

Mehanizmi protutumorskog djelovanja fitokemikalija rutina i kvercetina na stanice raka debelog crijeva

Jezidžić, Alberta

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:291675>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-19**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Alberta Jezidžić
Mehanizmi protutumorskog djelovanja fitokemikalija rutina i kvercetina na
stanice raka debelog crijeva
Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Alberta Jezidžić
Mehanizmi protutumorskog djelovanja fitokemikalija rutina i kvercetina na
stanice raka debelog crijeva
Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Robert Domitrović

Komentor rada: dr. sc. Iva Suman

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
Drug development and research

Alberta Jezidžić
Mechanisms of antitumour action of phytochemicals rutin and quercetin in
colon cancer cells
Master's thesis

Rijeka, 2023.

Mentor: Prof. dr. sc. Robert Domitrović
Co-mentor: dr. sc. Iva Suman

Zahvale

Zahvaljujem se Prof. dr. sc. Robertu Domitroviću i dr. sc. Ivi Suman na omogućenoj suradnji i stečenom znanju, strpljenju u radu i odgovaranju na sva moja pitanja te ugodnoj radnoj atmosferi cijelog odjela.

Zahvaljujem se Valentini, koja je također uvijek bila uz mene, te pridonosila veselu energiju i atmosferu u svim trenutcima, hvala ti za neprestanu potporu kroz ovih pet godina.

Naposljetku, zahvaljujem se mojim roditeljima, sestri, te obitelji, što su me uvijek podupirali i bili moj oslonac kroz dobre i loše dane tijekom cijelog mog školovanja, bez vas ne bi bila gdje jesam danas.

Diplomski rad obranjen je dana 27. rujna 2023. pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Toni Todorovski
2. prof. dr. sc. Milan Mesić
3. Prof. dr. sc. Robert Domitrović
4. dr. sc. Iva Suman

Rad ima 55 stranica, 18 slika, 4 tablice i 42 literaturnih navoda

Sažetak

Rak debelog crijeva (CRC) je jedan od vodećih uzroka smrti uzrokovanih karcinomom u svijetu. Incidencija ovisi o geografskom položaju, načinu života i genetskim faktorima. CRC se očituje stvaranjem adenomatoznih polipa na unutarnjem zidu debelog crijeva. Liječenje CRC-a se odvija putem operativnih zahvata, radijacije, kemoterapije ili kombinacije više opcija. 5-FU je jedan od vodećih kemoterapeutskih opcija za liječenje CRC-a, ali zbog česte pojave kemorezistencije tumorskih stanica, potrebno je razmatrati nove opcije liječenja. Fitokemikalije pokazuju obećavajući potencijal zahvaljujući svojem širokom spektru pozitivnih učinaka, među kojima je i protutumorsko djelovanje. Cilj ovog rada je bio istražiti protutumorsko djelovanje fitokemikalija rutina i kvercetina, te njihov učinak u kombinaciji s 5-FU na tumorske stanice debelog crijeva HCT116. Korišteni su 24-satni tretmani rutina, kvercetina, 5-FU i njihovih kombinacija, čije je djelovanje ispitano korištenjem XTT-a, Western blota i imunofluorescencije. Rezultati su pokazali citotoksičan učinak rutina i kvercetina koji je pojačan u kombinaciji s 5-FU, aktivaciju autofagije te intrinzičnog i ekstrinzičnog puta apoptoze, s pojačanim aktivacijama u kotretmanima s 5-FU, te utjecaj na ERK/MAPK signalnu kaskadu i FoxO3a transkripcijski faktor. Pokazalo se da su kombinacijske terapije učinkovitije od zasebnih, te da je rutin u kombinaciji s 5-FU najučinkovitija kombinacija. Rutin, iako skromnijeg djelovanja u zasebnom tretmanu, djeluje kao kemosenzitizer 5-FU-a, pojačavajući njegov utjecaj na tumorske stanice. Ipak, potrebno je provođenje istraživanja *in vivo* kako bi se pobliže ustanovilo djelovanje fitokemikalija zasebno i u kombinaciji s kemoterapeuticima unutar organizma.

Ključne riječi: fitokemikalije, rutin, kvercetin, 5-FU, HCT116, kemosenzitivizacija, rak debelog crijeva

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-related death worldwide. The incidence depends on geographical location, lifestyle, and genetic factors. CRC is manifested through the formation of adenomatous polyps on the inner wall of the colon. CRC is treated with surgery, radiation, chemotherapy, or a combination of several options. 5-FU is one of the leading chemotherapeutic options for the treatment of CRC, but due to the frequent appearance of drug resistance in tumor cells, it is necessary to consider new treatment options. Phytochemicals show promising potential thanks to their wide spectrum of positive effects, among which is antitumor activity. The aim of this work was to investigate the antitumor activity of the phytochemicals rutin and quercetin, and their effect in combination with 5-FU in HCT116 colon tumor cells. 24-hour treatments of rutin, quercetin, 5-FU and their combinations were used, the effects of which were tested using XTT, Western blot and immunofluorescence. The results showed the cytotoxic effect of rutin and quercetin, which was enhanced in combination with 5-FU, the activation of autophagy and the intrinsic and extrinsic pathway of apoptosis, with increased activation in co-treatments with 5-FU, and the impact on the ERK/MAPK signaling cascade and the FoxO3a transcription factor. It has been shown that combination therapies are more effective than separate therapies, and that rutin combined with 5-FU is the most effective combination. Rutin, although of a more modest effect in a separate treatment, acts as a chemosensitizer of 5-FU, enhancing its effect on tumor cells. However, it is necessary to carry out research in vivo to establish the action of phytochemicals separately and in combination with chemotherapeutics inside the organism in a more detailed manner.

Keywords: phytochemicals, rutin, quercetin, 5-FU, HCT116, chemosensitization, colorectal cancer

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Patofiziologija CRC-a.....	1
1.2.	Detekcija, prevencija i liječenje CRC-a	2
1.3.	5-fluorouracil	3
1.3.1.	Mehanizam djelovanja 5-FU	3
1.4.	Prirodni spojevi i fitokemikalije	4
1.5.	Kvercetin	6
1.6.	Rutin	8
1.6.1.	Usporedba rutina i kvercetina	9
1.7.	Stanična smrt.....	9
1.7.1.	Apoptoza	10
1.7.2.	Autofagija	13
1.8.	ERK/MAPK signalna kaskada.....	14
1.9.	FoxO3a	15
2.	Cilj rada	16
3.	Materijali i metode	17
3.1.	Stanične linije.....	17
3.2.	Tretmani stanica	17
3.3.	Test stanične vijabilnosti	18
3.4.	Izolacija proteina i priprema uzoraka za western blot analizu i imunofluorescenciju.....	19
3.5.	Western blot.....	21
3.6.	Imunofluorescencija	24
3.7.	Statistička analiza	24
4.	Rezultati	25

4.1.	Utjecaj 5-FU-a na staničnu vijabilnost HCT116.....	25
4.2.	Utjecaj rutina i kvercetina na staničnu vijabilnost HCT116	25
4.3.	Utjecaj rutina, kvercetina, 5-FU-a i njihovih kombinacija na staničnu vijabilnost HCT116.....	28
4.4.	Izračun relativne ekspresije proteina pomoću Western blot analize	29
4.4.1.	Utjecaj tretmana i kombiniranih tretmana na autofagiju.....	29
4.4.2.	Utjecaj tretmana i kombiniranih tretmana na apoptozu	30
4.4.3.	Utjecaj tretmana i kombiniranih tretmana na MAPK/ERK signalnu kaskadu	36
4.4.4.	Utjecaj tretmana i kombiniranih tretmana na transkripcijski faktor FoxO3a	37
5.	Diskusija	41
6.	Zaključak	48
7.	Reference.....	50

1. Uvod

Rak debelog crijeva (eng. *colon cancer, colorectal cancer, CRC*) je drugi odnosno treći najčešći karcinom u žena odnosno muškaraca, te je među vodećim uzrocima smrti uzrokovanih karcinomom u svijetu. Incidencija ovisi o geografskom položaju; razvijenije zemlje imaju veću incidenciju od manje razvijenih zemalja (1). Prema statistici iz 2020., dijagnosticirano je 104.610 slučajeva raka debelog crijeva od kojih je 53.200 slučajeva imalo smrtnan ishod (50.8%). Usprkos visokim brojevima, mortalitet se značajno smanjio od 20. stoljeća zahvaljujući unaprjeđenju u istraživanjima kod otkrića i dijagnoze te prevencije karcinoma debelog crijeva (1,2). Iako se incidencija povećava s dobi, u novije vrijeme se javlja povećana incidencija među populacijom mlađom od 50 godina života, te se smatra da bi način života (pušenje, konzumacija alkohola, povećana tjelesna masa, smanjena fizička aktivnost i sjedilački način života, neuravnotežena prehrana i kompozicija mikrobiote) mogli doprinositi ovom povećanju (2–4). Osim vanjskih tj. okolišnih faktora, na razvoj karcinoma utječu i genetski faktori. U slučaju CRC-a, moguć je razvoj uzrokovan mutacijama tumor supresorskih gena (npr. SMAD4 (eng. *small mothers against decapentaplegic 4 protein*), p53 (*protein 53*), odnosno njihove inaktivacije i onkogeni (npr. K-Ras (eng. *Kirsten rat sarcoma virus*)), tj. njihove aktivacije, gdje dolazi do razvoja adenoma iz čega nastaje adenokarcinom (3). Većina slučajeva CRC-a je sporadična (bez genetskog utjecaja), no može biti i nasljedan ili povezan s upalnom bolesti crijeva (eng. *inflammatory bowel disease, IBS*) (2,3).

1.1. Patofiziologija CRC-a

Utjecajem okolišnih i genetskih faktora i njihove aktivacije onkogeni i/ili inaktivacije tumor supresorskih gena te nakupljanja mutacija dolazi do gubitka genomske/epigenomske stabilnosti i razvoja malignih transformacija stanica iz matične stanice ili stanice nalik matičnoj stanici unutar baze crijevnih kripti. Ovim procesom nastaju matične stanice raka iz

kojih se dalje razvijaju tumori (1). Adenomatozni polipi predstavljaju benigne nakupine tkiva na unutarnjem zidu debelog crijeva karakteristične za CRC. Zbog svoje heterogene prirode na molekularnom nivou mogu prerasti u neoplastične adenome te naposljetku CRC. Polipi s aberantnim kriptama rastu u adenome, zatim u napredne adenome, te naposljetku tumore čime započinje CRC (1,5).

1.2. Detekcija, prevencija i liječenje CRC-a

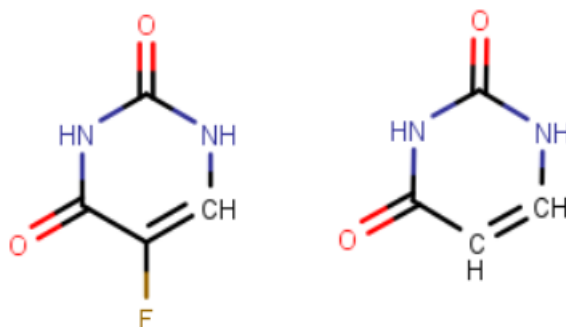
Jedan od glavnih načina detekcije i prevencije CRC-a, osim pravilne i uravnotežene prehrane i zdravog načina života, je kolonoskopija. Pomoću nje je moguće otkriti polipe i prije nego prerastu u neoplastične adenome, te ih kirurški odstraniti (1,5). Najčešće je korištena procedura zbog toga što omogućava dolazak do mjesta tumora i biopsiju tkiva čime je moguće histološki provjeriti i potvrditi postojanje malignog tumora. Osim kolonoskopije, koriste se i kapsulna endoskopija (eng. *capsule endoscopy*), koristeći kapsulu s kamerom koju pacijent proguta, time omogućavajući pregled cijelog gastrointestinalnog trakta, kao i CT kolonografija, koristeći CT skeniranje za dobivanje slike unutrašnjosti debelog crijeva, ali je male osjetljivosti na male i ravne lezije. Moguće je i testiranje na biljege, proteine, deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) i ribonukleinsku kiselinu (RNK) unutar stolice pacijenta preko fekalnog DNK testa utemeljeno na činjenici da predmaligne lezije mogu krvariti i ljuštiti stanice u stolicu. Zahvaljujući ovakvim testovima i pregledima, mortalitet uzrokovan CRC-om je znatno smanjen (1).

Ukoliko dođe do razvoja CRC-a ili prekasne detekcije, moguće je liječenje pomoću kirurških zahvata (koji se koriste samo za slučajeve CRC-a koji nisu metastazirali), radijacije, kemoradijacije i kemoterapije. Ovisno o karakteristikama samog tumora (postoji li metastaza, progresija tumora, itd.) koriste se ili pojedinačne opcije liječenja ili kombinirane terapije, od kojih se najčešće okreće kombiniranim opcijama terapije. U slučaju

kemoterapije, najčešće korišten kemoterapeutik je 5-fluorouracil (5-FU), obično sam ili u kombinaciji s drugim citotoksičnim spojevima, kao što su leukovorin (LV), irinotekan (5-FU/LV/irinotekan: FOLFIRI), oksaliplatin (5-FU/LV/oksaliplatin), i sl. Moguće su i kombinacije kemoterapije s protuupalnim lijekovima (nesteroidni protuuplani lijekovi, NSAIDs), probioticima, cisplatinom, itd. (1,4).

1.3. 5-fluorouracil

5-fluorouracil (5-FU) je popularan izbor kemoterapije za velik broj karcinoma, uključujući CRC, rak dojke, rak glave i vrata, rak jajnika, rak bazalnih stanica kože i aktiničnih keratoza gdje se koristi topikalno (6,7). Na molekularnoj razini, 5-FU je heterociklični aromatski organski spoj čija je struktura i izgled gotovo jednak pirimidinu unutar DNK i RNK strukture. Jedina razlika između dvije molekule je u fluoru koji se nalazi na C-5 poziciji umjesto vodika, zbog čega je 5-FU analog uracila (6) i koristi se kao antimetabolit (7).



Slika 1. Molekulska struktura 5-FU (lijevo) i uracila (desno)

1.3.1. Mehanizam djelovanja 5-FU

Nakon ulaska u stanicu, 5-FU se pretvara u fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) koji tvori kompleks s timidilat sintazom (TS) i time inhibira njezino

djelovanje i stvaranje deoksitimidin monofosfata (dTMP), te TS ne može sintetizirati timidilat potreban za sintezu DNK. Nestašicom dTMP-a dolazi do smanjenja deoksitimidin trifosfata (dTTP), te sukladno tome i smanjene količine drugih deoksinukleotida. Neravnoteža u razinama adenozin trifosfata (ATP) i dTTP-a (omjer ATP/dTTP) dovodi do poremećene sinteze DNK i popravka oštećenja. Inhibicijom TS-a također dolazi do nakupljanja dUMP-a koji se u obliku dUTP-a ugrađuje u DNK, te tako također inhibira sintezu DNK i njezin popravak. Osim inhibicije TS-a, moguća je i direktna ugradnja 5-FU ili njegovog metabolita FdUTP u DNK i RNK umjesto uracila ili timina. Ugradnja 5-FU u RNK dovodi do inhibicije pretvorbe pre-rRNK u rRNK i poremećaja u posttranslacijskim modifikacijama tRNK te stvaranja snRNK/proteinskih kompleksa (6,7).

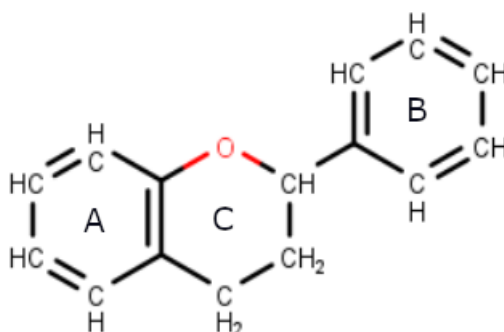
1.4. Prirodni spojevi i fitokemikalije

Osim kemoterapije, radijacije i drugih kombiniranih terapija za karcinome, jedna od glavnih opcija koja je sve popularnija je korištenje prirodnih spojeva u terapijske svrhe zbog svojih ekstenzivnih svojstava. S obzirom na činjenicu da na razvoj CRC-a imaju velik utjecaj prehrana i način života, prirodni spojevi i njihovi metaboliti su odlična opcija za liječenje CRC-a. Osim terapijske opcije, prehrana bogata voćem, povrćem, cjelovitim žitaricama i sjemenkama koje sadrže fitokemikalije ima velike pozitivne učinke zahvaljujući protektivnim svojstvima fitokemikalija koje nalazimo u navedenim namirnicama (2,5). Fitokemikalije pripadaju sekundarnim metabolitima, organskim spojevima koji nisu esencijalni za rast, razvoj i reprodukciju organizma te su nenu nutritivni kemijski spojevi proizvedeni kao vlastiti protektivni agensi biljaka (2). Moguće ih je izolirati iz lišća, korijenja, ploda i sjemenki biljaka. U fitokemikalije se ubrajaju bioaktivni spojevi poput flavonoida, polifenola, antocijanina, karotenoida, saponina, polisaharida, alkaloida, terpenoida, i sl. (5). Osim protutumorskih sadrže

još i protuupalna, anti-angiogenična, anti-proliferativna, anti-mutagena i antioksidativna svojstva (2,5).

Polifenoli su podvrsta fitokemikalija karakteristične strukture. Glavna struktura potječe od fenilalanina te sadrži minimalno dva benzenska prstena na koje su vezane hidroksilne skupine (8,9). Glavna podjela polifenola je na flavonoide i ne-flavonoide, točnije: fenolne kiseline, stilbene i lignane (8). Obzirom na strukturu, polifenoli sadrže različita fizikalno-kemijska svojstva. Što je više hidroksilnih skupina prisutno, to je veća topljivost polifenola u vodi. Polifenoli, kao biljni sekundarni metaboliti, imaju važnu ulogu u obrani i očuvanju biljke od ultravioletnog (UV) zračenja i patogena, signalizaciji između biljke i drugih organizama, te pridonose normalnom rastu i razvoju biljke. Ujedno se koriste i kao prirodni pigmenti, aroma i okusi u prehrani (npr. vanilin), te daju gorak okus hrani u kojoj se nalaze. Polifenolni spojevi su široko rasprostranjeni među namirnicama prirodnog podrijetla (8).

Flavonoidi su najrašireniji polifenolni spojevi koje nalazimo u biljnim pigmentima i imaju ulogu u sazrijevanju sjemena biljke, zaštiti biljke od biotičkog i abiotičkog stresa, te pomažu protiv smrzavanja i osušivanja biljke. Također služe i kao signalne molekule, UV filteri i pomažu kod detoksifikacije (8,10). Struktura flavonoida se sastoji od tri prstena, točnije difenilpropanskog skeleta ili C6-C3-C6 formacije unutar koje se nalaze dva fenilna prstena (A i B) i jedan heterociklični prsten (C). Obzirom na stupanj hidroksilacije, prisutnost dvostruke kovalentne veze unutar heterocikličnog prstena i mjesto vezanja prstena B za prsten C, flavonoidi se dijele na glavne podskupine: flavonole, flavanole, flavone, izoflavone, antocijanidine/antocijanine i flavanone. Druge podskupine uključuju biflavonoide (npr. ginkgetin), flavanonoli (npr. taksifolin), flavonolignani (npr. silibinin), itd. (8,9,11).

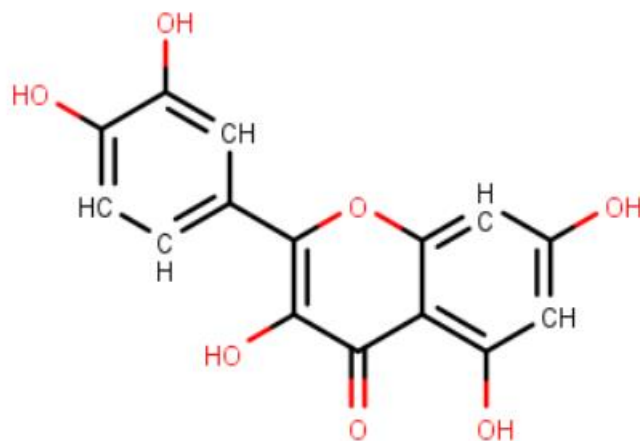


Slika 2. Molekulska struktura flavonoida. Prsten B je vezan na C2 heterocikličnog prstena (prsten C). Ukoliko je vezan za C3, tada takva struktura prikazuje baznu strukturu izoflavona.

Od flavonoida, flavonoli su najraširenija i najčešća podgrupa spojeva koju pronalazimo u kori i lišću voća i povrća. Nalazimo ih u velikim količinama u luku, salati, brokuli, rajčicama, jabukama, grožđu i bobičastom voću, te crnom vinu i čaju (8,10). Osnovna struktura flavonola je 3-hidroksi-2-fenilkromen-4-on gdje je hidroksilna skupina na C3 otvorena za glikozilaciju. Kao i svi drugi flavonoidi, obzirom na stupanj metilacije i hidroksilacije, postoji velik broj različitih primjera flavonola, od kojih je jedan od najpoznatijih kvercetin (8,10).

1.5. Kvercetin

Kvercetin (eng. *quercetin*, Q) je biljni pigment i sekundarni metabolit koji se ubraja u polifenolne flavonoidne fitokemikalije, točnije flavonole. Kemijska struktura kvercetina se temelji na strukturi flavonola te je njegov puni kemijski naziv 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-kromen-4-on ili 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon (11,12). Kemijska formula kvercetina je $C_{15}H_{10}O_7$.

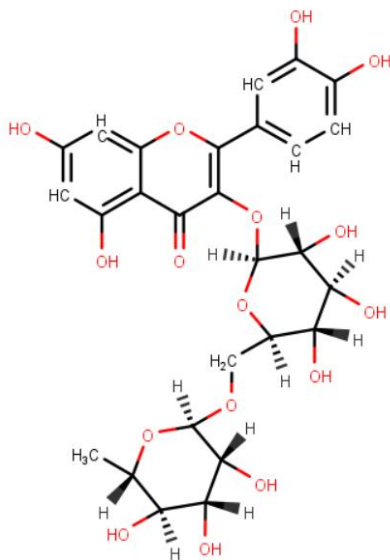


Slika 3. Molekulska struktura kvercetina. Razlika između kvercetina i drugih flavonola je u hidroksilnim skupinama i njihovom mjestu vezanja.

Molekulska masa kvercetina iznosi 302,2 g/mol. Pri sobnoj temperaturi je čvrsta tvar u obliku kristala blijedo žute boje. Slabo je topljiv u vodi, dok se dobro otapa u alkoholima i lužnatim vodenim otopinama. U biljkama, kvercetin ima važnu ulogu u fotosintezi, rastu i razvoju biljke, te stvaranju peludi. Moguće ga je pronaći u raznom voću i povrću, među kojima ga je najviše u luku, origanu, čili papričicama, špinatu, brusnicama, trešnjama, salati, borovnicama, šparogama i brokuli (11). Kvercetin sadrži veliki raspon benefičijskih svojstava, te kao i drugi flavonoidi, sadrži protutumorska, antioksidativna, protuupalna i antimikrobna svojstva, zbog čega je jedan od spojeva čija se svojstva i njihovo kemoterapijsko djelovanje često istražuju. U slučaju CRC-a, kvercetin je u raznim istraživanjima pokazao inhibiciju stanične proliferacije i rasta, indukciju apoptoze, supresiju metastaze i smanjenu rezistenciju na kemoterapeutike, te je u staničnim kulturama pokazano djelovanje kvercetina na članove različitih signalnih kaskada, među kojima je jedna od glavnih MAPK/ERK signalna kaskada (11–13).

1.6. Rutin

Rutin, još poznat i pod nazivom 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukozid, rutozid, kvercetin-3-rutinozid ili soforin, je glikozid građen od kvercetina i disaharidarutinoze (ramnoza i glukoza). Kemijska formula rutina je $C_{27}H_{30}O_{16}$ (14).



Slika 4. Molekulska struktura rutina.

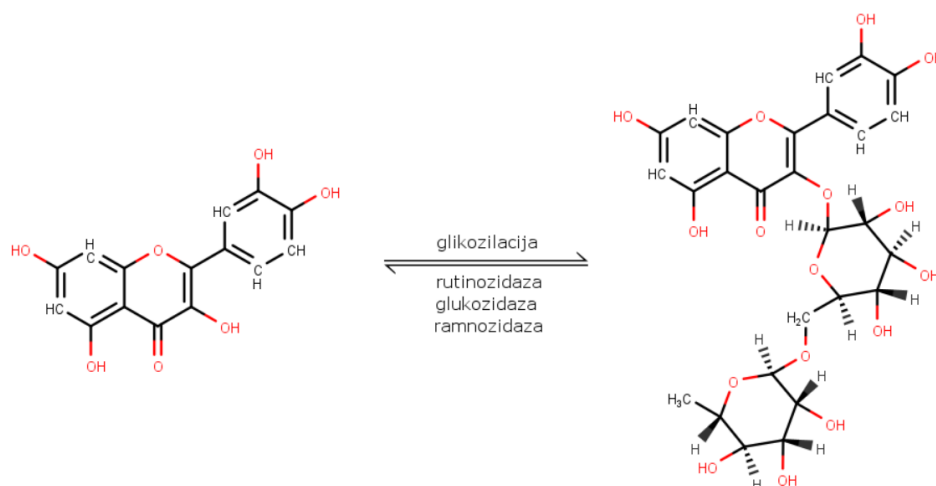
Molekulska masa spoja iznosi 610.52 g/mol, te je pri sobnoj temperaturi također čvrsta tvar u obliku kristala blijedo žute boje (14). Kao i kvercetin, široko je rasprostranjen u voću i povrće te ga najviše pronalazimo u grožđu, šparogama, jabukama, vinu i čaju te biljkama kao što su *Ruta graveolens* L., *Sophora japonica* L., *Eucalyptus* spp., itd., po kojima je i dobio naziv (15). Heljda se smatra najvećim izvorom rutina. Također ga pronalazimo i u citrusima (16). Zbog svoje široke rasprostranjenosti i obujma benefecijskih učinaka i djelovanja, još se i naziva vitamin P (17). Kao i kvercetin, rutin sadrži protutumorsko, antioksidativno, protuupalno i antibakterijsko djelovanje, te ima zaštitno djelovanje na veliki broj organa i organskih sustava, uključujući hepatoprotektivno, neuroprotektivno, i kardioprotektivno djelovanje (14–16). Kao i kvercetin, rutin je pokazao

značajno djelovanje u indukciji apoptoze, inhibiciji rasta malignih stanica preko djelovanja na različite signalne kaskade unutar stanice. *In vitro* istraživanja utjecaja rutina na različite stanične linije CRC-a su pokazala inhibiciju staničnog rasta i proliferacije, većinom preko apoptoze (18).

1.6.1. Usporedba rutina i kvercetina

Pošto je rutin glikozilirani oblik kvercetina, ponašanja molekula u organizmu su poprilično slična. Rutin se ne apsorbira u tankom i debelom crijevu u svom nativnom obliku već podliježe deglikozilaciji iz čega nastaje aglikon kvercetin pomoću β -glukozidaza i α -ramnozidaza crijevne mikroflore. Daljnji proces je jednak kao i kod kvercetina, gdje dolazi do njegovog ulaska u krvotok i daljnjeg djelovanja na organizam (19).

Osim glukozidaza i ramnozidaza, rutinozidaze također mogu dati kvercetin iz rutina, dok je procesom glikozilacije moguće dobiti rutin iz kvercetina (15).



Slika 5. Reakcije dobivanja rutina i kvercetina.

1.7. Stanična smrt

Kako bi stanica održala homeostazu sustava, u konstantnoj ravnoteži se održavaju procesi staničnog rasta i proliferacije kao i stanične smrti.

Stanična smrt se događa kada stanice prepoznaju abnormalnosti koje ne mogu ispraviti, stoga započinju složene procese tzv. „staničnog samoubojstva“ kako bi se očuvao ostatak zdravih stanica i tkiva. Glavni oblici stanične smrti su apoptoza i autofagija, iako postoje i razni drugi oblici, kao što su piroptoza (pro-upalna inačica apoptoze aktivirana patogenima), nekroptoza (visoko regulirana nekroza), itd. (20,21). U slučaju nekontrolirane stanične proliferacije, odnosno kada procesi stanične smrti ne mogu držati stanični rast pod kontrolom, mogući su razvoji patoloških stanja poput karcinoma, dok nekontrolirana stanična smrt dovodi do razvoja bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove, i sl. (20). Fitokemikalije su dokazale kroz mnoštvo istraživanja svoj utjecaj na poticanje autofagije i apoptoze u tumorskim stanicama, zbog čega su dobar izbor za buduće terapije karcinoma, individualno ili u kombinaciji s kemoterapijom (22).

1.7.1. Apoptoza

Apoptoza je stanični proces još poznat i pod nazivom „kontrolirana stanična smrt“ ili „programirana stanična smrt“, u kojoj dolazi do stanične smrti bez izlivanja staničnog materijala u izvanstanični matriks. Glavni proteini zaslužni za apoptozu su cistein-aspartične proteaze – kaspaze. S obzirom na vrstu kaspaze koja djeluje, apoptozu je moguće dijeliti na dva puta, intrinzični i ekstrinzični put apoptoze. Kaspaze je također moguće dijeliti na inicijatorske (kaspaze 2, 8, 9 i 10) i izvršne (eng. *executioner caspases*, kaspaze 3, 6 i 7). Prilikom staničnog oštećenja, aktiviraju se inicijatorske kaspaze putem auto-proteolize (aktivacija preko specifičnih adapterskih molekula) koje potom aktiviraju izvršne kaspaze cijepanjem (eng. *cleaving*) koje zatim započinju niz kaskada cijepanjem određenih staničnih supstrata čime dolazi do membranskog bubrenja zbog uništenog citoskeleta gdje nastaju izdanci/balončići na površini i koji se mogu odvojiti od membrane (eng. *blebbing*), fragmentacije DNK, uništavanja jezgrenih proteina i

citoskeleta, ekspresije liganada za fagocite i formacije apoptotičkih tijela (20–23). Dok u staničnim kulturama okolne stanice fagocitiraju ostatke mrtvih stanica, *in vivo* makrofazi djeluju prije nego dođe do fragmentacije stanice kako bi se zadržao stanični sadržaj oštećenih stanica bez oštećenja okolnih stanica i tkiva (20).

1.7.1.1. Intrinzični put apoptoze

Još poznat i pod nazivom mitohondrijski put apoptoze, intrinzični put započinje aktivacijom preko unutarstaničnih stimulansa, odnosno čimbenika koje ispuštaju mitohondriji, koje stanica sama započinje kao odgovor na oštećenje. U slučaju nedostatka preživljavajućih signala (citokina, hormona i čimbenika rasta), aktiviraju se proapoptotske molekule (Bax, Puma, Noxa, itd.) čime započinje proces apoptoze. Druga opcija aktivacije apoptoze je preko izlaganja hipoksiji, toksinima, radijaciji, reaktivnim kisikovim spojevima, virusima, itd. Prilikom aktivacije intrinzičnog puta apoptoze, dolazi do promjena u permeabilnosti mitohondrijske membrane i stvaranja pora. Proteini poput Bax, Bak i Bcl-2 su zaslužni za regulaciju permeabilnosti mitohondrijske membrane (20,23). Bax i Bak pripadaju proapoptotičkoj obitelji proteina, čija aktivacija dovodi do neutralizacije antiapoptotskih proteina (Bcl-2) i sukladno tome povećanoj permeabilnosti mitohondrijske membrane. Ovim događajem je omogućen izlazak mitohondrijskim proteinima u citosol, kao što su citokrom c, Smac/Diablo, itd. Citokrom c se zatim veže za Apaf-1 (eng. *apoptotic protease activating factor 1*) u citosolu, uzrokujući konformacijsku promjenu na Apaf-1 i mogućnost vezanja deoksi-ATP-a za Apaf-1. Zatim nastaje kompleks Apaf-1 proteina koji se naziva apoptozom čija je CARD (eng. *caspase recruitment domain*) izložena i spremna za vezanje kaspaze 9 i njezinu aktivaciju preko cijepanja. Aktivirana kaspaza 9 zatim cijepanjem aktivira prokaspazu 3, koja zatim u obliku kaspaze 3 djeluje na važne stanične proteine i dovodi do apoptoze. Isti proces se događa i s kaspazama

6 i 7 (20,21,23). Omjer između proapoptotskih (npr. Bax) i antiapoptotskih (npr. Bcl-2) proteina na membrani mitohondrija govori o staničnom statusu te nalazi li se stanica u apoptozi ili se održava stanično preživljenje (23).

1.7.1.2. Ekstrinzični put apoptoze

Još poznat i pod nazivom eng. *death receptor-dependent*, ekstrinzični put apoptoze se bazira na vanjskim utjecajima. Najčešća aktivacija je preko liganada smrti (eng. *death ligands*) TNF obitelji (eng. *tumour necrosis factor*) koji se vežu za receptore smrti (eng. *death receptor*) TNFR (eng. *tumour necrosis factor receptor*) obitelji na staničnoj membrani. Receptori smrti su transmembranski proteini koji unutar stanice sadrže protein-protein interakcijsku domenu pod nazivom domena smrti (eng. *death domain*, DD). Najčešći oblici receptor-ligand odnosa koji uzrokuju aktivaciju ekstrinzičnog puta apoptoze su TNFR1-TNF α , TRAILR-TRAIL (eng. *TNF related apoptosis inducing ligand*) i FAS-FasL (23). Prilikom vezanja pripadajućeg liganada smrti za receptor smrti, dolazi do konformacijskih promjena samog proteina, čime DD postaje otvorena za vezanje. Prokaspaza 8 se veže za DD preko svoje DED (eng. *death-inducing domain*), čime nastaje DISC (eng. *death-inducing signal complex*). Vezanog na DISC se još nalazi i FAS-asocirana (eng. FAS-associated death domain, FADD) ili TNF receptor-asocirana domena smrti (TRADD) koja pomaže u ostvarivanju interakcije između prokaspaze 8 i DISC-a. Nakon stvaranja ovog kompleksa, dolazi do aktivacije prokaspaze 8 u kaspazu 8 koja zatim inducira apoptozu ili preko cijepanja i aktivacije izvršnih kaspaza ili preko aktivacije proapoptotskih proteina čime u isto vrijeme djeluju i ekstrinzični i intrinzični putovi apoptoze (20,23,24).

1.7.1.3. PARP-1

PARP-1 (eng. *poly(ADP-ribose) polymerase*) je nuklearni protein čija je glavna uloga popravak oštećenja na DNK. Osim toga, koristi se i kao glavni

pokazatelj apoptoze. Prilikom aktivacije apoptoze, kaspaze cijepaju velik broj proteina, među kojima je i PARP-1. Time nastaju dva fragmenta: katalitički fragment velik 89 kDa, koji više nema mogućnost vezanja za DNK i prelazi u citoplazmu, i DNK vezujuća domena velika 24 kDa, koja ostaje nepovratno vezana za DNK i onemogućava djelovanje aktivnih molekula PARP-1 i drugih enzima zaslužnih za popravak DNK (25).

1.7.2. Autofagija

Autofagija je jedan od procesa stanične smrti gdje dolazi do sažimanja staničnih organela i komponenti u lizosome koji ih onda degradiraju, te se stanični ostaci zatim ili recikliraju u nove stanične komponente ili služe kao izvor energije nakon kompletne razgradnje. Najčešći aktivatori autofagije su nedostatak nutrijenata ili signali koje šalju oštećeni organeli na svojim površinama. Autofagija se dijeli na tri glavne podvrste; 1.) makroautofagija, gdje dolazi do prožimanja velikih dijelova stanice u autofagosome koji se zatim vežu za lizosome i tvore autofagolizosome koji razgrađuju stanične komponentne pomoću proteaza unutar lizosoma, 2.) mikroautofagija, gdje se prožimaju samo određeni organeli i spajaju s lizosomima, stoga je specifičnija opcija, i 3.) selektivna autofagija, koja koristi šaperone za dovoz organela do lizosoma kako bi se spojili. Jedan od glavnih proteina u autofagiji je LC3 (eng. *lipidated microtubule-associated protein light chain 3*) kojeg pronalazimo u LC3-I i LC3-II obliku. Oba oblika sudjeluju u formaciji autofagosoma i njegovoj elongaciji, kako bi mogli obuhvatiti ciljani stanični materijal i vezati se za liposom za degradaciju (20,26). LC3 se koristi kao biljeg za autofagiju, s obzirom na njegovu ugradnju u vanjske i unutarnje slojeve autofagosomalnih membrana. Mjerenjem ekspresije LC3 moguće je kvantificirati formaciju autofagosoma i prisutnost autofagije (27). Osim LC3, važni su i PI3K kompleks (fosfoinozimid 3 kinaza) i kompleks građen od ATG5, ATG12 i ATG16L koji uz LC3 tvore autofosome (20,26). Autofagija je obično proces koji se aktivira prilikom pokušaja preživljenja

stanice, ali se kod karcinoma prikazuje na dva načina; s obzirom na sam tumor i tumorske stanice, autofagija može uzrokovati staničnu smrt tumorskih stanica kada je aktivirana, ali se može dogoditi i slučaj smrti tumorskih stanica kada autofagija nije prisutna. U nekim slučajevima je moguća i pojava induciranja autofagije od strane tumorskih stanica kao obrana od radijacije i kemoterapeutika, te naposljetku razvoja kemorezistencije, stoga je jedna od mogućih razvoja budućih terapijskih opcija inhibicija autofagije kako bi se inducirala apoptoza u tumorima rezistentnih na apoptozu (24).

1.8. ERK/MAPK signalna kaskada

ERK/MAPK (eng. *extracellular signal-regulated kinase / mitogen-activated protein kinase*) signalna kaskada je jedna od najvažnijih kaskada u stanici, te je vezana uz glavne stanične procese kao što su stanična proliferacija, diferencijacija i dioba. ERK je jedan od proteina koji ima svoju kaskadu unutar MAPK grupe. Pojačana aktivacija ERK signalne kaskade može dovesti do razvoja upala, karcinoma, neuroloških poremećaja, i sl. Unutar ERK/MAPK signalne kaskade sudjeluju sljedeći proteini: Ras – uzvodni aktivirajući protein, Raf (eng. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) – MAP3K (eng. *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), MAPK/ERK kinaza (MEK) – MAPKK (eng. *mitogen-activated protein kinase kinase*), ERK – MAPK, stoga se ova kaskada još naziva i Ras-Raf-MEK-ERK kaskada. Aktivacija kaskade je moguća pomoću izvanstaničnih stimulansa poput čimbenika rasta, citokina i onkogenih koji se vežu za transmembranske receptore poput EGFR (eng. *epidermal growth factor receptor*), čime se aktivira Ras. Aktivirani Ras aktivira Raf, koji fosforilira MEK, te ga ujedno i aktivira. Aktivni MEK zatim fosforilira ERK, aktivirajući ga, čime je omogućena translokacija ERK-a u jezgru gdje dolazi do aktivacije raznih transkripcijskih čimbenika. Ovim procesom ERK/MAPK regulira staničnu proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu i transkripciju (13,28). U HCT116

stanicama korištenim u ovom radu kao model karcinoma debelog crijeva nalazi se K-RAS mutacija. Ciljanjem i modifikacijom Ras/Raf/MEK/ERK signalnog puta fitokemikalijama kao što su rutin i kvercetin omogućuje se poboljšanje učinka kemoterapije.

1.9. FoxO3a

FoxO3a (eng. *forkhead box class O 3a*) je protein koji spada pod skupinu FoxO transkripcijskih faktora zaslužnih za regulaciju energetskeg metabolizma, različitih razvojnih procesa i tumorigeneze. Deregulacija FoxO može uzrokovati nekontroliranu staničnu proliferaciju i nakupljanje DNK oštećenja što naposljetku dovodi do karcinogeneze. Osim navedenih procesa, FoxO3a također inducira transkripciju gena aktivnih u apoptozi, staničnoj proliferaciji te regulira autofagiju. Aktivni, nefosforilirani oblik FoxO3a se nalazi u jezgri, te fosforilacijom postaje inaktivan, veže se za 14-3-3 proteine i izlazi iz jezgre u citoplazmu gdje se ubikvitinira i razgrađuje. ERK je jedna od kinaza koja može fosforilirati FoxO3a te tim procesom uzrokovati karcinogenezu (29).

2. Cilj rada

Iako su kirurški zahvati, radijacija i kemoterapija najčešće korišteni oblici liječenja karcinoma, fitokemikalije su jedna od vodećih opcija novih načina liječenja čiji se utjecaji neprestano istražuju na različitim modelima i vrstama karcinoma. Cilj ovog rada je bio istražiti protutumorsko djelovanje dvije fitokemikalije, rutina i kvercetina, na stanice karcinoma debelog crijeva te njihovo djelovanje u kombinaciji s već poznatim kemoterapeutikom, 5-FU. Također, primjenjujući kombinirane tretmane fitokemikalija s 5-FU, uspoređeno je protutumorsko djelovanje i razlika u ekspresiji sinergističkog djelovanja između rutina u kombinaciji s 5-FU i kvercetina u kombinaciji s 5-FU te se na temelju dobivenih rezultata očitavalo koja kombinacija ima jači protutumorski utjecaj na staničnu liniju HCT116. Koristeći Western blot analizu istražen je i način protutumorskog djelovanja navedenih fitokemikalija, odnosno izazivaju li rutin i kvercetin te njihove kombinirane terapije apoptozu, autofagiju i aktivaciju/inhibiciju ERK i FoxO3a signalnih putova na HCT116 staničnoj liniji.

Kako bi se došlo do odgovora na postavljene ciljeve, odabrane su koncentracije fitokemikalija i kemoterapeutika koje su uzrokovale stanični odgovor bez kompletne eliminacije tumorskih stanica. Stanice su tretirane zasebno kemoterapeutikom, fitokemikalijama te u kotretmanima i testirane na smanjenje stanične vijabilnosti, izražaj i lokalizaciju različitih proteina važnih za procese apoptoze, autofagije i drugih staničnih procesa vezanih uz supresiju rasta tumorskih stanica.

Glavna hipoteza ovog rada glasi: Kombinacijska terapija fitokemikalijama rutin i kvercetin s 5-FU-om će imati jače protutumorsko djelovanje na tumorske stanice kolona nego pojedinačna primjena 5-FU zahvaljujući sinergističkom citotoksičnom djelovanju.

3. Materijali i metode

3.1. Stanične linije

Stanice raka crijeva, HCT116 (*American Type Culture Collection, ATCC*) su uzgajane u McCoy 5A mediju uz 10% fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum, FBS*), 2mM L-glutamin, 100 mg/L streptomycin i 100000 U/L penicilin (Lonza; Verviers, Belgija) u inkubatoru za stanice (*S-Bt Smart Biotherm Compact CO₂ Incubator*, BioSan; Latvija) pri vlažnoj atmosferi i na 37°C i 5% CO₂. Kako bi mogli koristiti stanice za daljnje eksperimente, prvo su isprane fosfatnim puferom (eng. *phosphate-buffered saline, PBS*), zatim tripsinizirane s 2-3 ml tripsina kako bi ih odlijepili s dna posude i razrijeđene na koncentraciju 1×10^5 stanica po ml, te nasađivane na pločicu s 96/24 jamica (eng. *96-well plate*, TPP; Trasadingen, Švicarska) ili na 10cm²/25cm²/75cm² posude (*BioLite Flask, Vented*, Thermo Fisher Scientific; Rochester, NY, SAD), ovisno o analizi. Brojanje i određivanje koncentracije stanica po ml je postignuto korištenjem Neubauer komore za brojanje stanica (Roth; Karlsruhe, Njemačka) i mikroskopa (Invertni mikroskop OCO-2 255 Halogen, KERN Optics; Balingen-Frommern, Njemačka).

3.2. Tretmani stanica

Prije dodatka tretmana, stanice su nakon nasađivanja održavane u mediju s dodatcima do postignuća 80% konfluencije. Nakon 24 sata, medij je odstranjen te su na stanice dodani medij (kontrola) i medij s različitim koncentracijama rutina (u daljnjem tekstu korištena kratica i oznaka R, Selleckchem; Houston, TX, SAD). Odabran je raspon koncentracija od 100 µM do 1000 µM, povećavajući se za svaku stoticu. Rutin je prethodno otopljen u dimetilsulfoksidu (DMSO, Sigma-Aldrich; Steinheim, Njemačka) kako bi se postigla njegova konačna koncentracija koja je korištena u tretmanu. Stanice su tretirane 24h.

Navedeni postupak je ponovljen za kvercetin (Q, Sigma-Aldrich; Steinheim, Njemačka) i 5-FU (5, Sigma-Aldrich; Steinheim, Njemačka). Korištene koncentracije tretmana za svaki spoj su sljedeće: kvercetin: 100–1000 μM , povećavajući se za svaku stoticu; 5-FU: 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM . Navedeni rasponi koncentracija za tretmane su odabrani sukladno fizikalno-kemijskim svojstvima svakog spoja. Svi eksperimenti su provedeni u triplikatima.

3.3. Test stanične vijabilnosti

Za određivanje IC_{50} sva tri spoja i staničnu vijabilnost nakon 24-satnog tretmana stanica, korišten je komercijalni kit za određivanje stanične vijabilnosti 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolij-5-karboksanilid (XTT) (#9095 Cell Signaling Technology; Beverly, MA, SAD). XTT test je kolorimetrijski test koji se služi promjenom boje kao indikatorom vijabilnosti stanice. XTT je tetrazolijeva sol žute boje koja prelazi u žarko narančastu formazan boju kada se reducira pomoću mitohondrijskih dehidrogenaza u živim stanicama. Iz toga slijedi da je količina vijabilnih stanica proporcionalna količini formazanske boje u uzorku. XTT otopina koja se koristi u testu se sastoji od otopine za spajanje elektrona (eng. *electron coupling solution*, ECL) i XTT reagensa koji se miješaju u omjeru 1:50. Nakon pripreme XTT otopine, nanosena je na stanice nakon 24-satnog tretmana; 50 μl XTT otopine na 200 μl medija u svaku jamicu sa stanicama. Uz stanice je nanosena i slijepa proba: medij bez stanica s XTT otopinom. Kako bi mogli kvantitativno prikazati rezultate XTT testa, pločica sa stanicama nakon nanošenja XTT otopine se očitava spektrofotometrijski na 450 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (BioTek Elx808; Winooski, VT, SAD). Uređaj mjeri apsorbanciju uzorka na zadanoj valnoj duljini uz inkubaciju na 37°C. Rađena su tri čitanja svakih sat vremena od nanošenja XTT otopine te je za sve eksperimente korišteno čitanje nakon 3 sata. Dobivene vrijednosti su obrađene u Microsoft Excel programu te je cijeli

proces ponovljen za sva tri spoja. Odabrane su vrijednosti iznad IC_{50} , odnosno vrijednosti gdje je vijabilnost stanica u uzorku 60-70%. Odabrane su sljedeće koncentracije: rutin: 200 μ M, kvercetin: 200 μ M, 5-FU: 200 μ M, koje su korištene u daljnjim eksperimentima i mjerenjima. Istom metodom su određene i koncentracije kombinacija tretmana korištene u daljnjim eksperimentima.

3.4. Izolacija proteina i priprema uzoraka za Western blot analizu i imunofluorescenciju

Stanice su nasađene u Petrijeve zdjelice u 15 ml McCoy 5A medija uz penicilin, streptomycin, L-glutamin i FBS u prethodno navedenim koncentracijama i držane 24h u inkubatoru. Koncentracija stanica koja je korištena je 2.5×10^5 stanica po ml kako bi se postigla slična pokrivenost kao i za test stanične vijabilnosti, uzgajane su do 80% konfluentnosti. Pripremljene su sljedeće otopine spojeva: rutin (200 μ M), kvercetin (200 μ M), rutin u kombinaciji/ili kotretmanu s 5-FU (R+5, 200 μ M + 200 μ M), kvercetin u spoju s 5-FU (Q+5, 200 μ M + 200 μ M) kojima su tretirane stanice. Nakon 24 sata, stanice su izvađene iz inkubatora i prikupljene u Falcon epruvete od 50 ml metodom „grebanja“ (eng. *scraping*). Korišten je strugač stanica (eng. *cell scraper*) kako bi se ostrugale stanice s dna Petrijeve zdjelice i prenijele u Falcon epruvetu zajedno s medijem. Zatim su zdjelice isprane dva puta pomoću 5 ml PBS-a uz grebanje kako bi se pokupio ostatak stanica. Ukupno je dobiveno ~25 ml otopine za svaki spoj i kombinaciju spojeva, uz kontrole. Prikupljene stanice su centrifugirane u centrifugi (Hettich Rotina 420R, Hettich Instruments; Beverly, MA, SAD) na 1800 revolucija po minuti (rpm) 5 minuta. Supernatant je dekantiran te je stanični pelet resuspendiran u 1 ml PBS-a i prebačen u plastične epruvete od 1.5 ml (Eppendorf; Hamburg, Njemačka). Dobivene otopine su ponovno centrifugirane na 3200 rpm 6 minuta pri 4°C. Nakon centrifugiranja, ponovno je odpipetiran supernatant te su stanični peleti resuspendirani u

150 µl (tri puta veći volumen od samog peleta) RIPA pufera (eng. *radioimmunoprecipitation assay buffer*, sc-24.948, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, SAD) uz inhibitore proteaza i fosfataza (PhosSTOP, Roche; Basel, Švicarska). Epruvete su postavljene na led i na tresilicu (*Digital Orbital Shaker*, Heathrow Scientific; VernonHills, IL, SAD) 1 sat. Zatim su stanice centrifugirane na 15000 rpm 1 sat pri 4°C. Nakon centrifugiranja, supernatant – proteinski lizat je prebačen u prethodno ohlađene nove epruvete.

Kako bi se odredila koncentracija proteina u dobivenim uzorcima, korišten je *Pierce bicinchoninic acid (BCA) Rapid Gold Kit* (Thermo Scientific Pierce; Rockford, IL, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, određivanje koncentracije proteina pomoću BCA je omogućeno zahvaljujući reagensima A i B koji se miješaju u omjeru 50:1 i nanose na uzorke. Uzorci proteina količine 2.5 µl nanoseni su na 96-well pločicu u duplikatu. Zatim je dodano 22.5 µl PBS-a (10x razrjeđenje uzorka). Slijepa proba iznosi 25 µl čistog PBS-a. Zatim je dodano 200 µl mješavine BCA reagensa u jamice s uzorcima i inkubirano na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon inkubacije se spektrofotometrijski očitava apsorbancija uzoraka u čitaču mikrotitarskih pločica na 490 nm. Dobivene vrijednosti apsorbanci preračunate su prema baždarnom pravcu te su dobivene koncentracije proteina. Koncentracije proteina u uzorcima izjednačene su na istu vrijednost.

Prilikom pripreme uzoraka za imunofluorescenciju, prvi korak je bio nasaditi stanice na stakla unutar jamica 24-well pločice tako da se stanice vežu i zalijepe za površinu stakalca. Koncentracija stanica korištena za nasađivanje na stakla iznosila je 1×10^5 stanica po ml. Korišteno je 500 µl stanica s medijem po stakalcu tj. jamici. Nakon 24 sata u inkubatoru, stanice su izvađene i tretirane s već prethodno određenim koncentracijama spojeva i njihovih kombinacija (R, Q, 5-FU, R+5, Q+5, 2x kontrola) 24 sata u inkubatoru.

3.5. Western blot

Western blot analiza je korištena kako bi se saznala prisutnost i izražaj određenih proteina u uzorcima. Prvi korak u određivanju proteina od interesa je bila priprema gelova za SDS-poliakrilamid gel elektroforezu (SDS-PAGE). Korišteni su 8%, 10%, 12.5% i gradijentni gelovi sastavljeni od Tris-HCl (pH=8.8 za donji gel, pH=6.8 za gornji gel), akrilamida (40%, Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Njemačka), 20% natrijevog dodecilsulfata (SDS), amonijevog persulfata (APS), TEMED (tetrametiletilendiamin, Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Njemačka) kako bi se dobili željeni postotci gelova ovisno o veličini željenog proteina za njihovo razdvajanje iz uzorka.

Tablica 1. Protokol za pripremu 8%-tnog gela

Donji gel (8%):

upH2O	5352 μ l
TRIS – HCl	4880 μ l
AA	2598 μ l
20% SDS	65 μ l
APS	62,5 μ l
TEMED	13 μ l

Tablica 2. Protokol za pripremu 10%-tnog gela

Donji gel (10%):

upH2O	2405 μ l
TRIS – HCl	2500 μ l
AA	1665 μ l
20% SDS	35 μ l
APS	35 μ l
TEMED	7 μ l

Tablica 3. Protokol za pripremu 12.5%-tnog gela

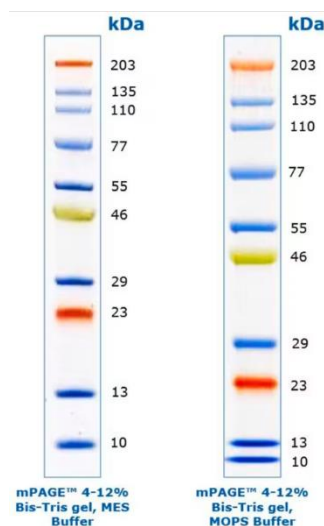
Donji gel (12,5 %):

upH2O	3890 μ l
TRIS – HCl	4875 μ l
AA	4055 μ l
20% SDS	65 μ l
APS	62,5 μ l
TEMED	13 μ l

Tablica 4. Protokol za pripremu gradijentnog i gornjeg (5%) gela

Donji gel (12,5%)		Donji gel (8%)		Gornji gel (5%)	
upH ₂ O	2431 µl	upH ₂ O	3345 µl	upH ₂ O	5165 µl
TRIS – HCl	3050 µl	TRIS – HCl	3050 µl	TRIS – HCl	875 µl
AA	2537,5 µl	AA	1625 µl	AA	788 µl
20% SDS	40,5 µl	20% SDS	40,5 µl	20% SDS	35 µl
APS	39 µl	APS	39 µl	APS	35 µl
TEMED	8 µl	TEMED	8 µl	TEMED	7 µl

Prethodno dobiveni uzorci proteina iz stanica tretiranih odabranim spojevima i njihovim kombinacijama su pomiješani s mješavinom Laemmli 2x pufer (500 µl, #1610737EDU, BioRad; Hercules, CA, SAD) i β-merkaptetanol (25 µL) (*Pierce 2-Mercaptoethanol*; Thermo Fisher Scientific; Rochester, NY, SAD) u omjeru 1:1 (22 µl proteini + 22 µl Laemmli 2x + β-merkaptetanol) kako bi uzorci bili spremni za nanošenje na gel. Zatim su uzorci promiješani, stavljeni u vodenu kupelj na 95°C 5 minuta kako bi se denaturirali, ponovno promiješani i centrifugirani. Takvi uzorci su nanoseni na poliakrilamidni gel postavljen u kadu za elektroforezu na hladnom i pušteni razdvajanju na 120–180 V 180 minuta. Osim uzoraka, na gel je nanosen i marker mPAGE Color Protein Standard (Millipore, Merck, Sigma-Aldrich; Steinheim, Njemačka).

**Slika 6. Izgled mPAGE Color Protein Standard markera (30)**

Gelove s razdvojenim proteinima je zatim potrebno transferirati na PVDF membrane (*Aversham Hybond-P polyvinylidene fluoride blotting membrane*, GE Healthcare Life Sciences; Buckinghamshire, UK) u posebnom transfer puferu koji sadrži potrebnu količinu metanola, s obzirom na veličinu proteina, kako bi transfer bio uspješan. Transfer je postavljen na 17 V 45 minuta. Za blokiranje membrane je korišteno mlijeko u prahu bez masti (BioRad; Hercules, CA, SAD) otopljeno u TBS-T-u (TBS – fiziološka otopina s Tris puferom, eng. *Tris-buffered saline*, 1% T- Tween-20, Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Njemačka). Membrane s puferom za blokiranje su stavljene na tresilicu 1 sat na sobnoj temperaturi. Potom su membrane isprane s TBS-T-om te je stavljeno željeno protutijelo za protein od interesa na membranu 2 sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Korištena su primarna protutijela na sljedeće proteine: kaspaza-3 (Asp175, 1:1000, #9661), kaspaza-8 (Asp391, 1:1000, #9496), prokaspaza-8 (D35G2, 1:1000, #4790) FoxO3a (1:1000, 75D8, #2497), fosforilirani FoxO3a (p-FoxO3a, 1:1000, Ser294, #5538), LC3-I/II (1:1000, #2775), p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000, #4695), fosforilirani p44/42 MAPK (p-Erk1/2) (1:2000, #4370), PARP (1:500, #9542) (Cell Signaling Technology; Beverly, MA, SAD), prokaspaza-9 (1:1000, ab185719) (Abcam). Nakon ispiranja membrana tri puta s TBS-T-om po 10 minuta, stavljeno je sekundarno protutijelo, odgovarajuće primarnom protutijelu. U slučaju navedenih primarnih protutijela, HRP-konjugirano sekundarno protutijelo koje je korišteno je kozje poliklonalno protu-zečje (eng. *goat polyclonal anti-rabbit*) IgG protutijelo (ab6721, 1:80000, Abcam). Membrane su ponovno inkubirane na tresilici i sobnoj temperaturi 1 sat sa sekundarnim protutijelom. Zatim su ponovno ispirane tri puta po 10 minuta s TBS-T-om te pripremljene za slikanje. Za slikanje je korišten SignalFire Elite ECL Reagents (#12757, Cell Signaling Technology; Beverly, MA, SAD) kako bi bilo moguće detektirati kemiluminiscentni signal.

3.6. Imunofluorescencija

Imunofluorescencija je korištena radi vizualizacije i lokalizacije odabranih proteina koji sudjeluju u staničnim procesima od interesa. Stanice su pripremljene i tretirane po prethodno navedenom postupku. Nakon tretmana, stakla su izvađena i odstranjen je medij iz jamica, te su stakla isprana s PBS-om tri puta. Na stakla je zatim stavljen 100% metanol (-20°C) 15 minuta u ledu kako bi se stanice fiksirale. Metanol je zatim aspiriran i stakla su ponovno ispirana tri puta u PBS-u. Sljedeće ispiranje je bilo s PBB-om (PBS + 0.5% BSA (eng. *bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich; Steinheim, Njemačka)) pet puta prije blokiranja s 2% BSA 45 minuta. Dodano je primarno protutijelo otopljeno u PBB-u; korišteno je primarno protutijelo na FoxO3a u razrjeđenju 1:200, 100 µl po stakalcu. Zatim su stakla inkubirana s primarnim protutijelom preko noći vlažnoj komori. Stakla su ponovno isprana pet puta PBB-om, zatim je dodano sekundarno kozje protu-zečje IgG H&L protutijelo (Alexa Fluor 488, ab150077, Abcam) i inkubirano 1 sat. Zadnje ispiranje je tri puta s PBB-om, nakon čega dolazi bojanje stakala s Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich; Steinheim, Njemačka) i adheriranje stakla na predmetna stakalca pomoću Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich; Steinheim, Njemačka). Tako pripremljena predmetna stakalca sa stanicama su promatrana i slikana pomoću fluorescentnog mikroskopa (povećanje 100x, Olympus IX73; Tokyo, Japan), nakon čega su slike obrađene pomoću programa ImageJ (NIH; Bethesda, MD, SAD).

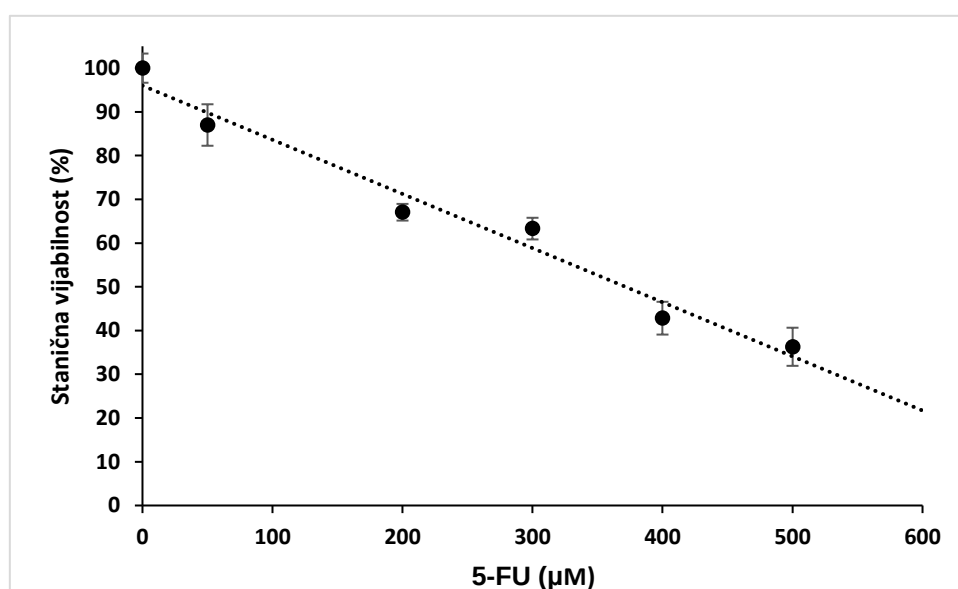
3.7. Statistička analiza

Izračuni IC₅₀ odabranih spojeva unutar programa Microsoft Excel su napravljeni preko linearne regresijske analize. Ostali podaci su analizirani pomoću StatSoft STATISTICA 13 programa (StatSoft Inc.; Tulsa, SAD). Statističke razlike između grupnih središnjih vrijednosti su izračunate pomoću jednosmjerne ANOVA-e (engl. *One-way analysis of variance*). Tukey-ev post hoc test je korišten za usporedbe nekoliko grupa i njihovih tretmana. Razlike s $p < 0.05$ su smatrane statistički značajne.

4. Rezultati

4.1. Utjecaj 5-FU-a na staničnu vijabilnost HCT116

Iako su već poznati učinci i djelovanje 5-FU-a na širok raspon staničnih linija, odrađeno je istraživanje utjecaja 5-FU-a na staničnu vijabilnost i metaboličku aktivnost HCT116 nakon 24-satnog tretmana koristeći XTT test. U slučaju 5-FU-a izazivano je značajno smanjenje stanične vijabilnosti i metaboličke aktivnosti povećanjem doze tretmana (Slika 7). Linearnom regresijom određena je doza IC_{50} za 5-FU u 24-satnom tretmanu koja iznosi $371.62 \mu M$. Za daljnje eksperimente, odabrana je koncentracija 5-FU-a od $200 \mu M$ koja korespondira s ~70% stanične vijabilnosti.



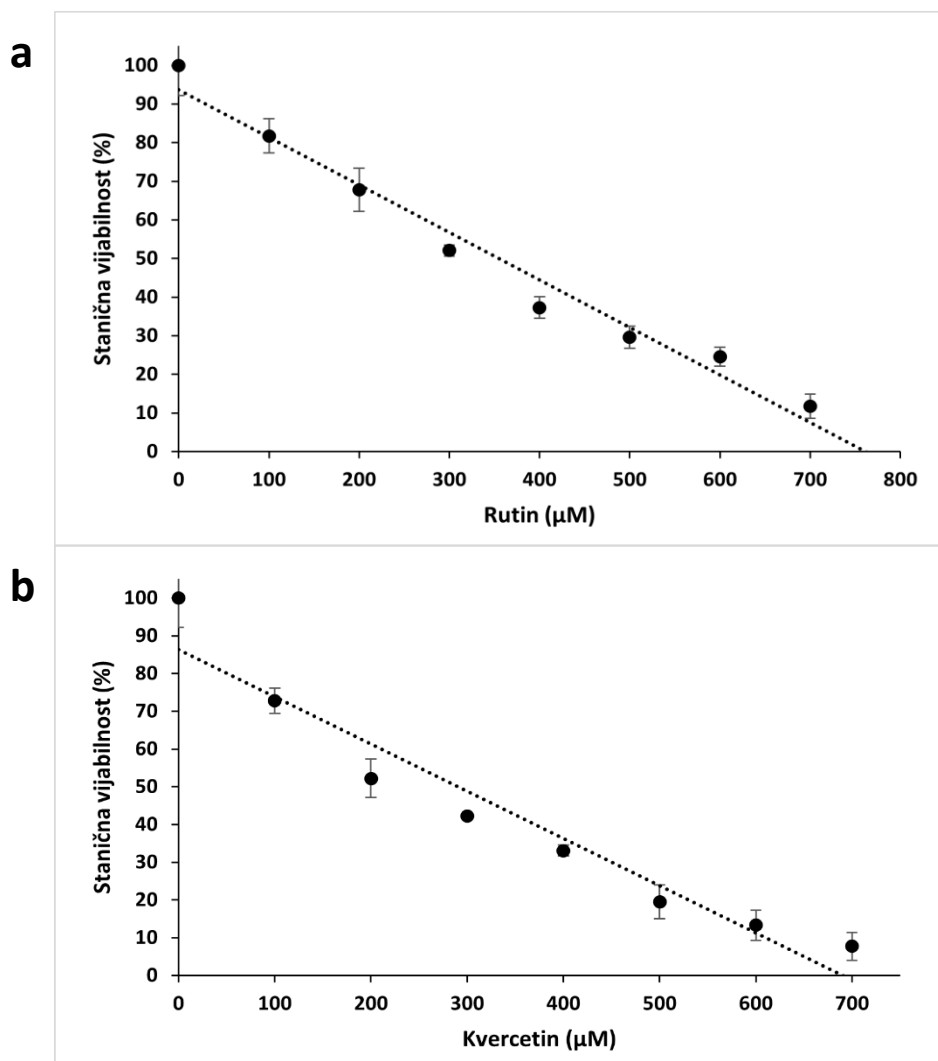
Slika 7. Utjecaj 5-FU-a na staničnu vijabilnost HCT116 stanične linije nakon 24-satnog tretmana. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija.

4.2. Utjecaj rutina i kvercetina na staničnu vijabilnost HCT116

Kako bi se istražio citotoksični utjecaj rutina i kvercetina na staničnu proliferaciju i vijabilnost stanične linije HCT116, te istražila promjena u metaboličkoj aktivnosti stanica, korišten je XTT test nakon 24-satnog tretmana.

Rutin je znatno smanjio broj stanica i staničnu vijabilnost te staničnu metaboličku aktivnost (Slika 8a). Kao i kod 5-FU, stanična vijabilnost obrnuto je proporcionalna dozi primijenjene fitokemikalije. Linearnom regresijom određena je doza IC_{50} za rutin u 24-satnom tretmanu koja iznosi 355 μM . Za daljnje eksperimente, odabrana je koncentracija rutina od 200 μM koja korespondira s ~70% stanične vijabilnosti.

U slučaju kvercetina, također je vidljivo značajno smanjenje stanične vijabilnosti i metaboličke aktivnosti nakon 24-satnog tretmana HCT116 stanične linije. U usporedbi s rutinom, kvercetin prikazuje izražajniju promjenu u staničnoj vijabilnosti i metaboličkoj aktivnosti (Slika 8b). Linearnom regresijom određena je doza IC_{50} za kvercetin u 24-satnom tretmanu koja iznosi 290,8 μM . Za daljnje eksperimente, odabrana je koncentracija kvercetina od 200 μM koja korespondira s ~50% stanične vijabilnosti.



Slika 8. Utjecaj rutina (a) i kvercetina (b) na staničnu vijabilnost HCT116 stanične linije nakon 24-satnog tretmana. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija.

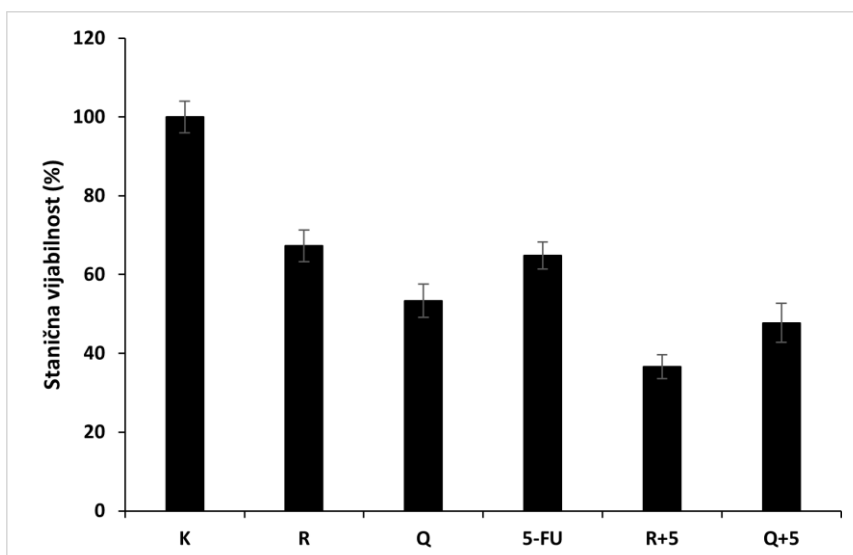
Uspoređujući tri individualna tretmana međusobno, 5-FU je uzrokovao sveukupno najslabiji utjecaj na smanjenje stanične vijabilnosti, s najvišom IC_{50} vrijednosti između sva tri spoja i njihovih tretmana, dok je kvercetin imao najjači utjecaj na staničnu vijabilnost i metaboličku aktivnost stanica s najnižom IC_{50} vrijednosti te je sukladno tome djelovao najučinkovitije od sva tri tretmana na smanjenje stanične proliferacije tumorskih stanica. Uspoređujući rutin i kvercetin zasebno, vidljiv je jači citotoksični utjecaj kvercetina naspram rutina u istoj dozi, gdje kvercetin izaziva smanjenje stanične vijabilnosti na približno 50% već pri koncentraciji od 200 μM , dok

rutin postiže smanjenje za 50% pri koncentraciji od 300 μ M. Sukladno tome, kvercetin predstavlja bolju terapijsku opciju od rutina.

4.3. Utjecaj rutina, kvercetina, 5-FU-a i njihovih kombinacija na staničnu vijabilnost HCT116

Za istraživanje citotoksičnog utjecaja rutina, kvercetina, 5-FU-a, te njihovih kombinacija pri odabranim koncentracijama na vijabilnost stanične linije HCT116 uz promjenu u staničnoj metaboličkoj aktivnosti, korišten je XTT test nakon 24-satnog tretmana (Slika 9).

Rutin i 5-FU u zasebnim tretmanima pri koncentraciji od 200 μ M su izazvali značajno smanjenje stanične vijabilnosti u usporedbi s kontrolom, ali su imali najslabiji utjecaj od svih tretmana na vijabilnost stanica i njihovu metaboličku aktivnost, snižavajući ju na približno 70%. Kvercetin u zasebnom tretmanu i kvercetin u kombinaciji s 5-FU također prikazuju značajno smanjenje stanične vijabilnosti u usporedbi s kontrolom, snižavajući ju na približno 60%. Rutin u kombinaciji s 5-FU-om je izazvao najmanji postotak stanične vijabilnosti, odnosno imao je najjači učinak među svim tretmanima, te je vidljiva značajna smanjenost u broju i vijabilnosti stanica u usporedbi s kontrolom. Kombinacijske terapije rutina i kvercetina s 5-FU su izazvale najjači citotoksični utjecaj u usporedbi s individualnim tretmanima, od kojih je rutin u kombinaciji s 5-FU-om imao jači utjecaj od kvercetina u kombinaciji s 5-FU-om.



Slika 9. Utjecaj rutina, kvercetina, 5-FU-a i njihovih kombinacija pri odabranim koncentracijama na staničnu vijabilnost HCT116 stanične linije nakon 24-satnog tretmana. Korišten je XTT test za određivanje metaboličke aktivnosti stanica i njihove vijabilnosti. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija nakon tri zavisna mjerenja.

4.4. Izračun relativne ekspresije proteina pomoću Western blot analize

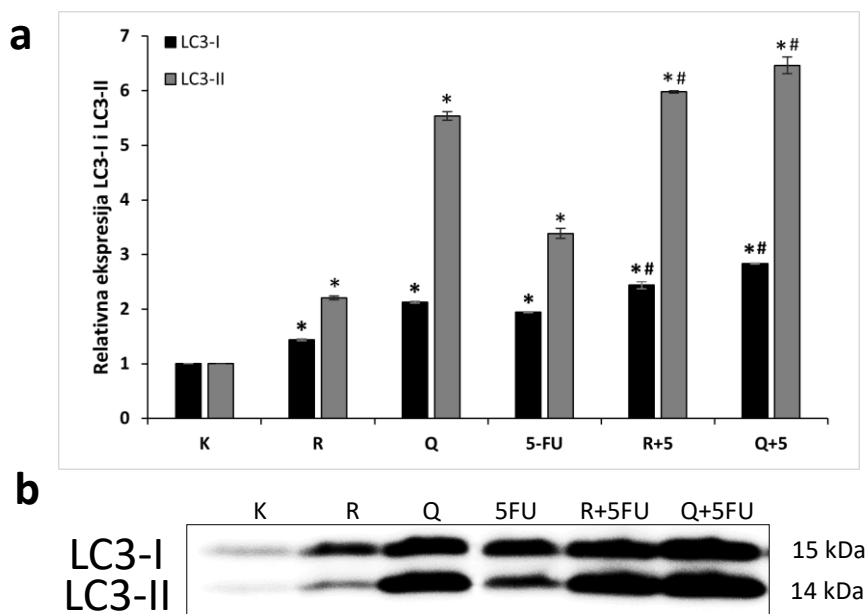
Nakon odabira koncentracija i tretiranja stanica s novim koncentracijama spojeva i njihovih kombinacija, te izolacije proteina, korišten je Western blot za određivanje ekspresije proteina vezanih uz apoptozu i autofagiju.

4.4.1. Utjecaj tretmana i kombiniranih tretmana na autofagiju

Kako bi se istražio utjecaj rutina, kvercetina, 5-FU i njihovih kombinacija na autofagiju, korišten je Western blot za određivanje relativne ekspresije LC3-I/II (Slika 10).

U slučaju svih tretmana vidljiv je značajan porast u ekspresiji LC3 proteina, uz povišenu ekspresiju LC3-II u usporedbi s kontrolom. Rutin je uzrokovao najmanji porast u ekspresiji oba oblika LC3 od svih tretmana. 5-FU je

uzrokovao blaži porast oba oblika LC3 proteina. Najveću ekspresiju LC3-II su uzrokovali kvercetin, te rutin i kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om. Kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om je uzrokovao najveću ekspresiju oba oblika proteina u usporedbi s kontrolom, te je sukladno tome imao i najjači učinak na ekspresiju LC3 proteina.



Slika 10. Relativna ekspresija LC3-I i LC3-II u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata.

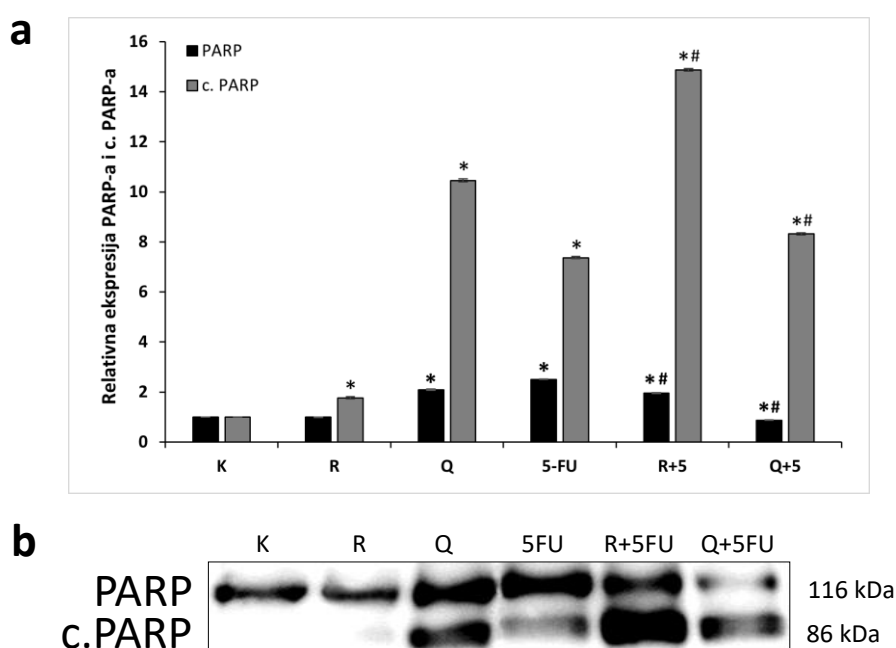
Grafički prikaz relativne ekspresije LC3-I i LC3-II (a) s reprezentativnim imunoblot rezultatima LC3-I i LC3-II (b). Za bojanje membrane je korišteno primarno protutijelo na LC3 i HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo. Za vizualizaciju je korišten SignalFire Elite ECL Reagens. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, $n=3$. Oznake *, # označavaju statistički značajnu razliku između grupa; * = kontrola, # = 5-FU, $p<0.05$.

4.4.2. Utjecaj tretmana i kombiniranih tretmana na apoptozu

Kako bi se istražio utjecaj rutina, kvercetina, 5-FU-a i njihovih kombinacija na apoptozu, korišten je Western blot za određivanje relativne ekspresije PARP (Slika 11), kaspaze 3 (Slika 12), kaspaze 8 (Slika 13) i kaspaze 9 (Slika 14).

4.4.2.1. PARP

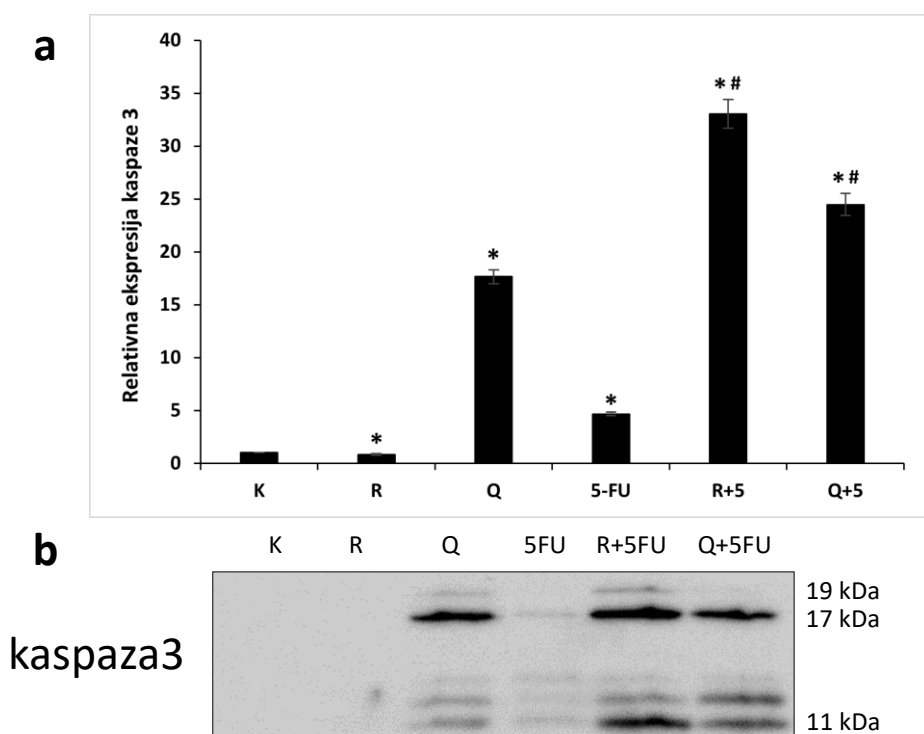
U usporedbi s ostalim tretmanima i kontrolom, rutin je imao najmanju promjenu u ekspresiji PARP-a i cijepanog PARP-a, te ekspresija PARP-a uzrokovana rutinom nema statistički značajne razlike. Kvercetin i 5-FU zasebno te kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om su uzrokovali znatno veću ekspresiju PARP-a i cijepanog PARP-a za razliku od rutina i u usporedbi s kontrolom. Rutin u kombinaciji s 5-FU-om je uzrokovao najveće povećanje u ekspresiji cijepanog PARP-a među svim tretmanima.



Slika 11. Relativna ekspresija PARP-a i cijepanog PARP-a u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata. Grafički prikaz relativne ekspresije PARP-a i cijepanog PARP-a (a) s reprezentativnim imunoblot rezultatima PARP-a i cijepanog PARP-a (b). Za bojanje membrane je korišteno primarno protutijelo na PARP i HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo. Za vizualizaciju je korišten SignalFire Elite ECL Reagents. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, $n=3$. Oznake *, # označavaju statistički značajnu razliku između grupa; * = kontrola, # = 5-FU, $p<0.05$.

4.4.2.2. Kaspaza 3

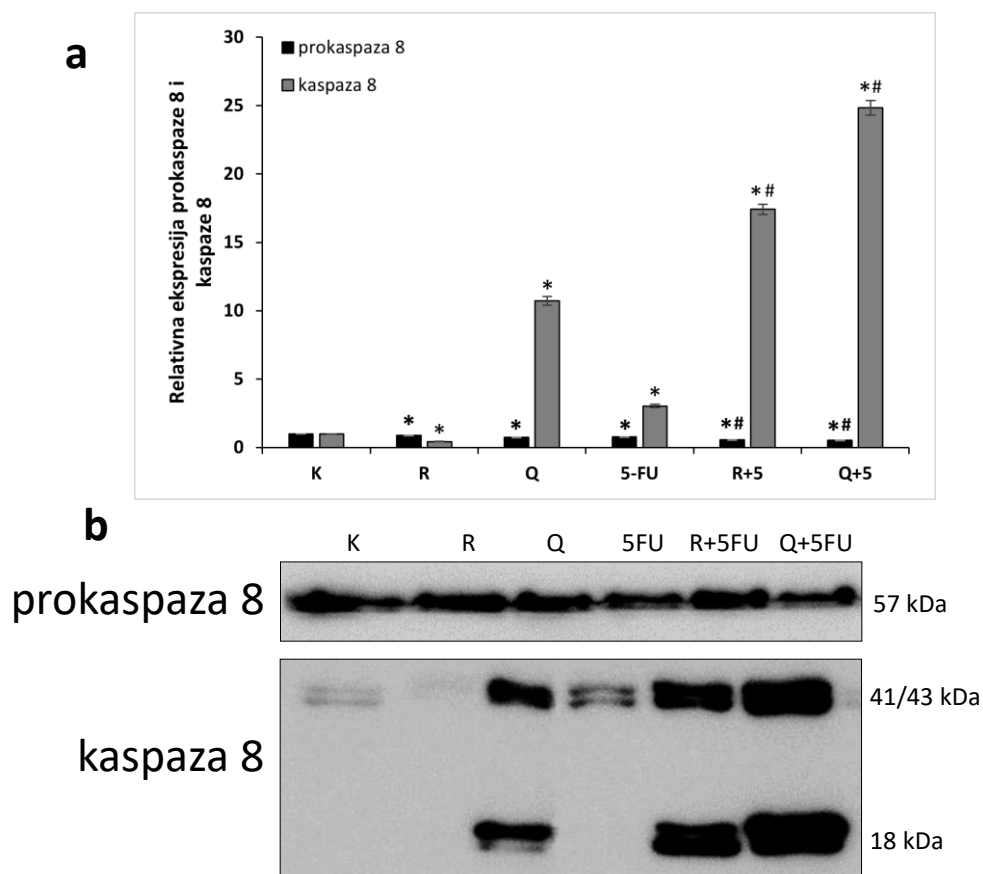
Između svih tretmana, rutin i 5-FU u zasebnim tretmanima su uzrokovali najmanja povećanja u ekspresiji kaspaze 3, ali u usporedbi s kontrolom i dalje sa statistički značajnom razlikom. Kvercetin i kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om su uzrokovali znatno višu ekspresiju aktivne kaspaze 3 u usporedbi s kontrolom. Rutin u kombinaciji s 5-FU-om je uzrokovao najveću ekspresiju kaspaze 3, to jest, imao je najjači učinak na ekspresiju proteina u usporedbi sa svim tretmanima i kontrolom što je u skladu s cijepanim PARP-om i XTT analizom.



Slika 12. Relativna ekspresija kaspaze 3 u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata. Grafički prikaz relativne ekspresije kaspaze 3 (a) s reprezentativnim imunoblot rezultatima kaspaze 3 (b). Za bojanje membrane je korišteno primarno protutijelo na kaspazu 3 uz HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo. Za vizualizaciju je korišten SignalFire Elite ECL Reagens. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, $n=3$. Oznake *, # označavaju statistički značajnu razliku između grupa; * = kontrola, # = 5-FU, $p<0.05$.

4.4.2.3. Prokaspaza 8 i kaspaza 8

Uspoređujući međusobno sve tretmane, vidljiva je statistički značajna smanjena ekspresija prokaspaze 8 u usporedbi s kontrolom. Rutin i 5-FU u zasebnim tretmanima su pokazali najblaže povećanje izražaja kaspaze 8 u usporedbi s kontrolom. Rutin je jedini od svih tretmana koji je uzrokovao smanjenu ekspresiju kaspaze 8 u usporedbi s kontrolom. Kvercetin i rutin u kombinaciji s 5-FU-om su uzrokovali značajno povišenu ekspresiju kaspaze 8 u usporedbi s kontrolom i tretmanom s 5-FU-om. Kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om je uzrokovao najveću promjenu u ekspresiji prokaspaze i kaspaze 8; najnižu ekspresiju prokaspaze 8 te najvišu ekspresiju kaspaze 8. Sukladno tome, kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om je imao najjači učinak na aktivaciju kaspaze 8.

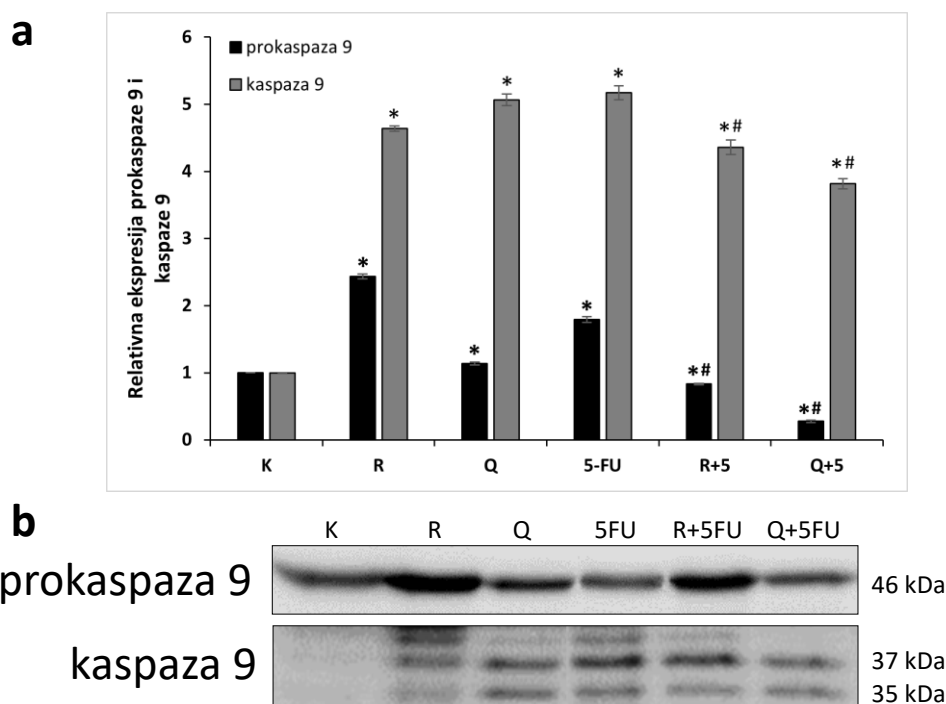


Slika 13. Relativna ekspresija prokaspaze 8 i kaspaze 8 u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata. Grafički prikaz relativne ekspresije prokaspaze 8 i kaspaze 8 (a) s reprezentativnim imunoblot rezultatima prokaspaze 8 i kaspaze 8 (b). Za bojanje membrane korištena su primarna protutijela na prokaspazu 8 i kaspazu 8 uz HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo. Za vizualizaciju je korišten SignalFire Elite ECL Reagens. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, $n=3$. Oznake *, # označavaju statistički značajnu razliku između grupa; * = kontrola, # = 5-FU, $p<0.05$.

4.4.2.4. Prokaspaza 9 i kaspaza 9

Svi tretmani su postigli statistički značajno povećanje u ekspresiji kaspaze 9. Rutin u zasebnom tretmanu je uzrokovao najveću promjenu među svim tretmanima, postižući značajno povećanje, te ujedno i najveće, u ekspresiji prokaspaze 9 u usporedbi s kontrolom. 5-FU je imao sličan učinak na

ekspresiju proteina kao i rutin, s najvećom ekspresijom kaspaze 9 u usporedbi s kontrolom. Kvercetin prati rutin i 5-FU u povećanoj ekspresiji prokaspaze i kaspaze 9 naspram kontrole. Rutin u kombinaciji s 5-FU-om te kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om su jedini uzrokovali smanjenu ekspresiju prokaspaze 9, dok je kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om imao najslabiji utjecaj na ekspresiju kaspaze 9 od svih tretmana, ali ujedno i najnižu ekspresiju prokaspaze 9.

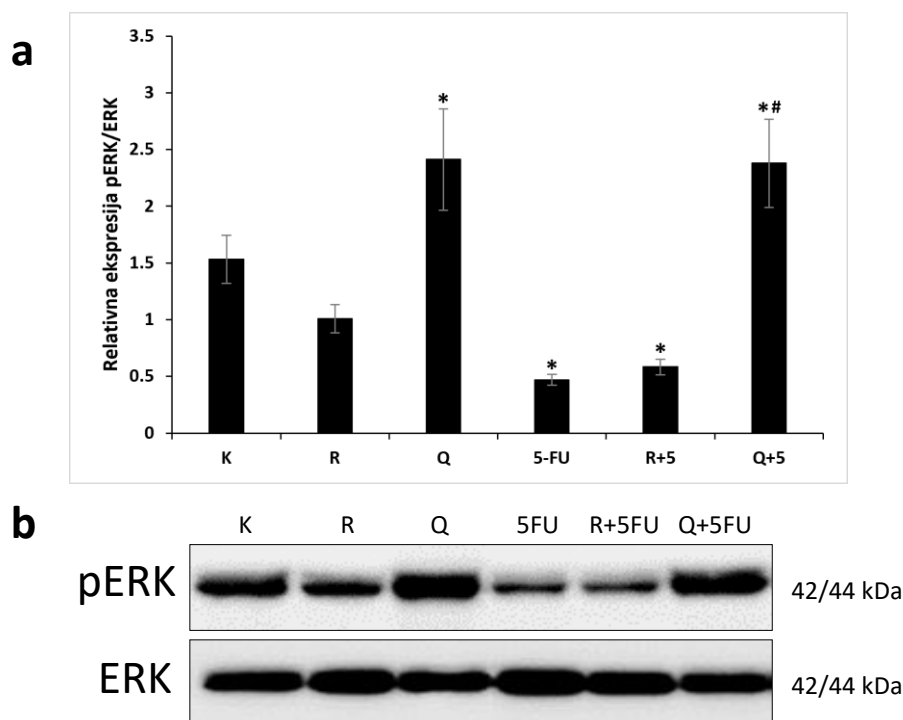


Slika 14. Relativna ekspresija prokaspaze 9 i kaspaze 9 u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata. Grafički prikaz relativne ekspresije prokaspaze 9 i kaspaze 9 (a) s reprezentativnim imunoblot rezultatima prokaspaze 9 i kaspaze 9 (b). Za bojanje membrane korištena su primarna protutijela na prokaspazu 9 i kaspazu 9 uz HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo. Za vizualizaciju je korišten SignalFire Elite ECL Reagens. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, $n=3$. Oznake *, # označavaju statistički značajnu razliku između grupa; * = kontrola, # = 5-FU, $p<0.05$.

4.4.3. Utjecaj tretmana i kombiniranih tretmana na MAPK/ERK signalnu kaskadu

Kako bi se istražio utjecaj rutina, kvercetina, 5-FU-a i njihovih kombinacija na MAPK/ERK signalnu kaskadu, korišten je Western blot za određivanje relativne ekspresije ERK-a, jednog od glavnih proteina u MAPK/ERK signalnoj kaskadi. (Slika 15)

Kvercetin zasebno i kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om su jedini uzrokovali pojačanu aktivaciju ERK-a, tj. pojačani omjer ekspresije fosforiliranog oblika ERK-a (pERK) i ERK-a od svih tretmana u usporedbi s kontrolom. 5-FU zasebno, te rutin u kombinaciji s 5-FU-om su uzrokovali pojačanu inhibiciju fosforilacije ERK-a. Najmanja vijabilnost stanica u kombiniranom tretmanu rutina s 5-FU-om u skladu je s inhibicijom fosforilacije ERK-a.



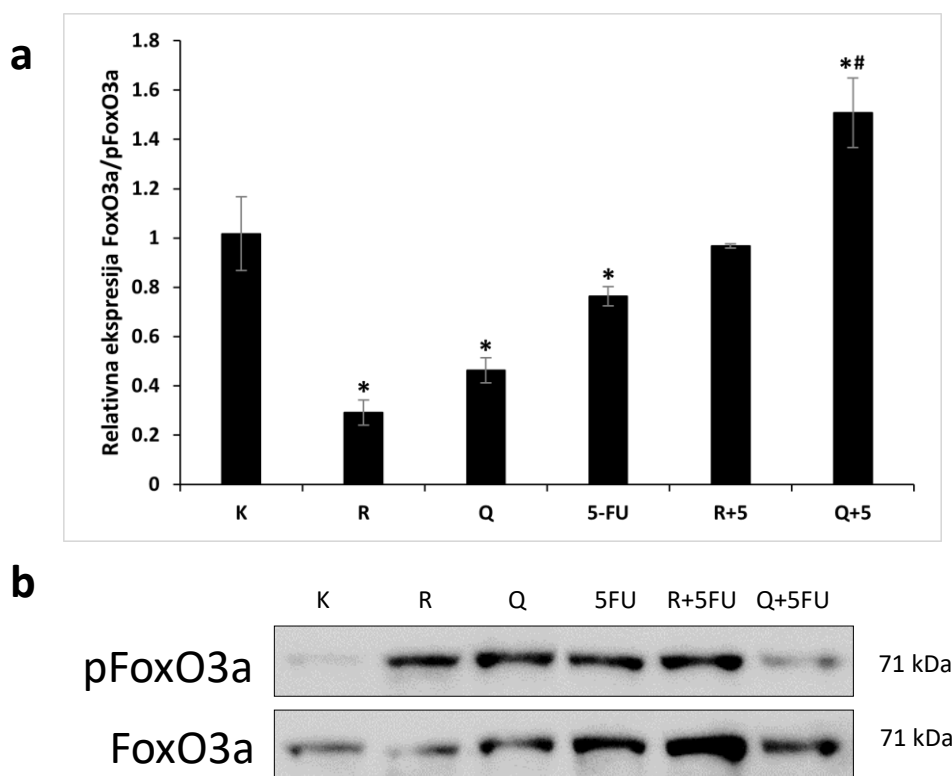
Slika 15. Relativna ekspresija pERK/ERK u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata. Grafički prikaz relativne ekspresije pERK i ERK-a (a) s reprezentativnim imunoblot rezultatima pERK i ERK-a (b). Za bojanje membrane su korištena primarna protutijela na ERK i pERK uz HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo. Za vizualizaciju je korišten SignalFire Elite ECL Reagens. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, $n=3$. Oznake *, # označavaju statistički značajnu razliku između grupa; * = kontrola, # = 5-FU, $p<0.05$.

4.4.4. Utjecaj tretmana i kombiniranih tretmana na transkripcijski faktor FoxO3a

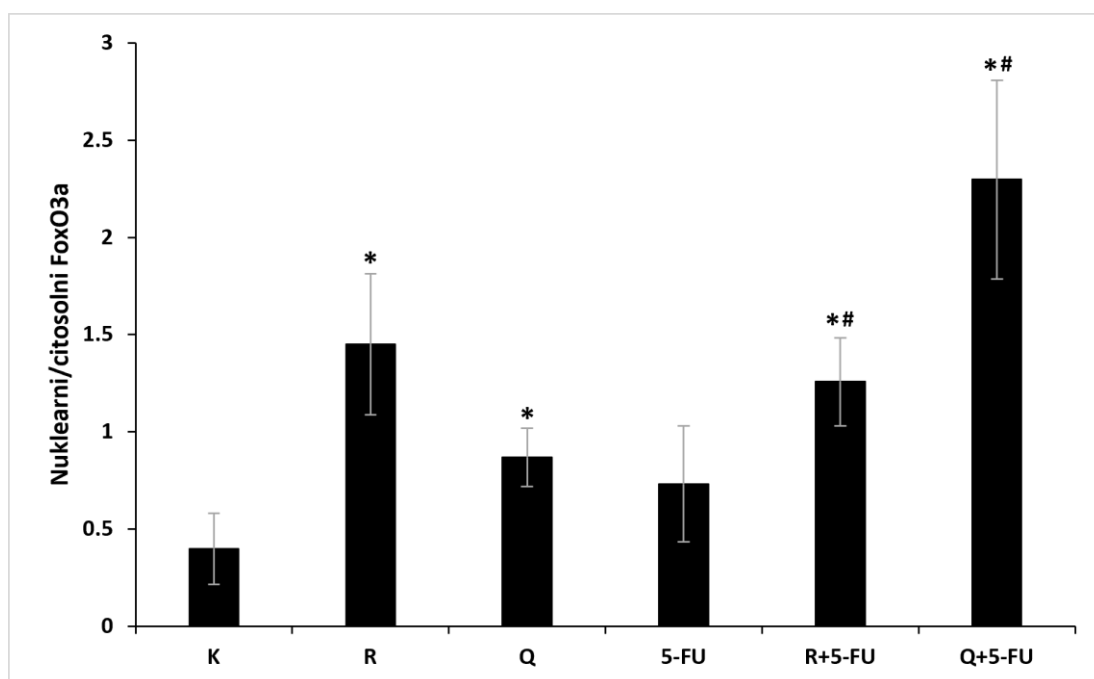
Kako bi se istražio utjecaj rutina, kvercetina, 5-FU-a i njihovih kombinacija na transkripcijski faktor FoxO3a, korišten je Western blot za određivanje relativne ekspresije pFoxO3a (Slika 16) te imunofluorescencijska (IF) analiza nuklearne translokacije FoxO3a (Slika 17, Slika 18).

Analizom Western blot-a vidljiv je manjak fosforilacije FoxO3a, odnosno nedostatak njegove inaktivacije te niska nuklearna translokacija FoxO3a prema IF analizi u kontrolnoj skupini stanica. U tretmanima rutinom,

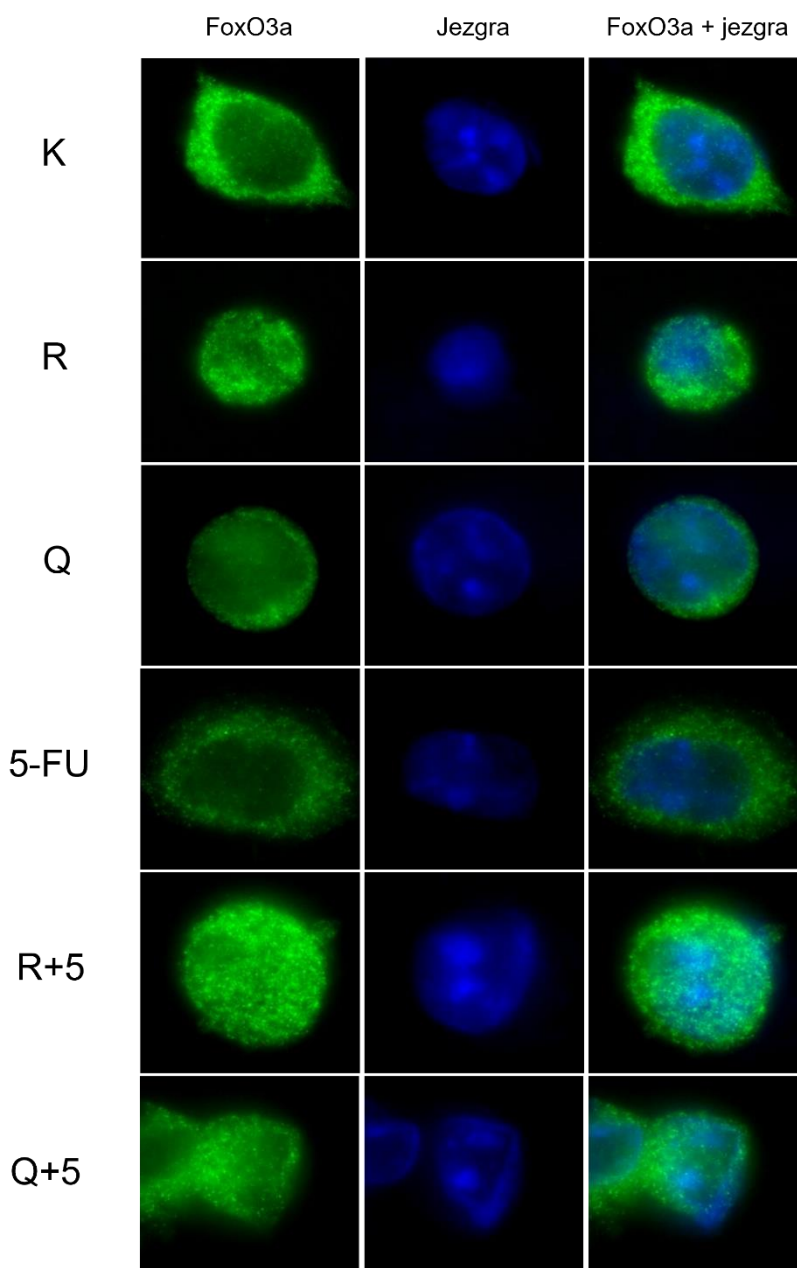
kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kotretmanima povećana je fosforilacija FoxO3a. Rutin i kvercetin u zasebnim tretmanima uzrokuju povećanu nuklearnu translokaciju FoxO3a. 5-FU se u zasebnom tretmanu ne razlikuje od kontrole u nuklearnoj traslokaciji FoxO3a. Zanimljivo, kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om uzrokuje smanjenje fosforilacije, što ukazuje na njegovu povećanu aktivnost i količinu. IF analiza potvrđuje rezultate dobivene WB analizom i pokazuje najveću količinu nuklearne translokacije u navedenom tretmanu.



Slika 16. Relativna ekspresija FoxO3a/pFoxO3a u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata. Grafički prikaz relativne ekspresije FoxO3a i pFoxO3a (a) s reprezentativnim imunoblot rezultatima FoxO3a i pFoxO3a (b). Za bojanje membrane su korištena primarna protutijela na FoxO3a i pFoxO3a uz HRP-konjugirano kozje poliklonalno anti-zečje IgG sekundarno protutijelo. Za vizualizaciju je korišten SignalFire Elite ECL Reagens. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, $n=3$. Oznake *, # označavaju statistički značajnu razliku između grupa; * = kontrola, # = 5-FU, $p<0.05$.



Slika 17. Grafički prikaz imunofluorescencijskog FoxO3a u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata. Za detekciju FoxO3a u stanicama korišteno je primarno protutijelo na FoxO3a uz H&L kozje protu-zečje IgG sekundarno protutijelo i boja za jezgru Hoechst 33342. Navedene vrijednosti su izražene u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, $n=3$. Oznake *, # označavaju statistički značajnu razliku između grupa; * = kontrola, # = 5-FU, $p<0.05$.



Slika 18. Reprezentativni imunofluorescentni prikaz FoxO3a u HCT116 staničnoj liniji tretiranoj s rutinom, kvercetinom, 5-FU-om i njihovim kombinacijama nakon 24 sata. Za detekciju FoxO3au stanicama korišteno je primarno protutijelo na FoxO3a uz H&L kozje protu-zečje IgG sekundarno protutijelo (zelena) i boja za jezgru Hoechst 33342 (plava). Stanice su vizualizirane pomoću fluorescencijskog mikroskopa.

5. Diskusija

Osim radijacije i operativnih zahvata te raznih kombiniranih opcija liječenja, jedna od glavnih terapija za liječenje karcinoma (među njima i CRC-a) je kemoterapija zahvaljujući njezinoj sposobnosti indukcije stanične smrti u tumorskim stanicama i sprječavanja daljnjeg metastaziranja, te sukladno tome i smanjenju veličine samog tumora. Ipak, problem kod kemoterapeutika je njegova nemogućnost selektivne eliminacije isključivo tumorskih stanica, zbog čega dolazi i do oštećenja normalnih stanica. Zbog toga se u pacijenata javlja mnoštvo nuspojava kao što su krvarenja, gastrointestinalna ulceracija i toksični učinci na jetru i bubrege te su česte i neuspjele terapije, razvoj bolesti i smrt. Osim toga, česte su i remisije u pacijenata, koje se javljaju zbog nepotpunog uklanjanja i ubijanja tumorskih stanica i preživljenja tumorskih matičnih stanica, te istovremena rezistencija na više lijekova (eng. *multi-drug resistance*, MDR). Svi ovi problemi potiču na neprestanu potragu za novim i uspješnim opcijama kemoterapeutika koji u isto vrijeme uništavaju tumorske stanice bez rezistencija i nuspojava. Jedan od vodećih opcija u ovom području su fitokemikalije zahvaljujući svom širokom spektru benefičijskih utjecaja na stanice i organizam. Osim već dobro poznatih antioksidacijskih učinaka, fitokemikalije imaju mnoga farmakološka djelovanja kao što su njihova protutumorska svojstva te mogućnost modifikacije raznih signalnih putova. Fitokemikalije su široko istraživani spojevi, te u slučaju protutumorskog djelovanja, određeni spojevi su pokazali ciljanje određenih signalnih kaskada i proteina upletenih u razvoj i opstanak tumorskih stanica te kemoterapeutske i/ili kemosenzitizacijske utjecaje na tumorske stanice (31). Jedan od radova koji se bazirao na istraživanje utjecaja fitokemikalije u kombinaciji s kemoterapeutikom je pronašao da rutin u kombiniranoj terapiji s 5-FU-om i oksaliplatinom uzrokuje pojačanu inhibiciju rasta Caco-2 stanica te jaču inhibiciju u kombinaciji nego kada su stanice tretirane spojevima zasebno (32). U drugom radu je testiran kvercetin uz 5-FU i utjecaj kvercetina na anti-proliferativan učinak 5-FU na HCT116 i Caco-2

stanice, gdje su pronašli da kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om uzrokuje jači citotoksični učinak od samostalnog 5-FU tretmana nakon 48h (33). Pronalasci iz navedenih radova podupiru naše rezultate da rutin i kvercetin u kombinaciji s kemoterapeutikom pokazuju jači citotoksični učinak od individualnih tretmana sva tri spoja. Stoga je moguće zaključiti da rutin i kvercetin pojačavaju citotoksičan učinak kemoterapeutika (u ovom slučaju 5-FU) te djeluju kemosenzitizirajuće. Samim time, rutin i kvercetin u kombinatornoj terapiji s 5-FU-om izbor su u liječenju karcinoma kolona. Što se tiče izbora samostalne terapije, kvercetin ima jače djelovanje na stanice HCT116 u usporedbi sa samostalnom terapijom rutinom. Međutim, u kombinacijskoj terapiji, rutin je bolje djelovao na smanjenje stanične vijabilnosti. S obzirom na drugačije ciljeve u stanici od strane 5-FU-a pa tako i rutina i kvercetina pretpostavka je da rutin i kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om ne uzrokuju iste inhibicije/aktivacije. S obzirom na razlike u njihovoj strukturi, pretpostavka je da kvercetin lakše ulazi u stanice ali strukturne razlike također mogu imati drugačiji utjecaj na inhibicije/aktivacije različitih signalnih putova u stanicama. Kako bi pokazali njihove učinke, samostalno i u kombinaciji, određen je izražaj glavnih proteina uključenih u procese stanične smrti, autofagije te ERK i FoxO3a signalnih putova.

Autofagija u tumorskim stanicama CRC-a je poprilično kontroverzna tema, dijeleći znanstveni svijet na dvije strane. Iako se provodi velik broj istraživanja na ulogu autofagije u tumorskim stanicama, i dalje nije moguće točno odrediti naginje li autofagija na protumorsku ili antitumorsku stranu, stoga se smatra da autofagija drži ulogu uzrokovanja oba ishoda. Ovisno o genetskoj mutaciji, vrsti tumora i stupnju tumora, autofagija u tumorima će izazivati ili protutumorsko djelovanje ili protumorsko djelovanje. Jedna od ideja koja se razmatra je da autofagija u ranijim stadijima razvoja tumora ima preventivno djelovanje na tumore, dok autofagija koja se javlja u kasnijim stadijima tumora ima beneficijsku ulogu za tumorske stanice, omogućavajući im preživljenje i prilagodbu na okoliš (34,35). Prilikom

tretmana kemoterapeuticima moguće je izazvati autofagiju u ranim fazama tretmana prilikom ranog oštećenja stanica, gdje se javlja protektivna autofagija koja pokušava „spasiti“ stanice od oštećenja, međutim kad je oštećenje stanice kemoterapeuticima veće i nemoguće ga je popraviti, javlja se pretjerana, citotoksična autofagija, zajedno s indukcijom apoptoze. S obzirom na činjenicu da autofagija služi kao jedan od načina održavanja homeostaze stanice i prevencije nastajanja malignosti preko uklanjanja oštećenja iz stanica, time ujedno i promovira razvoj tumora zbog održavanja stanične stabilnosti i povećane rezistencije na nesigurne okoliše. Također, postoji mogućnost da autofagija povećava kemorezistenciju tumorskih stanica. S druge strane, dokazano je kroz mnoštvo istraživanja da autofagija ispoljava tumor-suprimirajući utjecaj preko čišćenja stanica od abnormalnih organela i proteinskih agregacija (34,35). Velika količina istraživanja je provedena na povezanost 5-FU-a i autofagije na CRC stanicama, gdje je pronađeno da stanice koriste autofagiju u citoprotektivne svrhe kako bi se obranile od citotoksičnih utjecaja 5-FU (34,35). Primjer jednog takvog istraživanja je istraživanje u kojem je korišten tretman 5-FU u kombinaciji s kvercetinom. Rezultati su pokazali autofagiju u većoj količini od individualnih tretmana provedenih na SW480 i HCT116 stanicama nakon 48h, gdje je kvercetin pojačao autofagiju uzrokovanu 5-FU-om te je kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om izazvao protektivnu autofagiju (36). Iako se rezultati iz navedenog istraživanja poklapaju s dobivenim u ovom radu, autorima je bilo moguće odrediti narav autofagije uz pomoć autolizosomalnih inhibitora kojima su stanice tretirane prije kvercetina, 5-FU-a i njihove kombinacije, nakon čega su vidjeli smanjenu staničnu vijabilnost i zaključili postojanje protektivne autofagije (36). Budući da je u ovom radu istraživao samo LC3, moguće je doći do zaključka da individualan kvercetin i kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om uzrokuju autofagiju, ali nemoguće zaključiti ponaša li se autofagija protektivno ili protu-tumorsko. Manjak radova na ovakvu temu onemogućuje daljnje diskusije, te veliki manjak istraživanja rutina u kombinaciji s 5-FU-om i njihovog učinka na

autofagiju dovodi do jedinog zaključka na temelju dobivenih rezultata: da rutin samostalno i u kombinaciji s 5-FU-om također izaziva pojačanu autofagiju. Kod samostalnih tretmana, kvercetin se pokazao kao jači induktor autofagije nego rutin, što je u skladu sa smanjenjem vijabilnosti na temelju čega se može indirektno zaključiti da inducirana autofagija nije protektivna, već citotoksična. U kombinacijskim terapijama, rutin je pojačao autofagiju induciranu 5-FU-om i umanjio staničnu vijabilnost dok je u tretmanu kvercetina u kombinaciji s 5-FU-om ista ostala na sličnoj razini inducirana individualnim kvercetinom. Dakle, moguće je pretpostaviti da rutin u kombinaciji s 5-FU-om ima aditivni učinak na indukciju autofagije. Najvjerojatnije se protektivna autofagija inducirana u samostalnom tretmanu rutinom uz oštećenje i autofagiju induciranu 5-FU-om usmjerava u citotoksičnu autofagiju za smanjenje stanične vijabilnosti.

Apoptoza je jedan od glavnih načina sprječavanja nastanka tumorskih stanica u fiziološkim uvjetima. U slučaju gubitka kontrole apoptoze, tumorskim stanicama je omogućeno preživljavanje i daljnji razvoj, te naposljetku metastaziranje tumorskih stanica. Najčešći načini izbjegavanja i inhibicije apoptoze u tumorskim stanicama je preko inhibicije kaspaza te preko pojačane ekspresije antiapoptotskog Bcl-2 i smanjene ekspresije ili cijelog gubitka proapoptotskih Bax/Bak proteina. Uzimajući u obzir odnos između apoptoze i tumorskih stanica, moguće je doći do novih terapija kojima će se ciljati indukcija apoptoze koristeći postojeći stanični mehanizam. Izbjegavanje apoptoze nije specifično za samo jednu vrstu karcinoma, stoga je ovakav oblik liječenja karcinoma sve popularniji odabir, zahvaljujući mnoštvu prednosti koje donosi; neinvazivna nekirurška metoda liječenja s velikim postotkom uspjeha koja je primjenjiva na sve vrste i oblike karcinoma (37). Jedan od vodećih primjera novih opcija liječenja karcinoma putem indukcije apoptoze je pomoću fitokemikalija te se sve više istražuju njihovi učinci na apoptozu, aktiviraju li je u tumorskim stanicama te preko kojeg puta apoptoze djeluju. U istraživanju na HT-29 staničnoj liniji nakon 48h, rutin je izazvao pojačanu ekspresiju apoptotskih proteina,

kaspaze 3, 8 i 9, prikazujući aktivaciju i intrinzičnog i ekstrinzičnog puta apoptoze, što je djelomično u skladu s dobivenim rezultatima u ovom istraživanju (38). 5-FU prvenstveno djeluje na sprječavanje proliferacije tumorskih stanica putem oštećenja DNA i zaustavljanja staničnog ciklusa te time dovodi do aktivacije apoptoze (39). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da rutin, kvercetin, te njihove kombinacije s 5-FU-om izazivaju cijepanje PARP-a, što je biljeg apoptoze. Zanimljivo, u našem istraživanju, apoptoza izazvana zasebnim tretmanom 5-FU-om nakon 24h tretmana manje je izražena od apoptoze inducirane samostalnim tretmanom kvercetinom. Kvercetin inducira apoptozu preko vanjskog, tj. ekstrinzičnog i unutarnjeg tj. intrinzičnog puta te je apoptoza inducirana vanjskim putem izraženija u tretmanu kvercetinom nego 5-FU-om. Kvercetin je jači induktor apoptoze nego rutin u samostalnim tretmanima što je u skladu s rezultatima stanične vijabilnosti. 5-FU inducira slabu apoptozu koja je pojačana uz kotretmane s rutinom i kvercetinom, međutim, u kotretmanu rutinom pojavljuje se izraženija apoptoza, što je također u skladu s rezultatima dobivenim analizom stanične vijabilnosti. Pretpostavka je da su dobivene razlike između djelovanja rutina i kvercetina, uspoređujući njihovo samostalno djelovanje i njihovo djelovanje u kombinacijskim terapijama s 5-FU-om, posljedica inhibicije ili aktivacije nekog od glavnih signalnih putova koji odlučuju o sudbini stanica. ERK signalni put je uključen u mnoštvo odluka u stanicama kao odgovor na signale aktivirane različitim tretmanima.

U tumorskim stanicama ERK/MAPK signalna kaskada je jedna od glavnih signalnih kaskada koja je pojačana zahvaljujući mutiranim genima koji kodiraju proteine unutar ERK/MAPK, tj. Ras/Raf/MEK/ERK kaskade. Time dolazi do pojačane proliferacije tumorskih stanica, suzbijanja apoptoze te održavanja tumorskog rasta. ERK signalizacija također regulira ekspresiju autofagije (40,41). Jedna od mogućih mutacija je K-RAS, koja je prisutna u HCT116 staničnoj liniji. Zahvaljujući K-RAS mutaciji koja omogućuje neprestan rad ERK/MAPK kaskade, ERK je u stalnoj aktivaciji, zbog čega kontrolna skupina stanica prikazuje visoku ekspresiju ERK-a. Rezultati

dobiveni u ovom istraživanju su pokazali da je rutin inhibitor fosforilacije ERK-a u samostalnom tretmanu, odnosno inhibitor ERK-a, dok kvercetin dodatno aktivira njegovu fosforilaciju, odnosno dodatno ga aktivira. Suprotan učinak rutina i kvercetina na ERK ukazuje na razlike u njihovom djelovanju u samostalnim tretmanima. Također je moguće pretpostaviti da kvercetin, aktivacijom ERK-a, najvjerojatnije dovodi do pojačane indukcije citotoksične autofagije, stoga samim time smanjuje staničnu vijabilnost. S druge strane, moguće je da autofagija inducirana kvercetinom posljedično dodatno aktivira ERK. 5-FU u samostalnom tretmanu također inhibira aktivaciju ERK-a, koja u kotretmanu s rutinom, inhibitorom ERK-a, ostaje na sličnoj razini. U kotretmanu s kvercetinom, s obzirom na to da je on aktivator ERK-a, dolazi do poništavanja 5-FU-om inducirane inhibicije ERK-a. Navedeno ukazuje na to da aktivacija ERK-a u kotretmanu izaziva manji citotoksični učinak nego njegova inhibicija. Samim time, primjena inhibitora fosforilacije ERK-a ukazuje na potencijalnu primjenu kod poboljšanja terapije 5-FU-om, kao što je rutin. Ciljanje autofagije uzrokovane ERK-om nije samo važna terapijska strategija za liječenje karcinoma već igra i važnu ulogu u pojačavanju kemosenzitizacije tumorskih stanica za izbjegavanje rezistencije na lijekove (42).

Osim MAP kinaza, FoxO3a je središnji transkripcijski faktor čija uloga posrednika u višestrukim fiziološkim i patološkim procesima izaziva transkripciju ciljnih gena uključenih u apoptozu, proliferaciju, napredovanje staničnog ciklusa, preživljavanje i oštećenje DNK (29). Smanjenje vijabilnosti u svim tretmanima može biti posljedica fosforilacije FoxO3a. Kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om izazvao je najblažu fosforilaciju FoxO3a, odnosno najveću aktivnost FoxO3a. Navedeno je mogući uzrok razlike između rutina i kvercetina te toga da je rutin bolji izbor od kvercetina u kombinaciji s 5-FU-om za smanjenje stanične vijabilnosti. S obzirom na to da je FoxO3a regulator autofagije, povišena autofagija u tom kotretmanu korelira sa razinama njegove fosforilacije i nuklearne translokacije. Istraživanja pokazuju korelaciju između aktivacije ERK-a i inaktivacije

FoxO3a, što nije slučaj u modelu prezentiranom u ovom istraživanju. Pretpostavka je da proteini koji sudjeluju u drugim signalnim kaskadama, kao što su JNK i p38, induciraju fosforilaciju FoxO3a u tretmanima.

S obzirom na to da su u procese u ovom radu uključeni i mnogi drugi proteini, inhibicije i aktivacije signalnih putova predmet su daljnjeg istraživanja mehanizama djelovanja rutina i kvercetina. Također, potrebno je provesti *in vivo* istraživanja na modelu karcinoma kolona ili ksenograftu HCT116 stanica kako bi se pokazalo tumor-supresijsko djelovanje istraživanih fitokemikalija u organizmu. Time bi se ujedno i moglo pobliže istražiti farmakološko djelovanje i potencijal u organizmu, te odrediti točan mehanizam djelovanja uz ADME svojstva (administracija, distribucija, metabolizam, izlučivanje lijeka/spoja u organizmu) kako bi se rutin i kvercetin mogli razmatrati kao kemoterapeutici biljnog podrijetla. S obzirom na mutaciju Ras-a u ovoj staničnoj liniji, rezultati na liniji u kojoj ERK nije aktiviran zbog nepostojanja mutacije ne bi imali smisla zbog nemogućnosti njegove inhibicije na pravilan način u kontekstu fiziološkog stanja stanica. Naravno, daljnja istraživanja potrebna su kako bi se pokazao učinak ovdje pronađene najbolje kombinacijske terapije rutinom i 5-FU-om s ciljem poboljšanja kemoterapije bez indukcije nuspojava i negativnih posljedica na zdravlje.

6. Zaključak

Usprkos širokom spektru terapija primjenjivih na CRC u današnje vrijeme, sve veća i češća je pojava kemorezistentnih tumora, stoga se terapije okreću prema kombiniranoj terapiji. Fitokemikalije predstavljaju odličan izbor nove opcije liječenja zahvaljujući njihovom opširnom arsenalu pozitivnih utjecaja na organizam, među kojima je i protutumorsko djelovanje.

U ovom radu je istraživao utjecaj rutina i kvercetina samostalno i u kombinaciji s 5-FU-om na staničnu liniju karcinoma kolona HCT116. Rezultati su pokazali da rutin i kvercetin imaju citotoksičan učinak na HCT116 stanice, od kojih kvercetin izaziva jači citotoksični učinak naspram rutina u istoj dozi. Rutin i kvercetin u kombinaciji s kemoterapeutikom imaju jači citotoksični učinak od zasebnih tretmana. Kombinacijska terapija rutinom i 5-FU izaziva jači citotoksični učinak nego kvercetin u kombinaciji s 5-FU-om. Kvercetin je jači induktor autofagije nego rutin u samostalnim tretmanima. 5-FU inducira autofagiju koja je pojačana uz kotretmane s rutinom i kvercetinom. Kvercetin je jači induktor apoptoze nego rutin u samostalnim tretmanima. 5-FU inducira apoptozu koja je pojačana uz kotretmane s rutinom i kvercetinom. Rutin u kotretmanu s 5-FU-om inducira jaču apoptozu nego kotretman s kvercetinom. Rutin samostalno i u kotretmanu aktivira unutarnji put apoptoze dok kvercetin samostalno i u kotretmanu aktivira vanjski put apoptoze. Rutin pojačava aktivaciju vanjskog puta apoptoze od strane 5-FU-a u kotretmanu. Rutin i kvercetin pokazuju suprotan utjecaj na ERK samostalno i u kombinaciji s 5-FU-om. Rutin i kvercetin u samostalnim tretmanima potiču aktivnost nerazgrađenog FoxO3a u usporedbi s kontrolom. Kotretmani rutina i kvercetina s 5-FU-om značajno povišuju ulazak FoxO3a u jezgru i njegovu aktivaciju.

Iz navedenih rezultata je moguće zaključiti da kombinacije fitokemikalija s 5-FU-om uistinu prikazuju bolje djelovanje na tumorske stanice od zasebnih tretmana, te je najbolja kombinacija rutin s 5-FU-om, u kojoj rutin, iako

blagog citotoksičnog djelovanja u zasebnom tretmanu, pojačava djelovanje 5-FU-a i omogućava smanjenje kemorezistencije tumorskih stanica na kemoterapeutik, imajući ulogu kemosenzitizatora. Ovime se javlja potencijalna primjena rutina u klinici, no potrebno je provesti daljnja *in vivo* istraživanja kako bi se potvrdio jednak učinak i u organizmu.

7. Reference

- 1 Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG *et al.* Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2015; **1**: 15065.
- 2 Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK *et al.* Colon cancer, Version 2.2021. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2021; **19**: 329–359.
- 3 Al-Ishaq RK, Overy AJ, Büsselberg D. Phytochemicals and gastrointestinal cancer: Cellular mechanisms and effects to change cancer progression. *Biomolecules*. 2020; **10**. doi:10.3390/biom10010105.
- 4 Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; **18**. doi:10.3390/ijms18010197.
- 5 Esmeeta A, Adhikary S, Dharshnaa V, Swarnamughi P, Ummul Maqsummiya Z, Banerjee A *et al.* Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022; **153**. doi:10.1016/j.biopha.2022.113384.
- 6 Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008; **13**: 1551–1569.
- 7 Chu E, DeVita Jr VT. Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2015. www.jblearning.com/medicine/oncology.
- 8 Li Y, Zhang T, Chen GY. Flavonoids and colorectal cancer prevention. *Antioxidants*. 2018; **7**. doi:10.3390/antiox7120187.

- 9 Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Huđek A, Bačun-Družina V, Komes D. Overview of polyphenols and their properties. In: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, 2018, pp 3–44.
- 10 Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*. 2016; **5**. doi:10.1017/jns.2016.41.
- 11 Neamtu AA, Maghiar TA, Alaya A, Olah NK, Turcus V, Pelea D *et al*. A Comprehensive View on the Quercetin Impact on Colorectal Cancer. *Molecules*. 2022; **27**. doi:10.3390/molecules27061873.
- 12 Asgharian P, Tazekand AP, Hosseini K, Forouhandeh H, Ghasemnejad T, Ranjbar M *et al*. Potential mechanisms of quercetin in cancer prevention: focus on cellular and molecular targets. *Cancer Cell Int*. 2022; **22**. doi:10.1186/s12935-022-02677-w.
- 13 Darband SG, Kaviani M, Yousefi B, Sadighparvar S, Pakdel FG, Attari JA *et al*. Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2018; **233**: 6544–6560.
- 14 Prasad R, Prasad SB. A review on the chemistry and biological properties of Rutin, a promising nutraceutical agent. *Asian J Pharm Pharmacol* 2019; **5**: 1–20.
- 15 Nouri Z, Fakhri S, Nouri K, Wallace CE, Farzaei MH, Bishayee A. Targeting multiple signaling pathways in cancer: The rutin therapeutic approach. *Cancers (Basel)*. 2020; **12**: 1–34.
- 16 Patel K, Patel DK. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. Elsevier, 2019, pp 457–479.

- 17 Satari A, Ghasemi S, Habtemariam S, Asgharian S, Lorigooini Z. Rutin: A Flavonoid as an Effective Sensitizer for Anticancer Therapy; Insights into Multifaceted Mechanisms and Applicability for Combination Therapy. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2021; **2021**. doi:10.1155/2021/9913179.
- 18 Pandey P, Khan F, Qari HA, Oves M. Rutin (Bioflavonoid) as cell signaling pathway modulator: Prospects in treatment and chemoprevention. *Pharmaceuticals*. 2021; **14**. doi:10.3390/ph14111069.
- 19 Dixit T, Tiwari A, Bose S, Kulkarni H, Suthar J, Ravindran S. Metabolism of Phytochemicals. www.intechopen.com.
- 20 D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019; **43**: 582–592.
- 21 Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015; **14**. doi:10.1186/s12943-015-0321-5.
- 22 Rahman MA, Hannan MA, Dash R, Rahman MH, Islam R, Uddin MJ *et al*. Phytochemicals as a Complement to Cancer Chemotherapy: Pharmacological Modulation of the Autophagy-Apoptosis Pathway. *Front Pharmacol*. 2021; **12**. doi:10.3389/fphar.2021.639628.
- 23 Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* 2016; **8**: 603–619.
- 24 Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J *et al*. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013; **61**: 43–58.

- 25 Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*. 2010; **8**. doi:10.1186/1478-811X-8-31.
- 26 Cao W, Li J, Yang K, Cao D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull Cancer*. 2021; **108**: 304–322.
- 27 Schmitz KJ, Ademi C, Bertram S, Schmid KW, Baba HA. Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status. *World J Surg Oncol* 2016; **14**. doi:10.1186/s12957-016-0946-x.
- 28 Guo Y, Pan W, Liu S, Shen Z, Xu Y, Hu L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp Ther Med* 2020. doi:10.3892/etm.2020.8454.
- 29 Liu Y, Ao X, Ding W, Ponnusamy M, Wu W, Hao X *et al*. Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Mol Cancer*. 2018; **17**. doi:10.1186/s12943-018-0856-3.
- 30 MPAGE Color Protein Standard Millipore. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/mpstd4> (pristupljeno 23. kolovoza 2023.).
- 31 Rizeq B, Gupta I, Ilesanmi J, AlSafran M, Rahman MDM, Ouhtit A. The power of phytochemicals combination in cancer chemoprevention. *J Cancer*. 2020; **11**: 4521–4533.
- 32 Nasiri F, Kismali G, Alpay M, Kosova F, Cakir DU, Sel T. Abstract 2177: Rutin enhances the antiproliferative effect of 5-FU and oxaliplatin in colon cancer cells. *Cancer Res* 2016; **76**: 2177–2177.

- 33 Terana G, Abd-Alhaseeb M, Omran G, M. Okda T. Quercetin potentiates 5-fluorouracil effects in human colon cancer cells through targeting the Wnt/ β -catenin signalling pathway: the role of miR-27a. *Współczesna Onkologia* 2022; **26**: 229–238.
- 34 Mahgoub E, Taneera J, Sulaiman N, Saber-Ayad M. The role of autophagy in colorectal cancer: Impact on pathogenesis and implications in therapy. *Front Med (Lausanne)* 2022; **9**. doi:10.3389/fmed.2022.959348.
- 35 Manzoor S, Muhammad JS, Maghazachi AA, Hamid Q. Autophagy: A Versatile Player in the Progression of Colorectal Cancer and Drug Resistance. *Front Oncol* 2022; **12**. doi:10.3389/fonc.2022.924290.
- 36 Li M, Xu J, Fan J, Hu M, Zeng J. Quercetin enhanced the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by induction of autophagy and Drp-1 mediated mitochondrial fission. 2023. doi:10.21203/rs.3.rs-3044266/v1.
- 37 Pfeffer C, Singh A. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2018; **19**: 448.
- 38 Nafees S, Mehdi SH, Zafaryab M, Zeya B, Sarwar T, Rizvi MA. Synergistic Interaction of Rutin and Silibinin on Human Colon Cancer Cell Line. *Arch Med Res* 2018; **49**: 226–234.
- 39 De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL, Stokke T. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Mol Cancer* 2006; **5**: 20.
- 40 Ishii N, Harada N, Joseph EW, Ohara K, Miura T, Sakamoto H *et al*. Enhanced Inhibition of ERK Signaling by a Novel Allosteric MEK Inhibitor, CH5126766, That Suppresses Feedback Reactivation of RAF Activity. *Cancer Res* 2013; **73**: 4050–4060.

- 41 Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Arencibia MG, Vetrini F, Erdin S *et al.* TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science* (1979) 2011; **332**: 1429–1433.
- 42 Xu Z, Han X, Ou D, Liu T, Li Z, Jiang G *et al.* Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020; **104**: 575–587.