 1.3.2.1. Makroautofagija

Makroautofagija je proces koji uključuje obavljanje citoplazmatskog sadržaj poput cijelih organela, lipida i makroproteina unutar strukturnih vezikula s dvostrukom membranom koje se nazivaju autofagosomi (Slika 4). Formacija autofagosoma započinje aktivnošću inicijacijskog kompleksa sastavljenog od ULK1 serin-treonin kinaza (eng. *Unc-51-like autophagy-activating kinase 1*) i dodatnih regulatornih proteina. Kompleks potom aktivira niz fosforilacija koje dovode do aktivacije PI3K kompleksa (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase complex*) i stvaranja fagofora, prekursora autofagosoma. PI3K kompleks potiče proizvodnju membranskog lipida PI3P (eng. *phosphatidylinositol 3-phosphate*) i njegovo vezanje sa proteinima obitelji WIPI (eng. *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*). Vezanje WIPI-ja na rastući fagofor olakšava konjugaciju ATG8/LC3 obitelji proteina na membrane autofagosoma što je glavni događaj u procesu autofagije. Tako konjugirani na rastuću membranu fagofora, proteini ATG8 dopuštaju regrutiranje ključnih proteina koji će graditi membranu zatvorenog autofagosoma putem ključnih protein-protein interakcija. Potom autofagosomi fuziraju sa lizosomima tvoreći autofagolizosome te u lumenu lizosoma bivaju razgrađeni djelovanjem pH-osjetljivih hidrolaza. Rezultat razgradnje su masne kiseline i slobodne aminokiseline, a smatra se da se aminokiseline koriste za sintezu proteina *de novo*. (22-24) Proces nastanka autofagolizosoma prikazan je u nastavku.



Slika 4. Prikaz signalnog puta kod makroautofagije.

Preuzeto sa: [https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-macroautophagy-Different-steps-are-involved-in-the-orchestration-of-this\\_fig2\\_353939752](https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-macroautophagy-Different-steps-are-involved-in-the-orchestration-of-this_fig2_353939752)



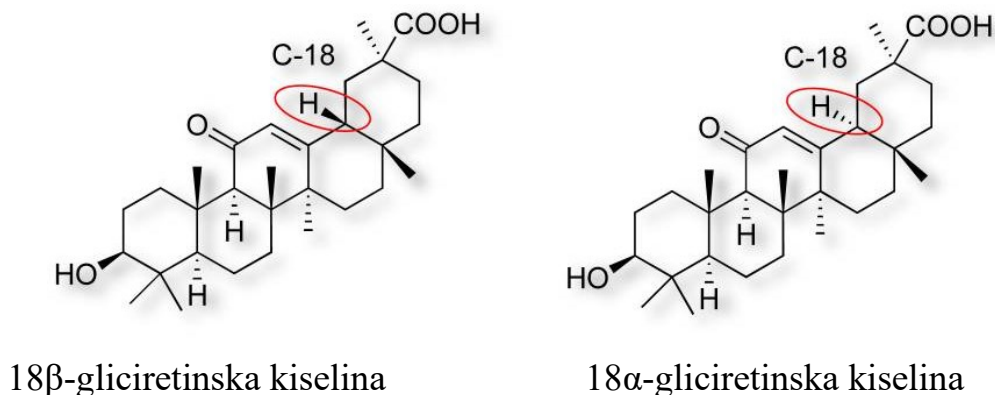
Proces je reguliran signalnim putevima koji detektiraju promijenjene razine hranjivih tvari, energije i faktora rasta. Dva glavna regulatorna puta regulirana su putem kinaza koje osjećaju dostupnost hranjivih tvari i status intracelularne energije, a uključuju put rapamicina ili mTOR put (eng. *mammalian target of rapamycin*, mTOR) i adenin monofosfat-aktivirane protein kinaze (eng. *AMP-activated protein kinase*, AMPK). Kada su razine hranjivih tvari visoke, mTOR inhibira autofagiju fosforilacijom i inaktivacijom inicijacijske kinaze ULK1, a u uvjetima niske razine hranjivih tvari aktivnost mTOR-a je inhibirana kako bi se aktivnost autofagije povećala i hranjive tvari obnovile. Suprotno, AMPK se aktivira pri niskim razinama energije stanice gdje povećan unutarstanični omjer AMP/ATP aktivira AMPK koji potom aktiviranjem ULK1 i inhibicijom mTOR-a pokreće autofagiju. (23)

LC3 (eng. *lipidated microtubule-associated protein light chain 3*), p62, Beclin-1 i ULK1 središnji su proteini povezani s autofagijom. LC3 dolazi u dva oblika LC3-I i LC3-II. Oba oblika imaju ulogu u formaciji autofagosoma. Citosolni LC3-I nastaje proteolitičkim cijepanjem pro-LC3 proteina pomoću proteaze ATG4 nakon čega se C-terminalni glicin na LC3-I proteinu konjugira sa fosfatidiletanolamin (PE). Konjugacija se odvija kroz dvije uzastopne reakcije katalizirane enzimima ATG7 i ATG3 te kao rezultat nastaje LC3-II koji se proteže kroz samu membranu autofagosoma te upravo zato služi kao dokaz prisutnosti autofagije i sredstvo kvantifikacije autofagosoma. (24)

Autofagija može igrati ulogu supresije i poticanja tumora. Većina mehanizama uključuje razgradnju onkogenih virusa i održavanje genomske stabilnosti direktno inhibirajući inicijaciju tumora i rane korake u napredovanju raka. Inhibicija autofagije i nakon formiranja kancerogenih lezija rezultira manje agresivnim oblikom karcinom. No, u kasnijim stadijima bolesti visoka razina autofagije omogućava stanicama raka preživljavanje u mikrookolišu tumora s niskom razinom hranjivih tvari i kisika potičući otpornost na kemoterapiju. (23, 25)

#### 1.4. Gliciretinska kiselina

Gliciretinska kiselina (eng. *Glycyrrhetic acid*, GA), pentaciklički triterpenoid, dobivena je hidrolizom glicirizinske kiseline (eng. *glycyrrhizinic acid*, GZ). Glicirizin je glavna aktivna komponenta sladića (lat. *Glycyrrhiza glabra* i *G. inflata*) u kojem je zastupljen u rasponu od 2-15% ovisno o biljnoj vrsti, zemljopisnim i klimatskim uvjetima. Sladić je u Kini naširoko korišten kao biljni lijek prošlih tisućljeća te se tako GZ pripisuju višestruke biokemijske i farmakološke aktivnosti, uključujući antialergijske, antivirusne, imunoregulacijske i protuupalne aktivnosti. Također, GZ se pripisuje karakteristična slatkoća i okus povezani s proizvodima od sladića pa se naširoko koristi kao zaslađivač i aroma u tvarima kao što su hrana i duhan. Tijekom metabolizma u biljci pomoću glukuronidaze ili crijevnih bakterija nakon oralne konzumacije GA se hidrolizira u dva pentaciklička triterpenoide koji su stereoizomeri: 18 $\alpha$ - i 18 $\beta$ -gliciretinske kiseline (18 $\beta$ -GK; eng. *18 $\beta$ -glycyrrhetic acid*, 18 $\beta$ -GA) (Slika 5). 18 $\alpha$ -gliciretinska kiselina zastupljena je u količini do 0,7%, a 18 $\beta$ -gliciretinska kiselina može biti prisutna u rasponu 0,1-1,6%. (26, 31)



Slika 5. Kemijska struktura gliciretinske kiseline

Preuzeto sa: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/ra/d3ra08025k>

GA ima sposobnost antitumorskog djelovanja pri čemu pokazuje značajno citotoksično djelovanje protiv širokog spektra različitih tipova stanica *in vitro* poput stanica raka pluća (27), ljudskog hepatocelularnog karcinoma (28), raka prostate (29) i stanica glioblastoma (30). Prema istraživanjima, pokazano je da pokreće apoptozu u tumorskim staničnim linijama putem mitohondrijskog puta promjenom potencijala mitohondrijske membrane, nakupljanjem

citosolnog citokroma C i aktivacijom kaspaze-9 i kaspaze-3. (31, 32) GA se radi svoje niske toksičnosti i visoke učinkovitosti ispituje kao novo antitumorsko sredstvo kao i njezine strukturne modifikacije poput 18 $\beta$ -GK i stearyl gliciretinata (eng. *Stearyl glycyrrhettinate*, SG).

#### 1.4.1 18 $\beta$ -gliciretinska kiselina

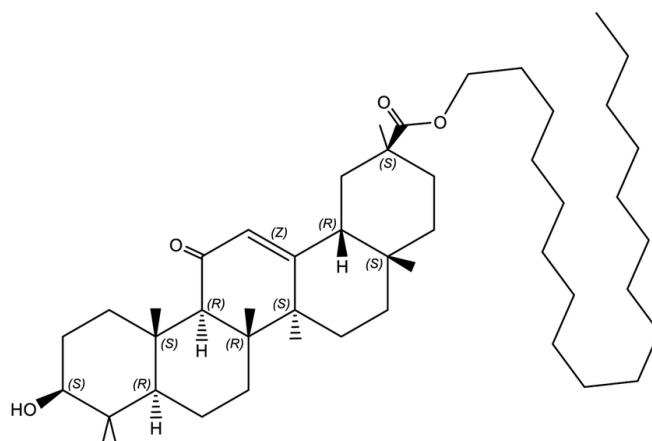
Gotovo 100% GZ se ireverzibilno transformira u 18 $\beta$ -GK u gastrointestinalnom traktu pomoću bakterijske  $\beta$ -D-glukuronidaze nakon oralne konzumacije sladića. Stoga je 18 $\beta$ -GK glavni metabolit GZ i glavna aktivna komponenta. 18 $\beta$ -GK se proučava radi svojih potencijalnih terapijskih učinaka kod raznih bolesti kao što su čirevi, hepatitis, karcinomi i kožni poremećaji. Njezina protuupalna i imunomodulirajuća svojstva bila su učinkovita u liječenju psorijaze inhibicijom mTOR signalnih puteva. Protutumorski učinak dokazan je na brojnim vrstama karcinoma poput raka želuca, prostate, jajnika, dojke i drugih. (33)

18 $\beta$ -GK ima snažan inhibicijski učinak na proliferaciju stanica raka debelog crijeva *in vitro* i *in vivo* (33). Istraživanja provedena na staničnim linijama raka debelog crijeva LoVo, SW620 i SW480 pokazuju da 18 $\beta$ -GK inhibira proliferaciju, migraciju i invaziju stanica raka. Također, ima sposobnost inducirati apoptozu i inhibirati signalni put PI3K/AKT koji, kada je aktivan, utječe na proliferaciju i pojačanu migraciju stanica raka. Inhibicija signalnog puta PI3K/AKT sprječavanjem fosforilacije događa se u vremenskom periodu od 2 sata nakon primijenjenog tretmana u *in vitro* uvjetima. U kontekstu pandemije COVID-19, utvrđeno je da 18 $\beta$ -GK utječe na bolest inhibicijom signalnih puteva interleukina-17 (IL-17) i IL-6 te da u kombinaciji s vitaminom C rezultira povećanjem imuniteta i smanjenjem upalnog stresa. Dodatno, posjeduje antibakterijske učinke dokazane na baktericidnom djelovanju na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) smanjujući prisutnost gena primarne virulencije, antifungalne učinke te antiviralne učinke. (33-35)

Primjena u visokim dozama tijekom dugog vremena često uzrokuje pseudoaldosteronizam karakteriziran hipertenzijom, hipokalemijom i drugim štetnim kliničkim učincima. Radi navedenog, provedene su brojne strukturne modifikacije 18 $\beta$ -GK kako bi se mogli primjenjivati kao antitumorska sredstva bez navedenih nuspojava. (36)

### 1.4.2. Stearil gliciretinat

Stearil gliciretinat je ester stearyl alkohola i gliciretinske kiseline sa visoko topljivom strukturom u nekoliko vrsta lipida (Slika 6). U usporedbi s  $18\beta$ -GK, SG se može adsorbirati u lipidni sloj liposoma sa hidrofobnim repom dok izlaže hidrofilni GK dio na površinu. Radi svoje lipofilnosti i antioksidativnih, antimikrobnih i protuupalnih svojstava pretežito se koristi u kozmetičkoj industriji te kao sastojak u pripravcima za liječenje seboreičnog dermatitisa (eng. *facial seborrheic dermatitis*, FSD). SG se prema podacima američke Agencija za hranu i lijekove (FDA) smatra sigurnim za upotrebu u kozmetici te se koristi u 35 vrsta kozmetičkih proizvoda u koncentracijama do 0.1%. (37, 38)



Slika 6. Kemijska struktura stearyl gliciretinata

Preuzeto sa: [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-stearyl-glycyrrhizate\\_fig2\\_326233503](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-stearyl-glycyrrhizate_fig2_326233503)

Izuzev kozmetičke uporabe GA i njegovi derivati, uključujući i SG, mogu se koristiti kao ligandi koji ciljaju jetru. Naime, na membranama jetrenih stanica postoje receptori za GA te se tako GA i njezini derivati mogu upotrijebiti za ciljanje hepatocita. Studija citotoksičnosti *in vitro* dokazala je da SG modifikacija liposoma s norkantaridinom (eng. *norcantharidin (NCTD)-loaded liposomes, LIPs*) pojačava inhibitorne učinke na stanice hepatoblastoma. (39) Unatoč poželjnim karakteristikama, GA i SG pokazuju i neprikladna fizikalno-kemijska svojstva poput izrazito slabe topljivosti u vodi i niske biorasploživosti koja ograničavaju njihovu terapijsku i/ili kozmetičku upotrebu. Kako bi se prevladala ta ograničenja, razvijen je nanotehnološki pristup upotrebe čvrstih lipidnih nanočestica (eng. *solid lipid nanoparticles, SLN*) koji mogu poboljšati biorasploživosti lijekova tijekom vremena. (40) Protutumorski učinak SG još uvijek nije pokazan.

## 2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je usporednom analizom ispitati učinak stearyl gliciretinata i  $18\beta$ -gliciretinske kiseline na vitalnost HCT 116 stanične linije (rak debelog crijeva) te odrediti mehanizam djelovanja učinkovitijeg spoja koristeći test stanične vitalnosti, GOD-POD metodu i Western blot analizu.

Hipoteza navedenog istraživanja je da će SG i  $18\beta$ -GK imati citotoksični učinak na HCT 116 staničnu liniju kroz aktivaciju jedne od vrsta stanične smrti. Također, SG će radi kemijske strukture i lipofilnosti imati veću učinkovitost u nižoj dozi usporedno s  $18\beta$ -GK.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1. Laboratorijski pribor i posude

- 12-titarska pločica za rast (Z707902, TPP, Trasadingen, Švicarska)
- Automatske pipete (0,5-10  $\mu$ L, 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 10-1000  $\mu$ L, 500-5000  $\mu$ L)
- Mikrotitarska ploča s jažicama (Z707791, TPP, Trasadingen, Švicarska)
- Nastavci za pipete
- Neubauer komora za brojanje stanica (Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- Parafilm (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD)
- Pinceta
- Plastična sterilna epruveta s čepom na navoj volumena 50 mL (Eppendorf; Hamburg, Njemačka)
- Plastična pipeta (10 mL)
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Posude 10 cm<sup>2</sup>/25 cm<sup>2</sup>/75 cm<sup>2</sup> (eng. *BioLite Flask, Vented*, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, SAD)
- PVDF membrane (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)
- Stakla za elektroforezu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)
- Watman papiri

##### 3.1.2. Laboratorijski uređaji

- Centrifuga (Hettich Rotina 420R, Hettich Instruments, Beverly, MA, SAD)
- Čitač mikrotitarskih pločica (BioTek Elx808, Winooski, VT, SAD)
- Inkubator za stanice (Smart Biotherm Compact CO<sub>2</sub> Incubator, BioSan; Latvija)
- Invertni mikroskop (OCO-2 255 Halogen, KERN Optics, Balingen-Frommern, Njemačka)
- Laminar (eng. *BIO laminar flow cabin*; Alpina, Poljska)
- Orbitalna tresilica (Heathrow Scientific, VernonHills, IL, SAD)
- Sustav za transfer (eng. *Trans-Blot SD System*; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)

- Ultrazvučna kupelj (eng. *Ultrasonic bath*; Bandelin electronic, Njemačka)
- Uređaj za slikanje membrana (eng. *C-DiGit® Blot Scanner*; LI-COR Corporate, Lincoln, Nebraska, SAD)
- Vertikalni sustav za elektroforezu (1658002FC, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)
- Vodena kupelj (eng. *Lauda Hydro water Bath*; LAUDA technology, Burgwedel, Njemačka)

### 3.1.3. Kemikalije

- 100% etanol (*T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska*)
- 100 mg/L streptomycin, 100000 U/L penicilin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- 18 $\beta$ -gliciretinska kiselina (eng. *18 $\beta$ -glycyrrhetic acid*, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka, CAS: 471-53-4)
- 20% natrijev dodecilsulfat (SDS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- 2 mM L-glutamin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- 5 mM 3-metiladenin, 3-MA (eng. *3-Methyladenine*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD)
- Akrilamid (40%, Carl Roth GmbH, Njemačka)
- Amonijev persulfat (APS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Fetalni goveđi serum, FBS (eng. *fetal bovine serum*)
- Fiziološka otopina s Tris puferom i 1% Tween-20 (TBS-T) (eng. *Tris-buffered saline*, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- Fosfatnim puferom, PBS (eng. *phosphate-buffered saline*)
- Inhibitori proteaza i fosfataza (PhosSTOP, Roche; Basel, Švicarska)
- Kit za određivanje koncentracije proteina (BCA) (eng. *Rapid Gold Kit*; Thermo Scientific Pierce, Waltham, MA, SAD)
- Kit za određivanje stanične vitalnosti (XTT) (#9095 S, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, SAD)
- Laemmlli 2x pufer (BioRad; Hercules, CA, SAD)
- McCoy 5A medij (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemački)

- Metanol (*T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska*)
- Mlijeko u prahu bez masti (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)
- Proteinski marker (Proteintech Group, Rosemont, IL, SAD)
- Pufer za elektroforezu i transfer
- Reagens za slikanje membrana (eng. *SignalFire Elite ECL Reagens*, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, SAD)
- RIPA pufera (eng. radioimmunoprecipitation assay buffer, sc-24.948, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD)
- Stearil gliciretinat (eng. *Stearyl Glycyrretinate*; Selleckchem, SAD) (CAS: 13832-70-7)
- TEMED (tetrametiletilendiamin, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- TBS (eng. *Tris-buffered saline*; Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Tripsin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- Tris-HCl (pH = 8.8 donji gel, pH = 6.8 gornji gel)
- Tween-20 (Amersham Biosciences, Amersham, UK)
- Ultra pure H<sub>2</sub>O
- β-merkaptoetanol (Pierce 2-Mercaptoethanol; Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, SAD)

#### **3.1.4. Stanična linija**

- Stanična linija karcinoma debelog crijeva, HCT 116 (eng. *American Type Culture Collection*, ATCC)

#### **3.1.5. Primarna i sekundarna protutijela**

- PARP (1:500, Cell Signaling Technology; Beverly, MA, SAD)
- LC3 (1:1000, Cell Signaling Technology; Beverly, MA, SAD)
- AMPK (1:500, Cell Signaling Technology; Beverly, MA, SAD)
- p-AMPK (1:1000, Cell Signaling Technology; Beverly, MA, SAD)
- p21 (1:1000, Abcam MA, SAD)
- Rabbit IgG HRP sekundarno protutijelo (1:10000, Abcam, MA, SAD)



## 3.2 METODE

### 3.1 Kultivacija i priprema stanica za tretman

HCT 116 stanice su kultivirane u McCoy 5A mediju uz dodatak streptomicina, penicilina, L-glutamina te 10%-tnog FBS-a unutar posuda veličine 10 cm<sup>2</sup>/25 cm<sup>2</sup>/75 cm<sup>2</sup>. Uvjeti koji su potrebni za kultivaciju postignuti su unutar inkubatora za stanice na 37 °C pri vlažnoj atmosferi i 5% CO<sub>2</sub>. Kako bi se stanice mogle tretirati, potrebno ih je u sterilnim uvjetima unutar laminarnog kabineta iz posuda prebaciti na 96-well ploče ili petrijeve ploče. Prvo se iz flask-a odstranjuje medij koji je prisutan te se dodaje 10 mL sterilnog PBS-a za ispiranje koji se zatim također odstranjuje. Nakon toga dodaje se 1-2 mL tripsina te se stanice stavljaju u inkubator na pet minuta kako bi se podigle s dna posude. Na kraju se dodaje medij u čijem je prisustvu djelovanje tripsina inhibirano te se stanice s medijem prebacuju u epruvetu volumena 50 mL i stavljaju u centrifugu na 1500 rpm 5 minuta. Nakon postupka centrifugiranja supernatant se dekantira, a stanicama koje se nalaze istaložene na dnu epruvete dodaje se 20 mL novog medija. Zatim se korištenjem Neubauerove komore za brojanje stanica i invertnog mikroskopa određuje koncentracija stanica po mL te se razrjeđuje do potrebne koncentracije od 1x10<sup>5</sup> stanica po mL. Stanice su u navedenoj koncentraciji i volumenu od 200 µL nasađene po principu duplikata na mikrotitarsku (96 well) ploču s jažicama ili petrijeve ploče te inkubirane 24 sata ili do zadovoljavajuće potpunosti. Svi pokusi ponovljeni su tri puta u triplikatu.

### 3.2 Tretman stanica i test stanične vitalnosti

Stanice su tijekom 24-satne inkubacije postignule 80% konfluenciju nakon čega je medij odstranjen te je na stanice koje predstavljaju kontrolu dodan novi medij, a u ostale je dodan medij i tretman. Za tretman SG-om korištene su koncentracije do 100 µM, a za tretman 18β – gliciretinatom koncentracije do 250 µM. SG je prethodno otopljen u dimetilsulfoksidu (DMSO), mediju i etanolu, a 18β–GK u dimetilsulfoksidu (DMSO) i mediju s Tween-20 kako bi se postigle koncentracije određene za tretmane. Dodatno, inhibitor autofagije (3-MA, eng. *3-Methyladenine*) prema podatkovnoj tablici korišten je u preporučenoj dozi od 5 mM. Konačne koncentracije DMSO-a nisu prelazile 0,5%, a konačne koncentracije tweena 20 i etanola nisu prelazile 0,05%. Stanice su tretmanu izložene u vremenskom periodu od 24 sata.

Nakon navedenog vremenskog perioda određena je stanična vitalnost i IC<sub>50</sub> (inhibitorna koncentracija za 50% stanica) SG-a i 18β-GK pomoću XTT testa i čitača mikrotitarskih pločica. XTT test se bazira na mjerenju stanične metaboličke aktivnosti kao pokazatelja stanične vitalnosti prema principu redukcije žute tetrazolijeve soli u narančastu formazan boju putem mitohondrijskih dehidrogenaza u HCT 116 stanicama. XTT otopina sastoji se od reagensa za spajanje elektrona i XTT reagensa koji se miješaju u omjeru 1:50. Tako pripremljena otopina nanosi se na tretirane stanice u jažicama mikrotitarske ploče nakon 24 sata u volumenu od 50 μL na 200 μL medija. Također, otopina se nanosi i na jažice koje sadrže samo medij te predstavljaju slijepu probu. Mikrotitarska pločica je potom stavljena u inkubator za stanice u periodu od sat vremena. Kako bi se rezultati XTT testa mogli kvantitativno obraditi tretirane stanice se nakon sat vremena stavljaju u čitač mikrotitarskih pločica koji uz inkubaciju na 37 °C mjeri apsorbanciju uzorka na zadanoj valnoj duljini od 450 nm. Čitanja su izvedena tri puta svakih sat vremena nakon nanošenja XTT otopine uz međuvremenu inkubaciju. IC<sub>50</sub> vrijednosti izračunate su aproksimacijom linearnog dijela krivulje te linearnom regresijom. Dobiveni podaci potom su statistički obrađeni u programima Microsoft Excel te TIBCO Statistica.

### 3.4 Izolacija proteina

Stanice su pomoću Neubauer komore za brojanje stanica razrijeđene do koncentracije  $3 \times 10^5$  stanica po mL te su nasađene unutar Petrijeve zdjelice u 15 mL McCoy 5A medija uz dodatak L-glutamina, streptomicina, penicilina i FBS-a. Potom su inkubirane u vremenskom periodu od 24 sata kako bi, kao i kod testa stanične vitalnosti, dostigle konfluenciju od 80%. Stanice su zatim u 24-satnom periodu izložene koncentracijama SG-a koje ne uzrokuju pad vitalnosti veću od 50%.

Nakon tretmana stanice su zajedno s medijem metodom „grebanja“ (eng. *scraping*) pomoću strugača (eng. *cell scraper*) s dna Petrijeve zdjelice prikupljene u zasebne epruvete volumena 50 mL ovisno o tretmanu i koncentracijama. Dodatno, zdjelice su dva puta isprane sa 5 mL PBS-a uz grebanje kako bi se prikupile preostale stanice. Za kontrolu, svaku pojedinu koncentraciju i spoj je prikupljeno 25 mL otopine koja je zatim centrifugirana na 1500 rpm (revolucija po minuti) 5 minuta. Supernatant je dekantiran, a stanični pelet resuspendiran u 1 mL PBS-a te potom prebačen u epruvete volumena 1,5 mL. Epruvete su ponovo stavljene u centrifugu na 3200 rpm 6 minuta pri temperaturi 4 °C. Supernatant je ponovo dekantiran, a

preostali stanični peleti su resuspendirani u 200  $\mu\text{L}$  RIPA pufera uz inhibitore proteaza i fosfataza. Uzorci su postavljeni na led i tresilicu u vremenskom periodu od sat vremena. Stanice su potom centrifugirane na 1500 rpm sat vremena pri 4  $^{\circ}\text{C}$ . Supernatant, to jest proteinski lizat prebacuje se u prethodno ohlađene epruvete volumena 1,5 mL.

### 3.5 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je koristeći *Rapid Gold BCA Protein Assay Kit* koja koristi isti princip kao BCA metoda (engl. *bicinchoninic acid assay*) koja se temelji na biuret reakciji, to jest redukciji bakrovih  $\text{Cu}^{2+}$  iona do  $\text{Cu}^{+}$  iona u alkalnom mediju. Za razliku od standardne BCA metode, *Rapid Gold BCA Protein Assay Kit* je optimizirana za brzu izvedbu na sobnoj temperaturi i daje rezultat unutar 5 minuta. Princip ove metode je da u prvom dijelu reakcije dolazi do stvaranja kelatnog kompleksa proteina s tri ili više aminokiselinska ostatka i bakrovih iona. Potom dvije molekule bicinoninske kiseline (BCA), vrlo osjetljivog i selektivnog kolorimetrijskog reagensa za detekciju, keliraju sa reduciranim ionom bakra stvarajući BCA-bakrov ion kompleks koji daje intenzivno narančasto-zlatno obojenje. Prateći protokol metode, dobiveni lizati proteina nanose se na 96-well pločicu u duplikatu i volumenu 2,5  $\mu\text{L}$ . Potom se uzorcima dodaje 22,5  $\mu\text{L}$  PBS-a dok je slijepu probu predstavljalo 25  $\mu\text{L}$  čistog PBS-a. BCA reagensi A i B, pomiješani u omjeru 50:1, dodani su u uzorcima i slijepoj probi u volumenu 200  $\mu\text{L}$ . Potom je pločica inkubirana na sobnoj temperaturi 5 minuta. Pomoću čitača mikrotitarskih pločica spektrofotometrijski se na 490 nm očitala apsorbancija uzoraka te su prema baždarnom pravcu dobivene koncentracije proteina koje su izjednačene na istu vrijednost.

### 3.6 Western blot analiza

Kako bi odredili prisutnost i izražaj proteina u uzorcima korištena je Western blot analiza. Za navedeno, potrebno je pripremiti poliakrilamidne gelove za SDS-PAGE elektroforezu. Ovisno o veličini proteina koji se htio dokazati korišteni su gelovi u različitim postocima: 8%, 10%, 12.5% i gradijentni gelovi. Gelovi su pripremljeni miješanjem Tris-HCl (pH = 8.8 za donji gel, pH = 6.8 za gornji gel), akrilamida, 20% natrijevog dodecilsulfata (SDS), amonijevog persulfata (APS) i TEMED-a (tetrametiletildiamin) u različitim volumenima ovisno o postotku gela. Sljedeće, u prethodno tretirane i izolirane uzorke je dodan Laemmli 2x pufer i

$\beta$ -merkaptoetanol u omjeru 1:1. Uzorci su potom promiješani na vorteksu, stavljeni u vodenu kupelj na 95 °C u period od 5 minuta te ponovo promiješani i centrifugirani. Sada pripremljeni uzorci su, uz proteinski marker, nanenesi na gelove u kadici za elektroforezu koja je izvođena na 120-180 V u trajanju od 180 minuta pri hladnim uvjetima. Nakon završene elektroforeze, gelovi su transferirani na PVDF membrane pomoću Trans blot sustava za transfer. Korišten je poseban transfer pufer koji sadrži određeni volumen metanola ovisno o tome koji postotak gela se koristio. Polusuh transfer je izveden pri 17 V u periodu od 45 minuta. Potom su membrane blokirane pomoću mlijeka u prahu bez masti otopljenog u TBS-T-u tijekom sat vremena na orbitalnoj tresilici. Mlijeko se sa membrana ispiralo tri puta u periodu od deset minuta za svako ispiranje te su potom na membrane stavljena željena primarna protutijela tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi te su ponovo isprane tri puta u periodu od deset minuta. Korištena primarna protutijela su: PARP, LC3, AMPK, p-AMPK i p21. Nakon toga membrane su inkubirane odgovarajućim HRP-konjugiranim Rabbit IgG sekundarnim protutijelom u periodu od sat vremena te isprane tri puta u periodu od deset minuta i pripremljene za slikanje. Membrane su slikane pomoću C-Digit uređaja za slikanje membrana. Kemiluminiscentni signal formiranog kompleksa protein-protutijelo detektirao se nanošenjem SignalFire Elite reagensa. Također, prema vidljivom markeru na membrani označuju se pozicije između kojih se očekuje signal s obzirom na naneseo protutijelo za provjeru mase proteina koji se detektira.

### **3.7. Određivanje koncentracije glukoze GOD-POD metodom**

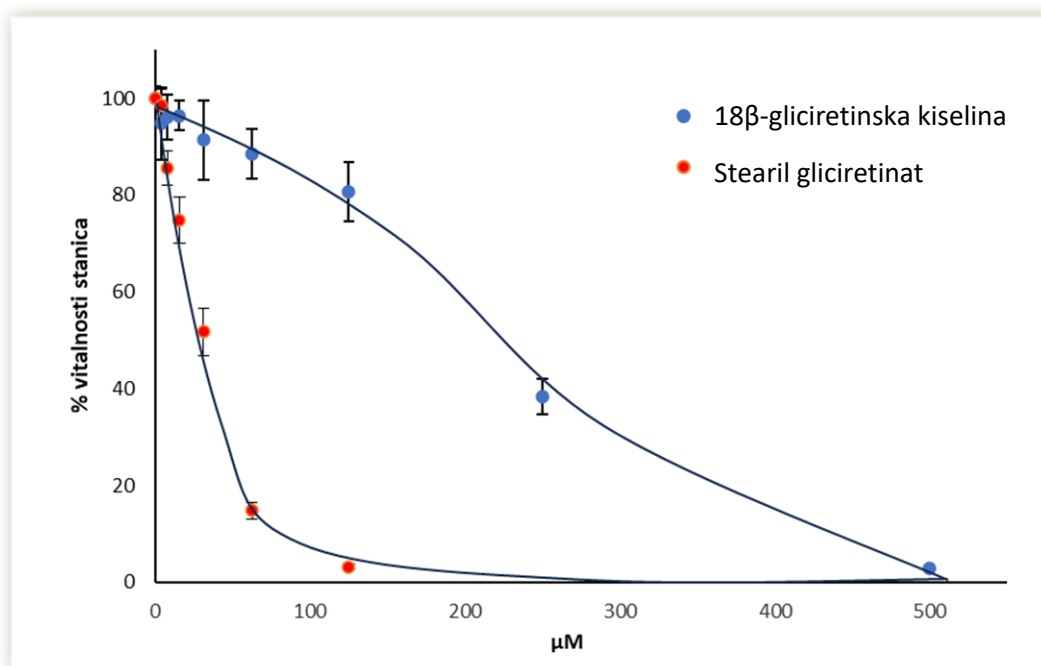
Nakon tretmana, a prije izolacije proteina, određena je koncentracija glukoze u mediju pomoću GOD-POD metode, to jest Trinder reakcije. Metoda se temelji na oksidaciji glukoze uz pomoć glukoza oksidaze (GOD) na glukonsku kiselinu i vodikov peroksid  $H_2O_2$ . Katalitičko djelovanje peroksidaze (POD) na nastali  $H_2O_2$ , uz prisustvo 4-aminoantipirina i fenola, rezultira formiranjem crvenog kolorimetrijskog indikatora kinonimina. Intenzitet nastale crvene boje proporcionalan je koncentraciji glukoze te se određuje spektrofotometrijski mjerenjem pri valnoj duljini od 500 nm. Za potrebe određivanja glukoze nakon 24-satnog tretmana iz Petrijeve zdjelice je izdvojeno 2 mL medija i prebačeno u zasebne epice s obzirom na korištene koncentracije. Potom je 10  $\mu$ L medija stavljeno u kivete uz 1000  $\mu$ L pripadajućeg reagensa koji sadrži fosfatni pufer, 4-aminoantipirin, fenol, glukoza oksidazu i peroksidazu. Kao slijepa proba korištena je destilirana voda i reagens, a kao standard čisti medij i reagens. Potom je za sve

pripremljene kivete mjerena apsorbancija pri 500 nm te su rezultati statistički obrađeni u programima Microsoft Excel te TIBCO Statistica.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Utjecaj stearyl gliciretinata i 18 $\beta$ -gliciretinske kiseline na staničnu vitalnost HCT 116 stanične linije

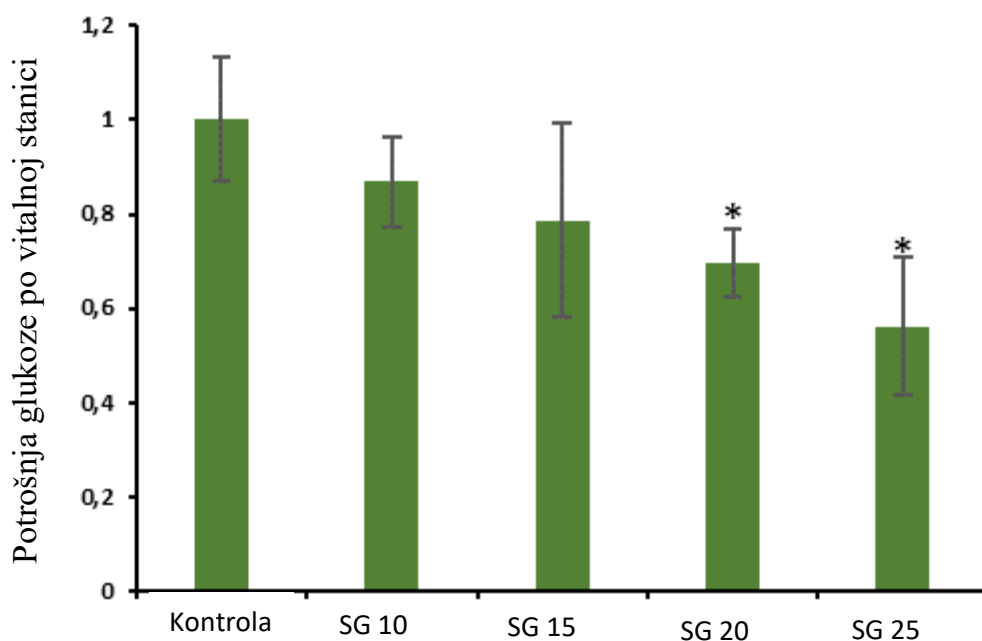
Koristeći XTT test određen je utjecaj SG-a i 18 $\beta$ -GK na staničnu vitalnost HCT116 stanične linije nakon 24-satnog tretmana (Grafikon 1). U oba slučaja došlo je do smanjenja stanične vitalnosti povećanjem doze tretmana te je određena IC<sub>50</sub> vrijednost koja za SG iznosi 35,28  $\mu$ M, a za 18 $\beta$ -GK 245,08  $\mu$ M. Za postizanje IC<sub>50</sub> vrijednost kod SG bile su potrebne manje doze što posljedično prikazuje veću učinkovitost samog spoja te se radi toga daljnje istraživanje nastavilo samo sa SG. U daljnjim analizama prema pravilima za dobar rad sa stanicama su korištene koncentracije gdje je vitalnost stanica veća od 60% te su odabrane doze 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M i 25  $\mu$ M. Za koncentraciju 10  $\mu$ M stanična vitalnost iznosi 85%, za koncentraciju 15  $\mu$ M iznosi 78% te za preostale dvije koncentracije stanična vitalnost iznosi 71% i 64%.



Grafikon 1. Utjecaj stearyl gliciretinata i 18 $\beta$ -gliciretinske kiseline na staničnu vitalnost HCT116 nakon 24-satnog tretmana. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

#### 4.2. Koncentracije glukoze nakon 24-satnog tretmana sa stearyl gliciretinatom

Glukoza je usko povezana sa preživljavanjem stanica raka igrajući vitalnu ulogu u njihovoj proliferaciji i razvoju. Upravo zato je mjerenje koncentracije glukoze u mediju nakon provedenog tretmana još jedna od primijenjenih metoda za prikazivanje učinka SG-a na stanice raka debelog crijeva. Tretiranje stanica sa stearyl gliciretinatom je umanjio mogućnost iskorištavanja glukoze u ovisnosti o primijenjenoj dozi (Grafikon 2). Najveća iskoristivost glukoze pokazana je u kontrolnom uzorku gdje stanice nisu bile izložene tretmanu. Potrošnja glukoze se smanjuje primjenom SG-a, ovisno o dozi. Rezultati su prikazani kao potrošnja glukoze po vitalnoj stanici prema XTT testu za pojedinu dozu. Statistički najznačajniji učinak uočen je kod posljednje dvije doze 20  $\mu\text{M}$  i 25  $\mu\text{M}$  što je prikazano i na grafikonu u nastavku.



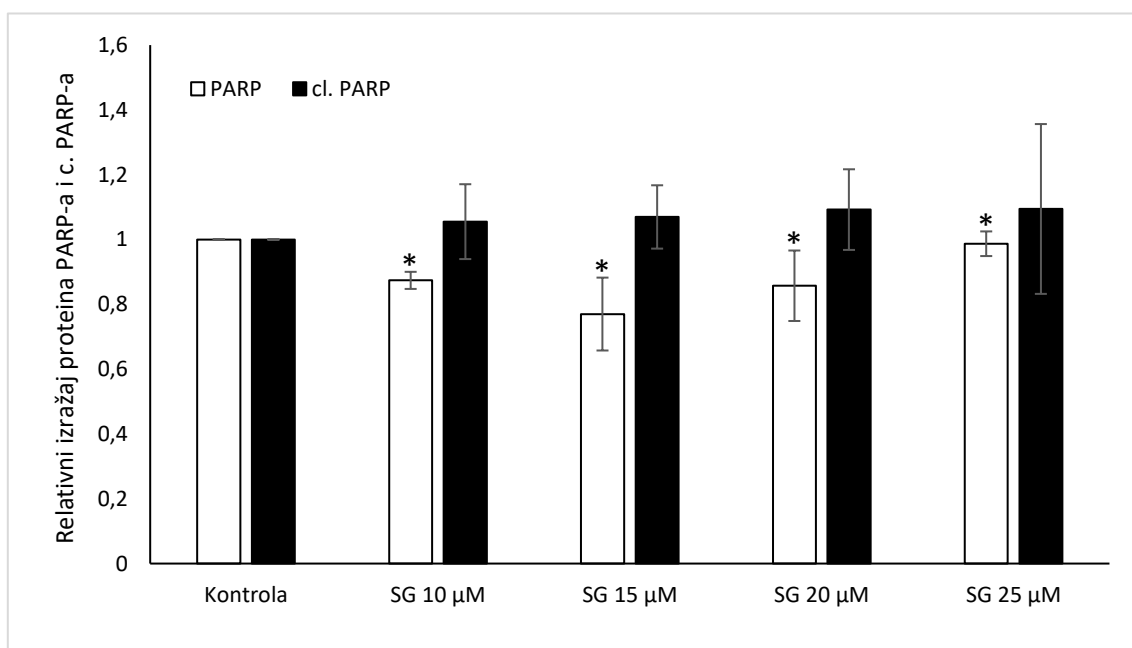
Grafikon 2. **Iskoristivost glukoze nakon 24-satnog tretmana s obzirom na dozu.** Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Oznaka \* označava statističku značajnu razliku između tretmana i kontrole.

### 4.3. Utjecaj tretmana stearil gliciretinatom na promjenu izražaja proteina apoptoze

#### 4.3.1. PARP

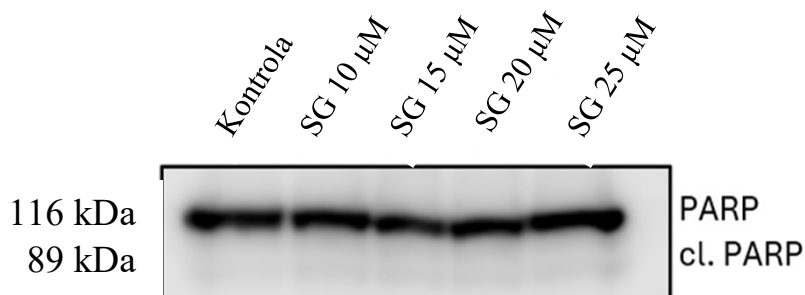
Utjecaj SG-a na aktivaciju procesa apoptoze u HCT 116 staničnoj liniji istražen je provodeći Western blot analizu i određivanjem relativnog izražaja PARP-a, markera apoptoze.

PARP, poli (ADP-riboza) polimeraza, je obitelj proteina uključenih u brojne stanične procese kao što su popravak DNK, genomska stabilnost i programirana stanična smrt. Prilikom aktivacije apoptoze, kaspaze cijepaju PARP (Slika 7). Time nastaje jedan fragment veličine 89 kDa koji nakon cijepanja nema mogućnost vezanja za DNK te drugi fragment veličine 24 kDa koji ostaje nepovratno vezan za DNK. Nepovratno vezanje za DNK onemogućava djelovanje PARP-a, to jest popravak oštećenih dijelova DNK. Kod svih primjenjivanih doza uočena je statistički značajna promjena u izražaju necijepanog PARP-a s obzirom na kontrolu (smanjenje izražaja oko 20%) (Grafikon 3). Izražaj količine cijepanog PARP-a, markera apoptoze, nije se značajno mijenjao u usporedbi s kontrolom. Usporedba cijepanja PARP-a s XTT analizom ukazuje na neki drugi oblik stanične smrti.



Grafikon 3. **Relativni izražaj PARP-a i cijepanog PARP-a u HCT116 staničnoj liniji nakon 24-satnog tretmana sa stearil gliciretinatom.** Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, a oznaka \* označava statistički značajnu razliku između grupa kontrole i tretmana.





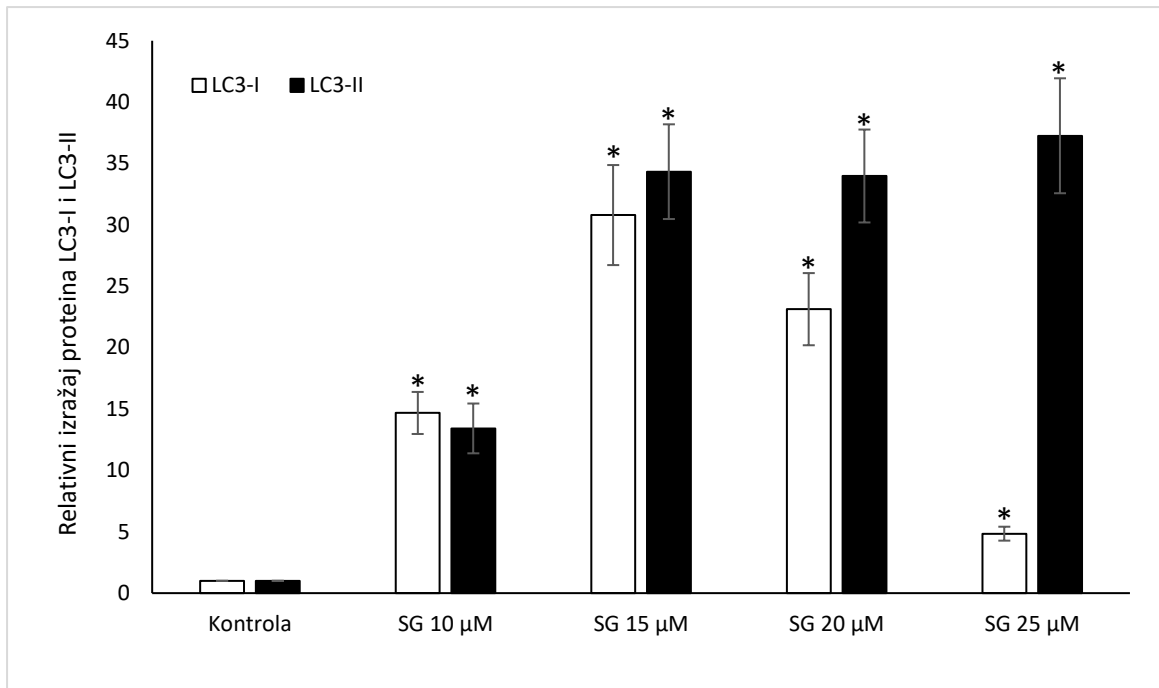
Slika 7. Imunoblot prikaz izražaja PARP-a i cijepanog PARP-a. Korišteno je primarno protutijelo na PARP i HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo.

#### 4.4. Utjecaj tretmana stearil gliciretinatom na promjenu izražaja proteina autofagije i staničnog ciklusa

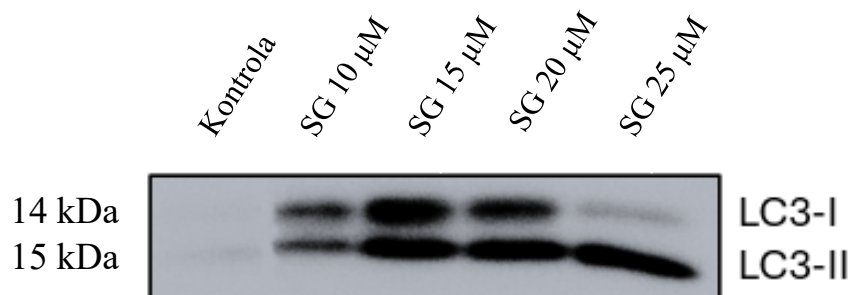
Utjecaj SG-a na aktivaciju procesa autofagije u HCT 116 staničnoj liniji istražen je provodeći Western blot analizu i određivanjem relativnog izražaja sljedećih proteina: LC3, AMPK, p-AMPK i p21.

##### 4.4.1. LC3

Imunoblot analizom LC3 protein se očitava izražajem njegova dva oblika LC3-I i LC3-II (Slika 8). U slučaju aktiviranog procesa autofagije LC3-I protein prelazi u LC3-II oblik koji se nalazi na membrani autofagosoma te je izražaj LC3-II oblika veći u odnosu na LC3-I. Upravo takav izražaj je dobiven nakon tretmana sa SG-om. Izražaj proteina LC3-I i LC3-II statistički se značajno mijenja ovisno o primijenjenoj dozi SG-a. LC3-II, marker autofagije povišen je u svim primjenjivanim dozama u usporedbi s kontrolom. LC3-I također je povišen u svim skupinama tretiranim SG-om, s najvećim izražajem u dozi 15 µM, te padom u višim dozama ukazujući na proces aktivacije autofagije (Grafikon 4).



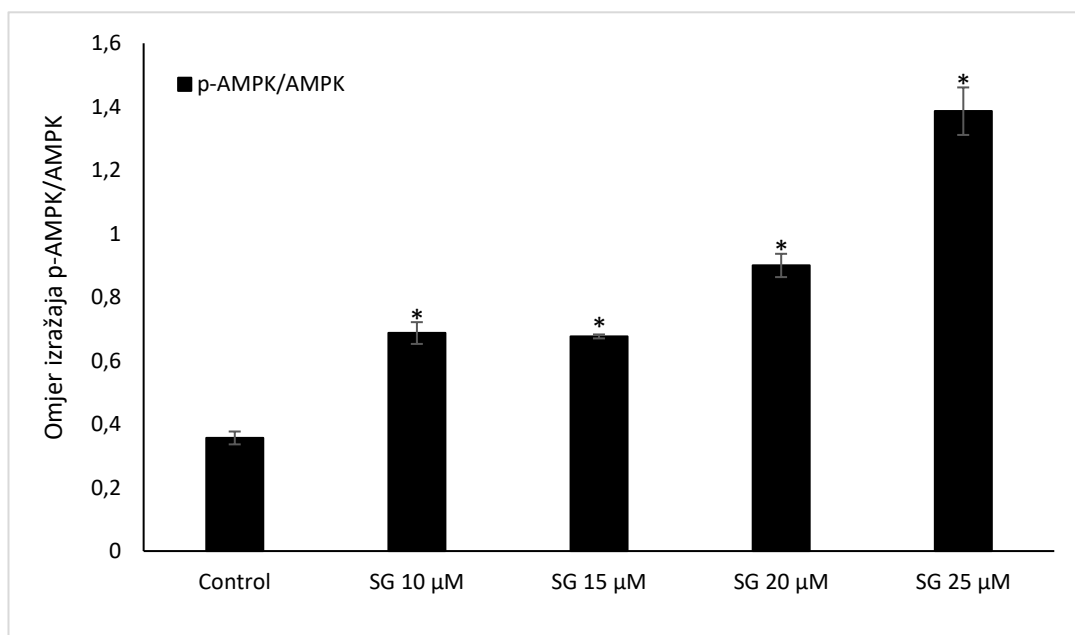
Grafikon 4. **Relativni izražaj LC3-I i LC3-II u HCT116 staničnoj liniji nakon 24-satnog tretmana sa stearyl gliciretinatom.** Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, a oznaka \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana.



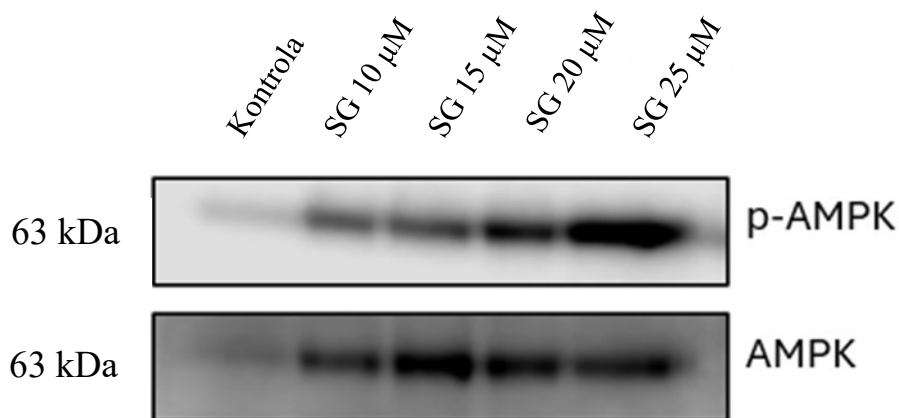
Slika 8. **Imunoblot prikaz izražaja LC3-I i LC3-II.** Korišteno je primarno protutijelo na LC3 i HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo.

#### 4.4.2. AMPK

Pri niskim razinama energije stanice snižene su razine ATP-a u stanici te posljedično tome povećan je omjer AMP/ATP. Radi navedenih uvjeta dolazi do fosforilacije AMPK u njegov aktivni oblik p-AMPK koji potom pokreće proces autofagije. Kod svih tretmana koncentracija SG-a bila je dovoljna da izazove aktivaciju AMPK i pokrene proces autofagije prikazan gore izražajem LC3-I/II. Najveći omjer p-AMPK/AMPK prisutan je kod doze SG od 25  $\mu\text{M}$  ukazujući na snižavanje razina ATP-a u stanicama (Grafikon 5).



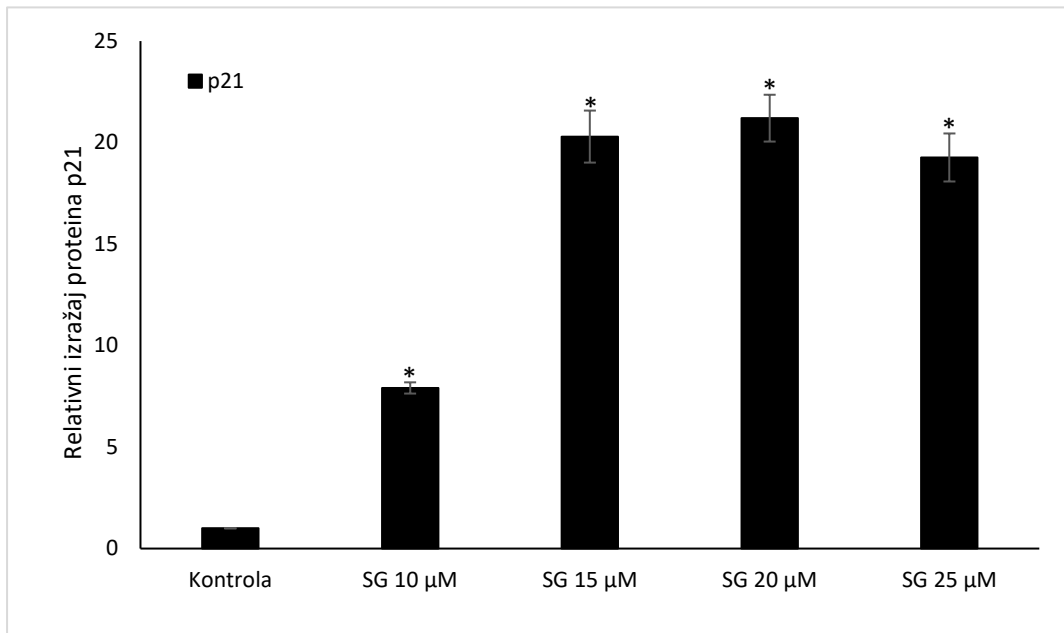
Grafikon 5. **Relativni izražaj p-AMPK i AMPK u HCT 116 staničnoj liniji nakon 24-satnog tretmana sa stearyl gliciretinatom.** Navedene vrijednosti su izražene omjerom p-AMPK/AMPK u obliku srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, a oznaka \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana.



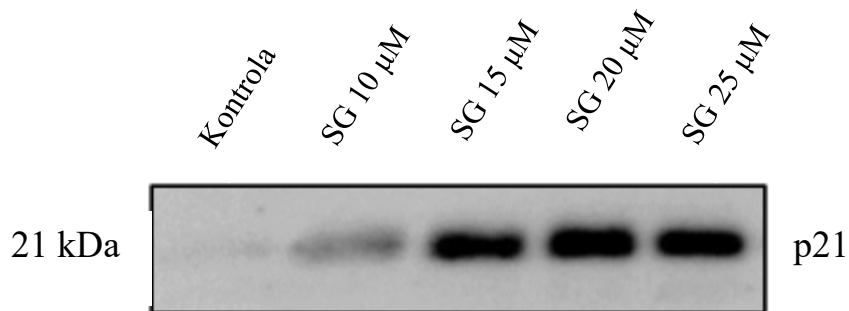
Slika 9. **Imunoblot prikaz izražaja p-AMPK i AMPK.** Korišteno je primarno protutijelo na oba proteina i HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo.

#### 4.4.3. p21

Glavni posrednik tumor supresorskog gena p53, p21, ima smanjeni izražaj kod stanica raka. Nakon 24-satnog tretmana SG-om izražaj p21 značajno se promijenio u svim ispitivanim dozama što nam ukazuje na sposobnost SG-a da povećanjem izražaja p21 doprinosi inhibiciji napredovanja staničnog ciklusa te rezultira suzbijanjem proliferacije stanica raka debelog crijeva (Grafikon 6). Sposobnost SG-a da regulira p21 ukazuje na antiproliferacijski učinak na stanice raka debelog crijeva.



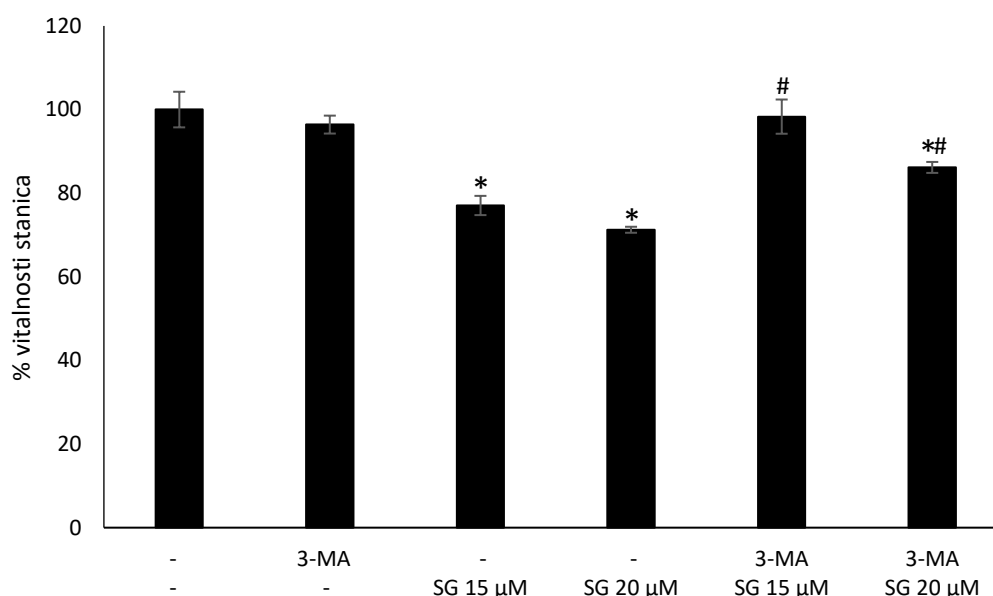
Grafikon 6. **Relativni izražaj p21 u HCT116 staničnoj liniji nakon 24-satnog tretmana sa stearyl gliciretinatom.** Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, a oznaka \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana.



Slika 10. **Imunoblot prikaz izražaja p21.** Korišteno je primarno protutijelo na oba proteina i HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo.

#### 4.5. Inhibicija autofagije

Kako bi pokazali da li je autofagija aktivirana SG-om citotoksična ili citoprotektivna, koristili smo 3-MA koji inhibira stvaranje autofagosoma inhibirajući djelovanje fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K). PI3K igraju važnu ulogu u kontroli aktivacije mTOR-a, ključnog regulatora autofagije te sukladno s time primjenom 3-MA inhibira se autofagija. Prema grafikonu 7 vidljivo je da se vitalnost stanica smanjila u skupinama SG 15  $\mu$ M i SG 20  $\mu$ M uslijed tretmana sa SG-om koji aktivira proces autofagije. U slijedeće dvije skupine stanice su tretirane sa SG-om uz dodatak inhibitora autofagije, 3-MA. U navedenim skupinama primjećuje se statistički značajno veći postotak vitalnosti stanica pošto je 3-MA svojim djelovanjem inhibirao aktivaciju autofagije. Primjenom 3-MA dokazalo se da SG doista aktivira citotoksičnu autofagiju pošto se u slučaju primjene inhibitora vitalnost stanica povećala.



Grafikon 7. Prikaz vitalnosti stanica nakon primjene inhibitora autofagije 3-MA.

Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Oznaka

\* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana, a oznaka # između tretmana te 3-MA i tretmana.

## 5. RASPRAVA

Rak debelog crijeva je najčešće dijagnosticiran među ukupnim brojem karcinoma u Republici Hrvatskoj te predstavlja drugi najčešći uzrok smrti od raka. Kirurška resekcija u kombinaciji s kemoterapijom ili radioterapijom trenutno je primarna terapija za karcinom kolona. Povećana incidencija karcinom kako kod starije tako i kod mlađe populacije pobudila je interes za novim pristupima liječenja. Tradicionalni kemoterapeutici nemaju mogućnost selektivnog djelovanja uzrokujući istovremeno oštećenje zdravih stanica prilikom njihove primjere. Pojava remisija i brojnih nuspojava prilikom njihove primjene potaknula je znanstveni svijet za otkrivanjem novih kombiniranih pristupa liječenja među kojima su fitokemikalije i njihovi derivati koji se uz terapijsku primjenu mogu koristiti i kao preventivna sredstva. Trenutni kombinirani kemoterapijski režim baziran je na primjeni irinotekana uz 5-fluorouracil i leucovorin još poznat i kao FOLFIRI. Ovisno o stadiju karcinom također se primjenjuje kombinacija irinotekana, oksaliplatina i 5-FU-a (FOLFOXIRI) ili irinotekan u kombinaciji s kapecitabinom (XELIRI). Istraživanje koje je promatralo terapijski učinak baziran na irinotekanu u kombinaciji sa biljnim lijekovima kao komplementare i alternativne terapije pokazali su vrhunske performanse u poboljšanju pacijenata. (41) Kemijski sastav biljnih lijekova je složen, a daljnja istraživanja trebala bi se usredotočiti na karakterizaciju bioaktivnih spojeva s terapijskim učincima i njihove mehanizme djelovanja.

U ovom radu istražena su djelovanja  $18\beta$ -gliciretinske kiseline i njezinog estera, stearyl gliciretinata, kao derivata glicirizinske kiseline, glavne aktivne komponente biljke sladić. Učinak  $18\beta$ -GK i SG-a na HCT 116 staničnu liniju dokazan je koristeći XTT test, Western blot analizu, GOD-POD metodu te inhibitor autofagije 3-MA. Nakon provedenog XTT testa dokazana je bolja učinkovitost SG-a u odnosu na  $18\beta$ -GK jer se primjenom manjih doza postigao bolji učinak na vitalnost HCT 116 stanica, to jest pri manjim dozama je postignuta  $IC_{50}$ . Radi toga daljnje istraživanje molekularnih mehanizama djelovanja na stanice raka debelog crijeva nastavljeno je samo sa SG-om. Nakon provedenog tretmana, spektrofotometrijski je ispitana potrošnja glukoze. Opsežne studije potvrdile su da je metaboličko reprogramiranje glukoze, koje igra vitalnu ulogu u proliferaciji, invaziji i metastazama stanica raka, usko povezano s preživljavanjem stanica raka. (42) Rezultati ovog istraživanja prikazuju smanjenje potrošnje glukoze povećanjem doze te ukazuju na djelovanje SG-a na način da ometa metabolizam glukoze u stanicama raka. Kako bi se uvidio molekularni mehanizam putem kojeg SG djeluje na stanice raka, aktivira li kod stanica procese apoptoze,

autofagije, inhibicije staničnog ciklusa ili neki drugi, provedena je Western blot analiza na ciljanim proteinima.

Protein PARP ima dobro istraženu ulogu u popravku ekscizije baze; to je jedan od primarnih mehanizama popravka oštećenja DNA uzrokovanih endogenim procesima, kao i onih uzrokovanih egzogenom izloženosti kemikalijama i zračenjem. U trenutnom istraživanju pokazano je kako SG ovisno o primjenjenoj dozi inhibira izražaj necijepanog PARP-a oko 20%. Istraživanja su dokazala da PARP inhibitori pojačavaju učinke različitih kemoterapija. Postoji niz inhibitora koji se koriste za proučavanje izražaja PARP-a kao što su endogeni purini (hipoksantin i inozin) ili egzogene molekule poput derivata kofeina i derivata tetraciklina. PARP inhibitori pokazali su učinkovitost kod karcinoma dojke povezanog s BRCA mutacijom. BRCA1 i BRCA2 su proteini važni za popravak dvolančanih DNA prekida homolognim rekombinacijskim popravkom. Kada je gen za jedan od ovih proteina mutiran, promjena može dovesti do pogrešaka u popravku DNA koje na kraju mogu uzrokovati karcinom. Lijekovi koji inhibiraju PARP uzrokuju stvaranje višestrukih dvostrukih prekida, a kod karcinoma s mutacijama BRCA1 i BRCA2 ovi dvostruki prekidi ne mogu se učinkovito popraviti, što dovodi do smrti stanica. Normalne stanice koje ne repliciraju svoju DNK tako često kao stanice raka i kojima nedostaje mutirani BRCA1 ili BRCA2 još uvijek imaju homologni popravak, što im omogućuje da prežive inhibiciju PARP-a. (43)

Glavno obilježje apoptoze je proteolitičko cijepanje i inaktivacija PARP-a u fazi izvršenja stanične smrti. Tijekom apoptoze kaspaze cijepaju PARP na fragment koji više nema mogućnost vezanja za DNK (89 kDa) i fragment koji nepovratno ostaje vezan na DNK (24 kDa) čime onemogućava djelovanje PARP-a i popravak DNK. (44) Western blot analizom u ovom istraživanju pokazano je da izražaj cijepanog PARP-a nije statistički značajno različit u usporedbi s kontrolom što nam ukazuje da stanice nisu aktivirale apoptozu u tretmanu SG-om. Također, izostankom aktivacije apoptoze i provedenim XTT testom zaključujemo da se radi o drugom obliku stanične smrti.

Autofagija igra dinamičnu ulogu u karcinomima pokazujući i anti-karcinogene i pro-karcinogene učinke ovisno o različitim čimbenicima, uključujući stadij tumora i tkivo podrijetla. Autofagija može suzbiti onkogenezu uklanjanjem oštećenih organela u transformiranim stanicama i zaštititi ih od oksidacijskog stresa, što rezultira naknadnom stabilizacijom genoma i prevencijom maligne transformacije. No također, autofagija može izazvati prilagodbu stanica raka na stanični stres induciran primjernom kemoterapije što im omogućuje stjecanje otpornosti na kemoterapeutike. (45) Pojedina istraživanja pokazuju da



autofagija djeluje kao mehanizam suzbijanja razvoja tumora smanjenjem oštećenih staničnih dijelova i proteina te održavanjem stanične homeostaze. Anti-karcinogeno djelovanje autofagije uočeno je kod karcinoma dojke, debelog crijeva, prostate i jajnika. (46-49) Međutim, nekoliko studija pokazuje da autofagija djeluje na promicanje preživljavanja karcinoma i rasta uznapredovalih karcinoma. Autofagija doprinosi preživljavanju tumorskih stanica povećavajući toleranciju na stres i opskrbljujući ih hranjivim tvarima kako bi se zadovoljili metabolički zahtjevi tumora. Ovakvo djelovanje autofagije uočeno je kod specifičnih oblika karcinoma pluća i gušterače. (50, 51)

U ovom istraživanju Western blot analizom ispitali su se proteini koji igraju ključnu ulogu u aktivaciji i procesu autofagije. LC3 protein je osnovna komponenta unutarnje i vanjske membrane autofagosoma radi čega se koristi kao prikladan marker za proces autofagije. Također, izražaj LC3 u stanicama raka može služiti kao prognostički marker za preživljavanje pacijenata s KRK-om. Wu i sur. istraživanjem su pokazali da visoki izražaj LC3 može djelovati kao supresor karcinoma i biti pozitivno povezan s dugoročnim preživljenjem pacijenata s KRK-om. Naime, provedeno je praćenje 202 bolesnika s KRK-om te se Kaplan-Meierova analizom utvrdilo da je LC3 prognostički parametar gdje su petogodišnje stope preživljavanja bolesnika s pozitivnim izražajem LC3 iznosile 64,3%, odnosno 32,1% s negativnim izražajem LC3. (52) Međutim, prema pojedinim istraživanjima prekomjerni izražaj LC3 bio je u korelaciji s lošom prognozom pacijenata s karcinomima dojke (53) i jajnika (54). Primjena SG-a na HCT 116 dovela je do povećanog izražaja LC3-II proteina koji se nalazi na membrani autofagosoma prema čemu znamo da je SG u stanicama raka inducirao autofagiju.

U regulaciji procesa autofagije sudjeluje i AMPK koji je također bio dio Western blot analize ovog rada. AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK) je senzor stanične energije koji se može aktivirati dodavanjem fosfatne skupine kao posljedice metaboličkog stresa koji iscrpljuje ATP i tako povećava omjer AMP/ATP. Povišeni izražaj p-AMPK dovodi do inhibiranja mTOR puta, čija je uloga inhibicija procesa autofagije, to jest pokreće proces autofagije. Upravo je povišeni izražaj rezultat koji je dobiven tijekom provođenja istraživanja čime je dodatno potvrđeno da su HCT 116 stanice ušle u proces autofagije. No, prema dostupnim podacima, primijećeno je da AMPK, kao i LC3, može igrati dvostruku ulogu tijekom karcinogeneze, ovisno o kontekstu. U određenim uvjetima i u određenom stadiju karcinogeneze AMPK može igrati ulogu u sprječavanju nastanka tumora. (55) Međutim, sve više dokaza ukazuje na to da je AMPK vjerojatno važniji za preživljavanje stanica raka i matičnih stanica raka reprogramiranjem njihovog metabolizma kako bi se prilagodili njihovoj nekontroliranoj prirodi i bolje se nosili s

unutarnjim i vanjskim metaboličkim stresom. AMPK može imati pro-karcinogene učinke uključivanjem alternativnih metaboličkih putova uključujući mitofagiju i oksidaciju masnih kiselina. (56)

Dodatno, Western blot analizom ispitan je izražaj proteina koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, p21. Gubitak izražaja p21 potiče genomsku nestabilnost, čime se povećava vjerojatnost razvoja karcinoma. Osim toga, povećanje izražaja p21 doprinosi inhibiciji napredovanja staničnog ciklusa, što rezultira suzbijanjem rasta stanica karcinoma debelog crijeva. Jedno od istraživanja dokazalo je sposobnost katehina da inhibira rast SW480 stanične linije karcinoma debelog crijeva na temelju indukcije izražaja p21, što je potvrđeno i u drugim staničnim linijama kolorektalnog karcinoma. (57, 58) Paralelno sa spomenutim istraživanjem, primjena SG-a na HCT 116 staničnu liniju uzrokovala je povećani izražaja p21 proteina te posljedično inhibiciju proliferacije stanica. S obzirom na važne uloge u regulaciji staničnog ciklusa i putovima popravka DNK, ciljanje izražaja p21 predstavlja jednu od mogućih opcija u terapiji karcinoma.

Jedan od načina kojim se može ispitati je li autofagija inducirana tretmanom protektivna ili citotoksična je primjena inhibitora autofagije poput 3-MA. Zhang i sur. 2022. godine proveli su istraživanje na staničnim linijama LOVO i SW480, rak debelog crijeva. Stanice tretirane 3-MA imale su značajno smanjene omjere LC3-II/LC3-I što nam sugerira da inhibicija autofagije od strane 3-MA potiče migraciju i invaziju stanica raka debelog crijeva. (59) U ovom istraživanju sa SG-om spektrofotometrijski je mjerena vitalnost stanica nakon primjene tretmana te kombinacije tretmana i 3-MA. Veći postotak vitalnost imale su stanice na koje je primijenjena kombinacija što nam ukazuje na sposobnost 3-MA da inhibira autofagiju inače izazvanu djelovanjem SG-a i dokazuje kako je autofagija inducira SG-om bila ključna za smanjenje vitalnosti stanica.

Prilikom novih terapijskih strategija KRK-a usmjerenih na proces autofagije, posebnu pozornost treba posvetiti specifičnom tipu, stadiju i metaboličkim karakteristikama KRK-a. Tijekom KRK-a, autofagija može ili potaknuti preživljavanje raka ili uzrokovati smrt stanica raka. Naglašava se činjenica da autofagija služi i za zaštitu organizama od razvoja drugih bolesti, uključujući upalna stanja i neurodegeneraciju te inhibicija autofagije stoga može biti korisna, ali takva terapija može istovremeno imati štetne učinke na normalna tkiva. Kombinacijski terapijski pristupi imaju veliki potencijal u liječenju kolorektalnih karcinoma, stoga će bolje razumijevanje molekularnih mehanizama apoptoze i autofagije biti ključno u identificiranju novih primjena liječenja KRK-a. Niti jedna vrsta karcinoma, uključujući KRK,

ne može se liječiti primjenom jedinstvenog pristupa, stoga je kombinirani napor najvjerojatniji put do uspješne prevencije i liječenja KRK-a. Nove eksperimentalne terapije koje koriste prirodne i modificirane biološke lijekove inspirirane derivatima iz carstva biljaka bogat su izvor potencijalnih anti-karcinogenih terapeutika. Također, nužno je istražiti mehanizme autofagije kao potencijalno učinkovite terapijske strategije u anti-karcinogenoj terapiji. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se pokazala učinkovitost SG-a na *in vivo* modelima i u kliničkim istraživanjima.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja te obrađenim i prikazanim rezultatima, doneseni su sljedeći zaključci:

1. SG i 18 $\beta$ -GK umanjuju staničnu vitalnost HCT 116 stanica ovisno o dozi.
2. SG djeluje učinkovitije u manjim dozama na smanjenje stanične vitalnosti HCT 116 stanica u usporedbi s 18 $\beta$ -GK.
3. Primjena SG-a uzrokovala je smanjenu potrošnju glukoze u stanicama u usporedbi s kontrolom.
4. Smanjeni izražaj PARP-a i odsutnost njegovog cijepanja u usporedbi s kontrolom ukazuje na to da stanična smrt putem apoptoze nije aktivirana u tretmanima SG-om.
5. Primjena SG-a smanjuje proliferacijski potencijal stanica što je pokazano povećanjem izražaja inhibitora staničnog ciklusa, p21.
6. SG inducira aktivaciju autofagije što je prikazano analizom izražaja proteina LC3 i AMPK.
7. Primjenom inhibitora autofagije, 3-MA, uz tretmane povećava se postotak vitalnih stanica što dokazuje da SG uzrokuje citotoksičnu autofagiju.

## 7. REFERENCE

1. Klimeck L, Heisser T, Hoffmeister M, Brenner H. Colorectal cancer: A health and economic problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2023;66:101839. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2023.101839>
2. Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas).* 2023;59(9):1646. Published 2023 Sep 12. dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Fmedicina59091646>
3. Spaander MCW, Zauber AG, Syngal S, et al. Young-onset colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2023;9(1):21. Published 2023 Apr 27. dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00432-7>
4. Robert S. Sandler, Epidemiology and risk factors for colorectal cancer, *Gastroenterology Clinics of North America*, Volume 25, Issue 4, 1996, Pages 717-735, ISSN 0889-8553. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70271-5](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70271-5)
5. hzjz.hr [Internet] Hrvatski zavod za javno zdravstvo [ažurirano: 01. ožujak 2024.] Dostupno na: [Ožujak – Mjesec svjesnosti o raku debelog crijeva | Hrvatski zavod za javno zdravstvo \(hzjz.hr\)](https://www.hzjz.hr/Ozujak-Mjesec-svjesnosti-o-raku-debelog-crijeva-Hrvatski-zavod-za-javno-zdravstvo-hzjz.hr)
6. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel).* 2018;6(2):31. Published 2018 Apr 13. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/medsci6020031>
7. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, & Wallace MB (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467–1480. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32319-0)
8. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel).* 2022;14(7):1732. Published 2022 Mar 29. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/cancers14071732>
9. Yee J. (2003). Screening CT colonography. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 24(1), 12–22. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/s0887-2171\(03\)90021-7](https://doi.org/10.1016/s0887-2171(03)90021-7)
10. Argiles G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. (2020). Localised Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment

- and Follow-up. *Annals of Oncology*. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022>
11. Shaukat A, Levin TR. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022;19(8):521-531. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038%2Fs41575-022-00612-y>
  12. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA*. 2021;325(7):669-685. Dostupno na: <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0106>
  13. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(5):1106-1121. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038%2Fs41423-020-00630-3>
  14. Tong X, Tang R, Xiao M, et al. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):174. Published 2022 Dec 8. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186%2Fs13045-022-01392-3>
  15. D'Arcy M. (2019). Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
  16. Ketelut-Carneiro N, Fitzgerald KA. Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis—Oh My! The Many Ways a Cell Can Die *Journal of Molecular Biology*, 2022, Volume 434, Issue 4. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167378>
  17. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 2019;39. Dostupno na: <https://doi.org/10.1042%2FBRSR20180992>
  18. Sorice M. Crosstalk of Autophagy and Apoptosis. *Cells*. 2022;11(9):1479. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Fcells11091479>
  19. Rodríguez-González J, Gutiérrez-Kobeh L. Apoptosis and its pathways as targets for intracellular pathogens to persist in cells. *Parasitol Res*. 2023;123(1):60. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007%2Fs00436-023-08031-x>
  20. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2008650/pdf/brjcancer00355-0003.pdf>

21. D'Arcy M. (2019). Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
22. Miller DR, Thorburn A. Autophagy and organelle homeostasis in cancer. *Dev Cell*. 2021;56(7):906-918. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016%2Fj.devcel.2021.02.010>
23. Nieto-Torres JL, Hansen M. Macroautophagy and aging: The impact of cellular recycling on health and longevity. *Mol Aspects Med*. 2021;82:101020. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101020>
24. Yun CW, Jeon J, Go G, Lee JH, Lee SH. The Dual Role of Autophagy in Cancer Development and a Therapeutic Strategy for Cancer by Targeting Autophagy. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):179. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Fijms22010179>
25. Liu S, Yao S, Yang H, Liu S, Wang Y. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis*. 2023;14(10):648. Published 2023 Oct 4. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038%2Fs41419-023-06154-8>
26. Seki H, Ohyama K, Sawai S, et al. Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):14204-14209. Dostupno na: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.0803876105>
27. Huang RY, Chu YL, Huang QC, et al. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid suppresses cell proliferation through inhibiting thromboxane synthase in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2014;9(4):e93690. Dostupno na: [10.1371/journal.pone.0093690](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093690)
28. Satomi Y, Nishino H, Shibata S. Glycyrrhetic acid and related compounds induce G1 arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2. *Anticancer Res*. 2005;25(6B):4043-4047. Dostupno na: [Glycyrrhetic acid and related compounds induce G1 arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16111111/)
29. Shetty AV, Thirugnanam S, Dakshinamoorthy G, et al. 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid targets prostate cancer cells by down-regulating inflammation-related genes. *Int J Oncol*. 2011;39(3):635-640. Dostupno na: [10.3892/ijo.2011.1061](https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1061)
30. Li S, Zhu JH, Cao LP, et al. Growth inhibitory in vitro effects of glycyrrhizic acid in U251 glioblastoma cell line. *Neurol Sci*. 2014;35(7):1115-1120. Dostupno na: [10.1007/s10072-014-1661-4](https://doi.org/10.1007/s10072-014-1661-4)

31. Xu B, Wu GR, Zhang XY, et al. An Overview of Structurally Modified Glycyrrhetic Acid Derivatives as Antitumor Agents. *Molecules*. 2017;22(6):924. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules22060924>
32. Feng X, Ding L, Qiu F. (2015). Potential drug interactions associated with glycyrrhizin and glycyrrhetic acid. *Drug Metabolism Reviews*, 47(2), 229–238. Dostupno na: [10.3109/03602532.2015.1029634](https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1029634)
33. Shinu P, Gupta GL, Sharma M, et al. Pharmacological Features of 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid: A Pentacyclic Triterpenoid of Therapeutic Potential. *Plants (Basel)*. 2023;12(5):1086. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Fplants12051086>
34. Wang S, Shen Y, Qiu R, Chen Z, Chen Z, Chen W. 18  $\beta$ -glycyrrhetic acid exhibits potent antitumor effects against colorectal cancer via inhibition of cell proliferation and migration. *Int J Oncol*. 2017;51(2):615-624. Dostupno na: <https://doi.org/10.3892/ijco.2017.4059>
35. Chen L, Gong J, Yong X, Li Y, Wang S. A review of typical biological activities of glycyrrhetic acid and its derivatives. *RSC Adv*. 2024;14(10):6557-6597. Published 2024 Feb 22. Dostupno na: <https://doi.org/10.1039%2Fd3ra08025k>
36. Sontia B, Mooney J, Gaudet L, Touyz RM. Pseudohyperaldosteronism, liquorice, and hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2008;10(2):153-157. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1751-7176.2008.07470.x>
37. Piquero-Casals J, Hexsel D, Mir-Bonafé JF, Rozas-Muñoz E. Topical Non-Pharmacological Treatment for Facial Seborrheic Dermatitis. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2019;9(3):469-477. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007%2Fs13555-019-00319-0>
38. Final Report on the Safety Assessment of Glycyrrhetic Acid, Potassium Glycyrrhetinate, Disodium Succinoyl Glycyrrhetinate, Glyceryl Glycyrrhetinate, Glycyrrhetinyl Stearate, Stearyl Glycyrrhetinate, Glycyrrhizic Acid, Ammonium Glycyrrhizate, Dipotassium Glycyrrhizate, Disodium Glycyrrhizate, Trisodium Glycyrrhizate, Methyl Glycyrrhizate, and Potassium Glycyrrhizate. (2007). *International Journal of Toxicology*, 26(2\_suppl), 79–112. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/10915810701351228>
39. Zhu J, Zhang W, Wang D, Li S, Wu W. Preparation and characterization of norcantharidin liposomes modified with stearyl glycyrrhetinate. *Exp Ther Med*. 2018;16(3):1639-1646. Dostupno na: <https://doi.org/10.3892%2Fetm.2018.6416>
40. Santonocito D, Puglia C, Torrisi C, et al. Calorimetric Evaluation of Glycyrrhetic Acid (GA)- and Stearyl Glycyrrhetinate (SG)-Loaded Solid Lipid Nanoparticle Interactions



- with a Model Biomembrane. *Molecules*. 2021;26(16):4903. Published 2021 Aug 13.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules26164903>
41. Chai Y, Zhang S, Li N, Xu DQ, Liu WJ, Fu RJ, Tang YP. The effective combination therapies with irinotecan for colorectal cancer. *Front. Pharmacol.* Volume 15 – 2024.  
Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2024.1356708/full>
42. Faubert B, Solmonson A, DeBerardinis RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*. 2020;368(6487). Dostupno na: [10.1126/science.aaw5473](https://doi.org/10.1126/science.aaw5473)
43. Chen A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chin J Cancer*. 2011;30(7):463-471. Dostupno na: [10.5732/cjc.011.10111](https://doi.org/10.5732/cjc.011.10111)
44. Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, et al. The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 296, 2021. Dostupno na: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014479>
45. Mokarram P, Albokashy M, Zarghooni M, et al. New frontiers in the treatment of colorectal cancer: Autophagy and the unfolded protein response as promising targets. *Autophagy*. 2017;13(5):781-819. Dostupno na: [10.1080/15548627.2017.1290751](https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1290751)
46. Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1809-1820. Dostupno na: [10.1172/JCI20039](https://doi.org/10.1172/JCI20039)
47. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 2007;9(10):1142-1151. Dostupno na: [10.1038/ncb1634](https://doi.org/10.1038/ncb1634)
48. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999;402(6762):672-676. Dostupno na: [10.1038/45257](https://doi.org/10.1038/45257)
49. Shen Y, Li DD, Wang LL, Deng R, Zhu XF. Decreased expression of autophagy-related proteins in malignant epithelial ovarian cancer. *Autophagy*. 2008;4(8):1067-1068. Dostupno na: [10.4161/auto.6827](https://doi.org/10.4161/auto.6827)
50. Guo JY, Chen HY, Mathew R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2011;25(5):460-470. Dostupno na: [10.1101/gad.2016311](https://doi.org/10.1101/gad.2016311)

51. Goel S, Huang J, Klampfer L. K-Ras, intestinal homeostasis and colon cancer. *Curr Clin Pharmacol.* 2015;10(1):73-81. Dostupno na: [10.2174/1574884708666131111204440](https://doi.org/10.2174/1574884708666131111204440)
52. Wu S, Sun C, Tian D, et al. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(4):3882-3891. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4466959/>
53. Sivridis E, Koukourakis MI, Zois CE, et al. LC3A-positive light microscopy detected patterns of autophagy and prognosis in operable breast carcinomas. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2477-2489. Dostupno na: <https://doi.org/10.2353%2Fajpath.2010.090049>
54. Sivridis E, Giatromanolaki A, Liberis V, Koukourakis MI. Autophagy in endometrial carcinomas and prognostic relevance of 'stone-like' structures (SLS): what is destined for the atypical endometrial hyperplasia?. *Autophagy.* 2011;7(1):74-82. Dostupno na: [10.4161/auto.7.1.13947](https://doi.org/10.4161/auto.7.1.13947)
55. Guo B, Han X, Tkach D, Huang SG, Zhang D. AMPK promotes the survival of colorectal cancer stem cells. *Animal Model Exp Med.* 2018;1(2):134-142. Dostupno na: [10.1002/ame2.12016](https://doi.org/10.1002/ame2.12016)
56. Faubert B, Vincent EE, Poffenberger MC, Jones RG. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett.* 2015;356(2 Pt A):165-170. Dostupno na: [10.1016/j.canlet.2014.01.018](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.018)
57. Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res.* 2003;63(21):7056-7061. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14612495/>
58. Zhang X, Min KW, Wimalasena J, Baek SJ. Cyclin D1 degradation and p21 induction contribute to growth inhibition of colorectal cancer cells induced by epigallocatechin-3-gallate. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(12):2051-2060. Dostupno na: [10.1007/s00432-012-1276-1](https://doi.org/10.1007/s00432-012-1276-1)
59. Zhang X, Wang H, Yu M, Ma K, Ning L. Inhibition of autophagy by 3-methyladenine promotes migration and invasion of colon cancer cells through epithelial mesenchymal transformation. *Transl Cancer Res.* 2022;11(8):2834-2842. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9459642/>