

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Lidija Šimić Ševerdija

ANTITUMORSKI I KEMOSENZITIZIRAJUĆI UČINAK
OLEANOLIČNE KISELINE, BETULINSKE KISELINE I RUTINA
NA STANICE RAKA DEBELOG CRIJEVA

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Lara Batičić

Komentor: prof. dr. sc. Robert Domitrović

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Lidija Šimić Ševerdija

ANTITUMOR AND CHEMOSENSITIZING EFFECTS OF
OLEANOLIC ACID, BETULINIC ACID, AND RUTIN ON
COLORECTAL CANCER CELLS

Doctoral thesis

Rijeka, 2025.

Mentor: Assoc. Prof. Lara Batičić, PhD

Co-mentor: Prof. Robert Domitrović, PhD

Mentor/ica/komentor/ica rada:

izv. prof. dr. sc. Lara Batičić/prof. dr. sc. Robert Domitrović

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____ (titula, ime i prezime)

2. _____ (titula, ime i prezime)

3. _____ (titula, ime i prezime)

4. _____ (titula, ime i prezime)

5. _____ (titula, ime i prezime)

Rad ima _____ listova.

UDK: _____ (UDK broj dodjeljuje Knjižnica Medicinskog fakulteta u Rijeci)

PREDGOVOR

Doktorski rad je izrađen na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod mentorskim vodstvom izv. prof. dr. sc. Lare Batičić i prof. dr. sc. Roberta Domitrovića, a u sklopu projekta voditelja prof. dr. sc. Roberta Domitrovića „Interakcija lijekova i fitokemikalija *in vitro* i *in vivo*: uloga FOXO signalnog puta“ (uniri-biomed-18-30) (Potpora Sveučilišta u Rijeci).

ZAHVALA

Na prvom mjestu želim zahvaliti svojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Lara Batičić i prof. dr. sc. Robertu Domitrović, čije su stručno vodstvo, podrška i nesebično dijeljenje znanja bili ključni u mom znanstvenom putovanju. Njihova predanost i ohrabrenje nisu samo usmjeravali moje istraživanje, već su mi i pomogli rasti kao istraživač i kao osoba. Hvala vam na strpljenju, savjetima i inspiraciji koju ste mi pružili.

Posebnu zahvalu dugujem kolegici dr. sc. Ivi Suman, mojem neslužbenom mentoru. Njezina nesebična pomoć, znanje i podrška učinili su ovaj put lakšim i ljepšim. Iva, hvala ti što si bila uz mene u trenucima sumnje, što si uvijek bila spremna podijeliti svoje iskustvo i što si mi, iznad svega, bila prijateljica.

Zahvaljujem i svim kolegama sa Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, koji su svojim savjetima, podrškom i suradnjom pridonijeli ostvarenju ovog rada. Posebnu zahvalnost upućujem izv. prof. dr. sc. Daliboru Brozniću, koji mi je bio mentor tijekom preddiplomskog i diplomskog studija. Njegova predanost i nesebična podrška uveli su me u svijet znanosti te u meni probudili ljubav prema istraživanju, na čemu sam mu iznimno zahvalna. Također, veliko hvala kolegama iz KBC Rijeka, čija su potpora i zajedništvo bili neprocjenjivi. Posebnu zahvalu upućujem svojoj šefici, prim. dr. sc. Martini Pavletić, dr. med., na razumijevanju, podršci i povjerenju koje mi je pružala tijekom cijelog ovog putovanja.

Na kraju, iz srca zahvaljujem svojoj obitelji – mami Svjetlani, tati Ivi i sestrama, Pameli i Ivoni, koji su mi bili oslonac kroz sve izazove. Vaša ljubav, razumijevanje i neizmjerena podrška nosili su me kroz svaki korak ovog puta. Hvala vam što ste vjerovali u mene čak i onda kada ja možda nisam.

Duboko sam zahvalna svojoj prijateljici Moniki, koja mi je svojom nevjerojatnom hrabrošću i nepokolebljivom ustrajnošću pokazala da su granice samo iluzija i da se snaga duha može uzdići iznad svih prepreka. Hvala ti što si svojim primjerom osnažila moju vjeru da ništa nije nemoguće.

Zahvaljujem i svim svojim prijateljima, osobama koji su prolazili kroz moj život, koji su dijelili sa mnom i uspone i padove, koji su slušali, bodrili i slavili sa mnom svaki uspjeh. Bez vas, ovaj rad ne bi bio moguć.

Ova disertacija nije samo rezultat mog rada, već i odraz ljubavi, podrške i zajedništva svih vas. Hvala vam od srca.

SAŽETAK

Uvod: Rak debelog crijeva jedan je od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta globalno. Unatoč učinkovitosti konvencionalnih terapija, izazovi poput kemorezistencije, recidiva i nuspojava ograničavaju njihov uspjeh. U tom kontekstu, prirodni spojevi poput betulinske kiseline, oleanolične kiseline i rutina pokazuju značajan farmakološki potencijal za poboljšanje terapije raka.

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja je predložiti mehanizam djelovanja odabranih fitokemikalija, oleanolične kiseline, betulinske kiseline i rutina, u terapiji raka debelog crijeva, te njihov potencijal u izazivanju kemosenzibilizacije stanica na 5-fluorouracil (5-FU).

Materijal i metode: Istraživanje je provedeno *in vitro* na modelu raka debelog crijeva korištenjem HCT116 stanica. Stanična vijabilnost nakon tretmana ispitivanim spojevima određena je XTT testom, pri čemu je ispitana i kemosenzibilizacija HCT116 stanica na 5-fluorouracil u prisutnosti prirodnih spojeva. Ekspresija ciljnih proteina analizirana je metodom Western blot. Uloga signalnog puta p38 MAPK ispitana je primjenom specifičnih inhibitora. Apoptoza i autofagija, uključujući mitofagiju, analizirane su fluorescijskom mikroskopijom. Dodatno, funkcionalna uloga autofagije u odgovoru stanica na tretman ispitana je uporabom inhibitora autofagije.

Rezultati: Oleanolična i betulinska kiselina pokazale su značajnu citotoksičnost na HCT116 stanice raka debelog crijeva, dok rutin, zbog visoke IC₅₀ vrijednosti, nije imao značajan učinak. Oleanolična kiselina inducira oksidacijski stres, apoptozu i autofagiju aktivacijom p38 MAPK i AMPK-a te inhibicijom mTOR-a, dok betulinska kiselina potiče autofagiju bez induciranja apoptoze. Oleanolična kiselina dodatno povećava ekspresiju SIRT6 i nakupljanje u jezgri FOXO3a. Obje kiseline povećavaju osjetljivost stanica na 5-FU, smanjujući njihovu vijabilnost i potencijalno omogućujući smanjenje doze kemoterapije.

Zaključak: Antikarcinogeni učinak oleanolične kiseline posredovan je kroz p38/FOXO3a/SIRT6 signalni put, koji doprinosi njenom proapoptotskom i proautofagičnom djelovanju. Betulinska kiselina, iako inducira autofagiju, ne potiče apoptozu i aktivira Akt signalni put, što može utjecati na preživljavanje stanica. Obje kiseline pokazuju potencijal kao kemosenzibilizatori za 5-FU, sugerirajući mogućnost poboljšanja učinkovitosti terapije raka debelog crijeva.

Ključne riječi: 5-fluorouracil; Apoptoza; Autofagija; Betulinska kiselina; Mitofagija; Oleanolična kiselina; Rak debelog crijeva

SUMMARY

Introduction: Colorectal cancer is a leading cause of mortality, with existing therapies often limited by chemoresistance, recurrences, and side effects. Natural compounds such as betulinic acid, oleanolic acid, and rutin exhibit pharmacological potential, offering new opportunities for improving cancer therapy.

Aim of the study: The aim of this study is to propose the mechanism of action of selected phytochemicals, oleanolic acid, betulinic acid, and rutin, in colorectal cancer therapy and to evaluate their potential in inducing chemosensitization of cancer cells to 5-fluorouracil (5-FU).

Materials and methods: This study was conducted in vitro using the colorectal cancer cell line HCT116. Cell viability after treatment with the investigated compounds was assessed using the XTT assay, and the potential of these compounds to enhance the chemosensitivity of HCT116 cells to 5-FU was also evaluated. Protein expression levels were analyzed using Western blotting. The role of the p38 MAPK signaling pathway was examined using specific inhibitors. Apoptosis and autophagy, including mitophagy, were assessed via fluorescence microscopy. Additionally, the functional role of autophagy in the cellular response to treatment was investigated using autophagy inhibitors.

Results: Oleanolic acid and betulinic acid demonstrated significant cytotoxicity in HCT116 colorectal cancer cells, whereas rutin, due to its high IC₅₀ value, exhibited no notable effect. Oleanolic acid induces oxidative stress, apoptosis, and autophagy by activating p38 MAPK and AMPK while inhibiting mTOR, whereas betulinic acid promotes autophagy without inducing apoptosis. Additionally, oleanolic acid increases SIRT6 expression and FOXO3a nuclear accumulation. Both compounds enhance cell sensitivity to 5-FU, reducing viability and potentially allowing for a lower chemotherapy dose.

Conclusion: The anticancer activity of oleanolic acid is mediated through the p38/FOXO3a/SIRT6 signaling pathway, contributing to its proapoptotic and proautophagic effects. In contrast, betulinic acid induces autophagy but does not promote apoptosis and activates the Akt signaling pathway, which may support cell survival. Both compounds exhibit potential as chemosensitizers for 5-FU, highlighting their potential role in improving colorectal cancer therapy.

Keywords: 5-Fluorouracil; Apoptosis; Autophagy; Betulinic acid; Mitophagy; Oleanolic acid; Colorectal cancer

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Rak debelog crijeva.....	1
1.1.1. Epidemiologija	1
1.1.2. Čimbenici rizika	2
1.1.3. Patogeneza raka debelog crijeva	3
1.1.4. Molekularne mete u raku debelog crijeva	7
1.1.5. Klinički simptomi.....	8
1.1.6. Dijagnostika	9
1.1.7. Tumorski biljezi (markeri)	10
1.1.8. Patologija.....	12
1.1.9. Liječenje	12
1.1.10. Kemoterapija, imunoterapija i biološka terapija	13
1.1.11. Mikrookoliš raka debelog crijeva.....	15
1.2. Fitokemikalije.....	16
1.2.1. Fitokemikalije u prevenciji i liječenju raka debelog crijeva	17
1.2.2. Utjecaj fitokemikalija na modulaciju oksidacijskog stresa u raku debelog crijeva	20
1.2.3. Utjecaj fitokemikalija na modulaciju apoptoze u raku debelog crijeva	22
1.2.4. Utjecaj fitokemikalija na modulaciju autofagije (mitofagije) u raku debelog crijeva	23
1.2.5. Oleanolična kiselina	25
1.2.6. Betulinska kiselina	26
1.2.7. Rutin.....	27
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJALI I METODE.....	30
3.1. Stanična kultura HCT116	30

3.2. Priprema oleanolične kiseline, betulinske kiseline i rutina za tretman HCT116 stanica	31
3.3. Priprema 3-MA za tretman HCT116 stanica	31
3.4. Priprema p-38 inhibitora (TAK-715) za tretman HCT116 stanica.....	31
3.5. Priprema 5-fluorouracila (5-FU) za tretman HCT116 stanica	31
3.6. Analiza vijabilnost stanica.....	31
3.7. Eksperimentalne skupine.....	32
3.8. Eksperimentalne skupine u pokusima istraživanja učinka oleanolične kiseline	32
3.9. Eksperimentalne skupine u pokusima istraživanja učinka betulinske kiseline	33
3.10. Western blot analiza proteina	34
3.11. Fluorescencijske metode	37
3.12. Imunofluorescencijske metode.....	38
3.13. Statistička obrada podataka	39
4. REZULTATI	40
4.1. Utjecaj oleanolične kiseline na stanice raka debelog crijeva HCT116	40
4.1.1. Tretman oleanoličnom kiselinom smanjuje vijabilnost HCT116 stanica.....	40
4.1.2. Oleanolična kiselina inducira oksidacijski stres u HCT116 stanicama.....	40
4.1.3. Oleanolična kiselina inducira apoptozu u HCT116 stanicama	41
4.1.4. Oleanolična kiselina inducira autofagiju i mitofagiju u HCT116 stanicama	42
4.1.5. Inhibicija autofagije povećala je citotoksičnost oleanolične kiseline u HCT116 stanicama.....	46
4.1.6. Učinak oleanolične kiseline na AMPK i PI3K/Akt signalne putove u HCT116 stanicama	46
4.1.7. Učinak oleanolične kiseline na ekspresiju MAP kinaza u HCT116 stanicama.....	47
4.1.8. Oleanolična kiselina povećava ekspresiju FOXO3a u HCT116 stanicama	48
4.1.9. Inhibicija p-38 inducira ekspresiju FOXO3a i Sirt6	50
4.1.10. Kotretman oleanoličnom kiselinom i 5-FU smanjuje smanjuje vijabilnost HCT116 stanica.....	51

4.2. Utjecaj betulinske kiseline na stanice raka debelog crijeva HCT116	53
4.2.1. Tretman betulinskom kiselinom smanjuje vijabilnost HCT116 stanica.....	53
4.2.2. Betulinska kiselina inducira oksidacijski stres u HCT116 stanicama	53
4.2.3. Tretman betulinskom kiselinom ne potiče apoptozu u HCT116 stanicama	54
4.2.4. Betulinska kiselina inducira autofagiju u HCT116 stanicama	56
4.2.5. Inhibicija autofagije povećala je citotoksičnost betulinske kiseline u HCT116 stanicama	58
4.2.6. Utjecaj betulinske kiseline na signalne puteve AMPK, PI3K/Akt i MAPK u HCT116 stanicama	59
4.2.7. Betulinska kiselina povećava ekspresiju FOXO3a i SIRT6 u HCT116 stanicama	60
4.2.8. Kotretman betulinske kiseline i 5-FU smanjuje vijabilnost HCT116 stanica	62
4.3. Utjecaj rutina na HCT116 stanice raka debelog crijeva.....	63
4.3.1. Tretman rutinom smanjuje vijabilnost HCT116 stanica.....	63
5. RASPRAVA.....	64
6. ZAKLJUČAK	76
7. LITERATURA	78
ILUSTRACIJE.....	94
ŽIVOTOPIS	96

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Rak debelog crijeva

1.1.1. Epidemiologija

Prema bazi podataka GLOBOCAN (eng. *Global Cancer Observatory*) iz 2022 godine bilo je blizu 20 milijuna novih slučajeva raka uz to i 9,7 milijuna smrtnih slučajeva. Rak debelog i završnog crijeva treće je po redu sijelo raka u svijetu, nakon raka dojke i raka pluća. Čini oko 10% svih godišnje dijagnosticiranih slučajeva karcinoma i smrtnih ishoda povezanih s rakom na globalnom nivou [1]. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Hrvatskoj svake godine u prosjeku oboli oko 3600 ljudi, od čega je otprilike 60% muškaraca. Iako se češće javlja kod starijih osoba, gotovo petina oboljelih je mlađa od 60 godina. Prema najnovijim podacima Registra za rak u Hrvatskoj, u 2019. godini dijagnosticirano je 3660 slučajeva raka debelog i završnog crijeva, a prosječna dob u trenutku dijagnoze iznosila je 69 godina. Što se tiče smrtnosti od zloćudnih bolesti, rak debelog crijeva je na drugom mjestu, odmah iza raka pluća. Godišnje od njega umre oko 2100 osoba, također s udjelom od 60% muškaraca. Iako je stopa smrtnosti stabilna tijekom posljednjih deset godina, broj oboljelih raste po stopi od oko 1% godišnje u posljednjih 20 godina.

Postoje značajne varijacije u incidenciji raka debelog crijeva, mortalitetu i nedavnom epidemiološkom trendu između različitih zemalja i regija u svijetu, koje se djelomično objašnjavaju razlikama u izloženosti čimbenika rizika, demografskim karakteristikama i genetskim čimbenicima, uključujući genetske mutacije i njihov učinak na ishod i odgovor na terapiju [2,3]. Prema tome liječenje raka debelog i završnog crijeva predstavlja velik izazov kako za samog pacijenta tako i za liječnike i znanstvenike u tom području.

S obzirom na kontinuirani napredak u zemljama u razvoju, očekuje se da će broj novih slučajeva raka debelog i završnog crijeva globalno porasti na 2,5 milijuna do 2035. godine. Ovaj rast je uglavnom ograničen na zemlje s nižim i srednjim prihodima, dok se u visoko razvijenim zemljama bilježi stabilizacija ili smanjenje stope oboljenja. Ovi pozitivni trendovi u razvijenim zemljama pripisuju se učinkovitim nacionalnim programima probira i široj primjeni kolonoskopije [1]. U Hrvatskoj od 2007. godine postoji Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva. Odazivanjem u program te testiranjem rak debelog i završnog crijeva može se otkriti u ranom stadiju kad je preživljenje vrlo visoko.

Uz to, promjene u načinu života i prehranbenim navikama također imaju ulogu. Međutim, zabrinjavajuće je što se povećava broj pacijenata mlađih od 50 godina koji razvijaju rak debelog i završnog crijeva, osobito rak rektuma i lijevog dijela debelog crijeva [4].

1.1.2. Čimbenici rizika

Poznato je da na razvoj raka debelog i završnog crijeva utječe niz čimbenika rizika. Među čimbenike rizika ubrajaju se dob, način života, kao i prisutnost određenih komorbiditeta kod pacijenta. Epidemiološki podaci ukazuju na to da se učestalost bolesti značajno povećava kod osoba starijih od 50 godina, što je dovelo do preporuke za probir na okultno krvarenje kod populacije između 50 i 74 godine života. Osim starosne dobi, način života značajno utječe na rizik od raka debelog i završnog crijeva. Rizik od obolijevanja povećava se kod osoba koje imaju nezdrave navike poput pušenja, pretjerane konzumacije alkohola te loših prehranbenih navika, uključujući dijetu s niskim unosom voća, povrća i vlakana, kao i visokim unosom prerađenog, dimljenog crvenog mesa. Nedostatak redovite tjelesne aktivnosti također je značajan rizični faktor [5–7].

Pored navedenog, određene bolesti također doprinose povećanom riziku. Pacijenti koji boluju od dijabetesa tipa 2 [8], dugotrajne upalne bolesti crijeva, ili oni s prethodnom povijesti dijagnoze raka imaju veći rizik za razvoj raka debelog crijeva te zahtijevaju pažljiviji medicinski nadzor. Upalnu bolest crijeva karakteriziraju kronične upale gastrointestinalnog trakta u obliku Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa. Crohnova bolest je pokazala povećan rizik od raka debelog crijeva ali u manjem stupnju nego ulcerozni kolitis [9,10].

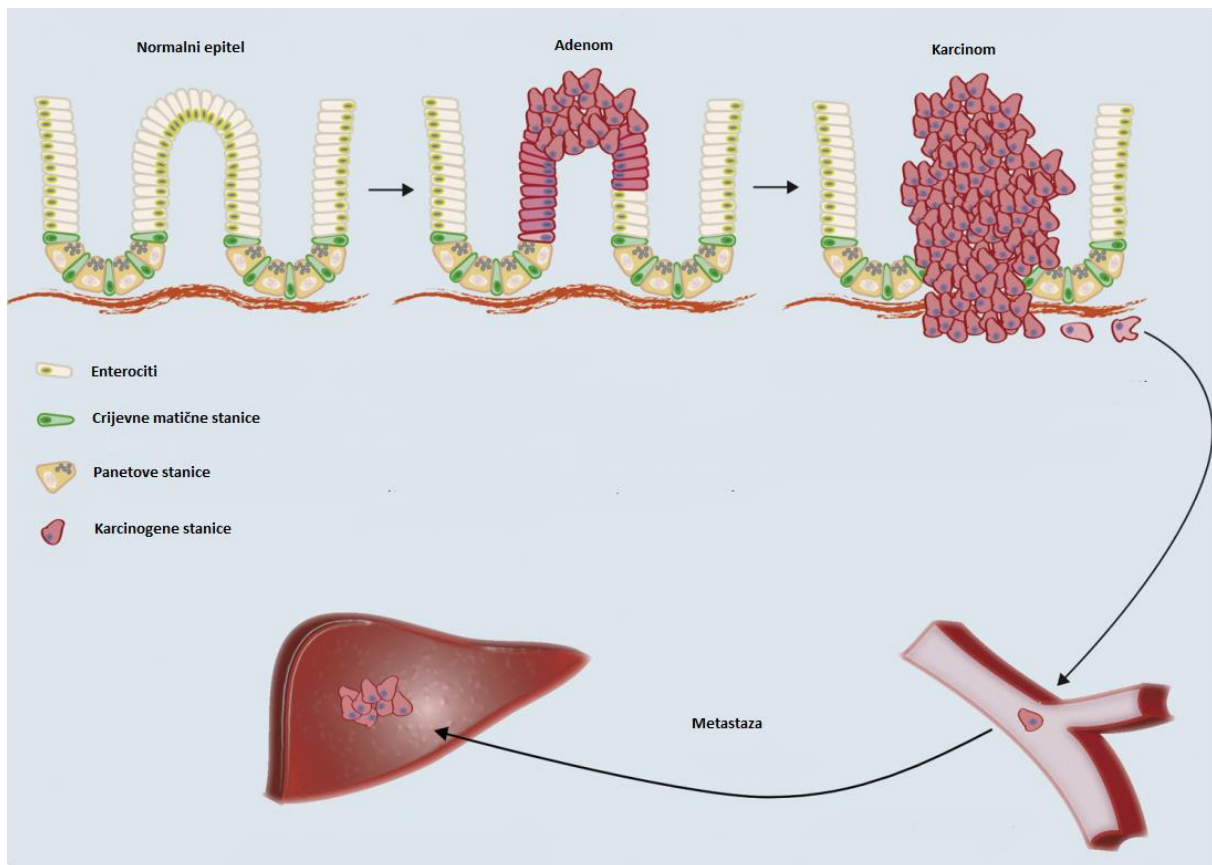
Pozitivna obiteljska anamneza povezana je s povećanim rizikom obolijevanja od raka debelog i završnog crijeva, pri čemu rizik varira ovisno o broju oboljelih članova obitelji, stupnju srodstva te dobi u kojoj je dijagnoza postavljena [11]. Na temelju studija provedenih na blizancima i obiteljima, procjenjuje se da nasljednost raka debelog i završnog crijeva iznosi između 12% i 35% [12]. Iako su brojne studije identificirale gene povezane s osjetljivošću na rak debelog crijeva (uobičajeni jednonukleotidni polimorfizmi), većina čimbenika nasljednosti ostaje nepoznata te zahtijeva daljnja istraživanja [13].

Ljudi mogu naslijediti genetske mutacije zbog kojih mogu nastati polipi na debelom crijevu. Takvi polipi mogu se transformirati u polipe koji postaju karcinogeni (adenomi) i stoga je važno rano ih otkriti i spriječiti razvoj i širenje raka debelog i završnog crijeva. Neki od nasljednih poremećaja koji uzrokuju polipe na debelom crijevu jesu:

1. Lynchov sindrom (nopolipozni kolorektalni karcinom) najčešći je oblik nasljednog raka debelog i završnog crijeva. Osobe s Lynchovim sindromom razviju malo polipa koji brzo postaju zloćudni. Povezan je i s tumorima dojki, želuca, tankog crijeva, mokraćnih putova i jajnika.
2. Obiteljska adenomatozna polipoza (FAP; engl. *Familial Adenomatous Polyposis*) uzrokuje razvoj stotina ili tisuća polipa u debelom crijevu. Ako se ne liječe, rizik od raka je gotovo 100% prije 40. godine. Genetsko testiranje može utvrditi rizik od FAP-a.
3. Gardnerov sindrom, varijanta FAP-a, uzrokuje polipe u debelom i tankom crijevu te nekarcinogene tumore u koži, kostima i trbuhu.
4. Polipoza povezana s MYH genom (gen odgovoran za popravak oštećenja DNA) (MAP; engl. *MUTYH-Associated Polyposis*) slična je FAP-u, uzrokovana mutacijama gena MYH. Genetsko testiranje otkriva rizik od MAP-a.
5. Peutz-Jeghersov sindrom počinje pjegama po tijelu, a zatim se razvijaju nekarcinogeni polipi u crijevima koji mogu postati zloćudni.
6. Sindrom nazubljene polipoze uzrokuje više polipa u gornjem dijelu debelog crijeva, s rizikom od zloćudne transformacije [14,15].

1.1.3. Patogeneza raka debelog crijeva

Rak debelog crijeva predstavlja složen proces koji se razvija kroz niz međusobno povezanih koraka, počevši od normalne intestinalne epitelne stanice do formiranja polipa, a zatim do invazivnog karcinoma. Ovaj proces može se opisati kroz nekoliko ključnih faza. Generalno razvoj raka debelog crijeva možemo opisati kroz četiri stadija: inicijacija, promocija, progresija i metastaziranje (Slika 1). Početni stadij u kojemu dolazi do promjena u stanicama nazivamo inicijacija. U toj fazi stanice počinju abnormalno rasti, ali još uvijek nema stvaranja tumora. Promocija je stadij u kojemu abnormalne stanice se počinju umnožavati stvarajući polipe koji su o u ovoj fazi benigni, no s vremenom mogu postati zloćudni. Kada se polipi formiraju u zloćudni tumor tada nastupa progresija. Tumorske stanice rastu nekontrolirano i mogu prodrijeti u okolna tkiva unutar crijeva i okolne strukture. Kada se tumorske stanice počnu širiti iz primarnog tumora putem krvi ili limfnog sustava u druge organe u tom trenu dolazi do metastaziranja. Ovo je završni i najteži stadij bolesti [16].



Slika 1. Stadiji razvoja raka debelog i završnog crijeva. (prilagođeno prema [16])

1.1.3.1. Normalna intestinalna epitelna stanica

U zdravom crijevnom tkivu, unutar kripti crijevnih resica, nalaze se intestinalne matične stanice čija je glavna funkcija održavanje homeostaze putem različitih signalnih puteva i međustaničnih interakcija. Ove matične stanice stvaraju prekursorske stanice koje prolaze proces diferencijacije u specijalizirane stanice potrebne za normalno funkcioniranje crijeva. Prema dosadašnjim istraživanjima, crijevne matične stanice eksprimiraju različite molekularne markere, pri čemu je LGR5 (engl. *leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5*), gen aktiviran putem Wnt signalnog puta, prepoznat kao jedan od najpouzdanijih markera za identifikaciju ovih stanica [17]. Daljnje studije su otkrile da matične stanice raka debelog crijeva dijele neka obilježja s normalnim crijevnim matičnim stanicama. Konkretno, LGR5, kao Wnt ciljni gen, opisan je kao potencijalni marker za tumorske matične stanice. Ova hipoteza da rak debelog crijeva može potjecati od intestinalnih matičnih stanica zasniva se na njihovoj dugovječnosti i sposobnosti samoobnavljanja. Matične stanice raka debelog crijeva rezultat su genetskih i epigenetskih promjena koje uzrokuju inaktivaciju tumor-supresorskih gena i aktivaciju onkogenih [18].

1.1.3.2. Genetske promjene i formiranje adenoma

Akumulacija genetskih mutacija u normalnim crijevnim stanicama može biti izazvana raznim faktorima, uključujući genetsku predispoziciju, izloženost karcinogenima i kronične upalne procese. Ove mutacije često zahvaćaju onkogene i tumorske supresorske gene, što dovodi do poremećaja u kontroli staničnog rasta i diferencijacije [19]. Klasično, rak debelog crijeva može se razvijati kroz dva glavna puta prekursorskih lezija. Prvi je tradicionalni put adenoma-karcinoma, poznat i kao sekvenca kromosomske nestabilnosti, koji vodi do 70–90% slučajeva raka debelog i završnog crijeva. Drugi put je nazubljena neoplazija, koja dovodi do 10–20% slučajeva. Ovi putovi uključuju složene genetičke i epigenetičke događaje, razvijajući se kroz sekvencijalne fenotipe kromosomske nestabilnosti.

1.1.3.3. Put adenoma karcinoma

Adenomi nastaju kada se promijene normalni mehanizmi koji kontroliraju popravak DNA i proliferaciju stanica. Kako mutirane stanice napreduju prema lumenu debelog crijeva, poremećen je proces diferencijacije i apoptoze, što dovodi do stvaranja adenoma. S vremenom polipi rastu, postaju displastičniji i mogu steći invazivni potencijal. Mutacije u genu APC genu (engl. *adenomatous polyposis coli*) [20] ili onkogenu BRAF [21] predstavljaju početne događaje za razvoj tradicionalnih adenoma ili nazubljenih polipa. Progresija do maligniteta zahtijeva akumulaciju specifičnih mutacija, a brzina ovisi o putu karcinogeneze. CIN put može trajati deset godina i više, dok MSI put traje nekoliko godina [22].

CIN put, prisutan u većini tumora debelog crijeva, obilježen je kromosomskim promjenama i mutacijama gena poput APC, TP53, KRAS i PIK3CA. Ove kariotipske abnormalnosti prate mutacije u genima za supresiju tumora APC i TP53 te aktivirajuće mutacije u KRAS i PIK3CA. Mutacija APC-a često je prvi genetički događaj u razvoju raka debelog crijeva. Gubitak funkcije APC-a dovodi do premještanja beta-katenina u jezgru i aktivacije Wnt signalnog puta, što potiče transkripciju gena povezanih s karcinogenezom. Wnt signalni put ključan je regulator proliferacije stanica crijevnog epitela i ilustrira kako poremećaj bilo kojeg dijela tog puta može utjecati na transkripciju mnogih gena, potičući razvoj tumora [20,23]. Wnt signalni put aktiviran je u gotovo svim CIN tumorima, a mutacije APC gena pronađene su u otprilike 80% ovih tumora.

Aktivirajuće mutacije KRAS-a često se javljaju nakon mutacija APC-a i prisutne su u gotovo 40% tumora. KRAS je komponenta više signalnih puteva rasta, uključujući EGFR put. Aktivacija KRAS-a vodi do kontinuirane aktivacije Raf-MEK-ERK puta, PI3K signalizacije

putem mTOR-a i faktora transkripcije NF-kB. Ova signalizacija potiče progresiju staničnog ciklusa i često je aktivna u tumorima, uključujući rak debelog crijeva [22,24]. Mnogi tumori debelog crijeva s mutacijama KRAS-a također imaju mutacije u genima koji kodiraju katalitičke podjedinice PI3K. PI3K je lipidna kinaza koja fosforilira fosfatidilinozitol, molekulu važnu za staničnu signalizaciju. Povećana aktivnost PI3K može pojačati sintezu prostaglandina i inhibirati apoptozu u stanicama tumora debelog crijeva, što doprinosi preživljavanju tumorskih stanica.

Gen TP53, smješten na ljudskom kromosomu 17p, najčešće je mutirani gen u tumorima. Njegov produkt, protein P53, regulira transkripciju gena povezanih s popravkom DNK i odgovorima stanica na oksidacijski stres. Gubitak funkcije P53 češće se detektira u raku debelog crijeva nego u adenomima s mikroskopskim invazivnim žarištima, te češće u invazivnim adenomima nego benignim. Oko 60% CIN tumora sadrži inaktivirajuće mutacije u TP53, što pridonosi napredovanju tumora i lošijoj prognozi [22,25].

Za razliku od CIN puta, koji je obilježen čestim promjenama broja kopija genoma, tumori debelog crijeva mogu se razviti i putem hipermutabilnih puteva, obilježenih čestim mutacijama baznih parova DNA. Glavni mehanizam za ovaj hipermutabilni fenotip je MSI put, koji nastaje zbog mutacija u genima za popravak pogrešnog sparivanja DNA (MMR), poput MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ili EPCAM. To uzrokuje nestabilnost u mikrosatelitnim regijama DNA, koje akumuliraju greške zbog poteškoća DNA polimeraze pri vezivanju na ponavljajuće sekvence [22].

1.1.3.4. Put nazubljene neoplazije

Put nazubljene neoplazije, odgovoran za razvoj 15% raka debelog i završnog crijeva, uključuje nazubljene polipe, poput hiperplastičnih polipa i sesilnih nazubljenih adenoma. Nazubljeni put je specifičan mehanizam nastanka raka debelog i završnog crijeva. Tempo progresije tumora nije potpuno definiran, ali tumori koji dobiju MSI obično napreduju brže od pretumorskih lezija do karcinoma, kao i svi tumori s visokom mikrosatelitnom nestabilnošću (engl. *MSI-high*). Glavna karakteristika nazubljenog puta je aktivirajuća mutacija u BRAF genu, koji je dio MAPK puta [26]. Ova mutacija ranoj fazi aktivira MAPK—ERK signalizaciju i nekontroliranu diobu stanica. Većina sesilnih nazubljenih adenoma sadrži BRAF mutacije, dok su rijetke u konvencionalnim adenomima, što potvrđuje da je nazubljeni put alternativni put razvoja raka debelog i završnog crijeva.

Nakon mutacije BRAF, nazubljeni tumori se razvijaju kroz dva smjera. Jedan smjer vodi spajanju s MSI putem, gdje mutacije u MMR genima rezultiraju MSI-high fenotipom. Ovi tumori najčešće nastaju iz sesilnih nazubljenih adenoma i dijele karakteristike CMS1 tumora. Alternativno, tumori s BRAF mutacijama mogu steći mutacije TP53 i aktivirati onkogene putove, uključujući Wnt i TGFB signalizaciju te epitelno-mezenhimalnu tranziciju, što rezultira MSS tumorima [22,26,27]. Ovi tumori često nastaju iz tradicionalnih nazubljenih adenoma i imaju obilježja CMS4 (mezenhimalni podtip) tumora.

Ovi tumori mogu se razviti u dva smjera: povezivanje s MSI i CMS1 tumora, ili MSS tumore s aktivacijom drugih onkogenih puteva. MSS tumori često aktiviraju Wnt signalizaciju i imaju lošiju prognozu. CIMP fenotip, povezan s hipermetilacijom CpG otoka, nalazi se u 20% tumora, često uz MSI i mutacije BRAF-a. CIMP status je povezan s BRAF mutacijama, a često se javlja u desnom kolonu starijih žena [27]. Međutim, njegova prognostička vrijednost ostaje nejasna. Strategije liječenja, poput kombinacije inhibitora BRAF-a, MEK-a i EGFR-a, pokazale su obećavajuće rezultate u kontroliranju tumora s mutacijom BRAF-a.

Prema navedenom, razvoj raka debelog i završnog crijeva povezan je s različitim putovima genomske nestabilnosti, uključujući kromosomsku nestabilnost i mikrosatelitsku nestabilnost, što potiče akumulaciju mutacija i progresiju bolesti. Ove promjene mogu dovesti do prekoračenja granica benignog rasta i prelaska u invazivni karcinom. U ovoj fazi, tumorske stanice gube normalne mehanizme kontrole rasta i počinju da prodiru u okolna tkiva. Ovaj proces je često praćen dodatnim mutacijama i epigenetskim promjenama koje omogućavaju tumorima da izbjegnu imunološki nadzor i razviju otpornost na terapije. U uznapredovalim slučajevima, tumorske stanice mogu se osloboditi primarnog tumora i migrirati kroz krvotok ili limfni sistem, formirajući sekundarne tumore u udaljenim organima. Ovaj proces dodatno komplicira liječenje i prognozu bolesti [19,28].

1.1.4. Molekularne mete u raku debelog crijeva

Mutacije gena supresora tumora, poput p53, i onkogeni, kao što su Kras ili Braf, prisutne su u oko 55% do 60% slučajeva raka debelog i završnog crijeva. Ove mutacije uzrokuju poremećaje u staničnoj proliferaciji, apoptozi, regulaciji staničnog ciklusa i mehanizmima popravke DNA. Mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK), uključujući kinaze regulirane ekstracelularnim signalima (Erk1/2), p38MAPK i Jun aminoterminalne kinaze (JNK), imaju ključnu ulogu u prenošenju i integraciji signala iz različitih podražaja te kontroli stanične proliferacije, diferencijacije, razvoja, upalnih odgovora i apoptoze u raku debelog crijeva [29].

Dodatno, aktivacija signalnog puta fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K/Akt) pospješuje napredovanje tumora kroz potiskivanje apoptoze i poticanje staničnog ciklusa. U raku debelog crijeva i tumorima povezanim s upalom, primijećena je aktivacija nuklearnog faktora κB (NF- κB), koji kontrolira ekspresiju gena odgovornih za sintezu proinflammatoryh medijatora i citokina, poput ciklooksigenaze 2 (COX-2), prostaglandina E2 (PGE2), inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS), faktora nekroze tumora alfa (TNF- α), interleukina 6 (IL-6) i IL-1 β , što doprinosi progresiji raka debelog crijeva [16,29].

Receptor epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) prisutan je u 60% do 80% slučajeva raka debelog i završnog crijeva i uključen je u signalne puteve kao što su Kras-Braf-MEK-MAPK i PI3K/Akt. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), koji je izražen u oko 50% karcinoma, predstavlja glavni faktor angiogeneze, koja igra ključnu ulogu u progresiji bolesti [30]. Također, ekspresija i aktivacija matriks metaloproteinaza (MMP)-2 i MMP-9 povezana je s razvojem raka, invazijom, angiogenezom i metastazama.

Signalni put transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β) kontrolira niz bioloških procesa, a poremećaji u ovom putu mogu potaknuti rast, migraciju, invaziju, angiogenezu i metastaze tumorskih stanica. Pored toga, povećanje nivoa bioaktivnog inzulinu sličnog faktora rasta (IGF)-1, bilo direktno ili putem smanjenja veznih proteina IGF-a, može potaknuti razvoj raka debelog i završnog crijeva povećanjem slobodnog IGF-1[29,30].

1.1.5. Klinički simptomi

Pacijenti s bolestima debelog crijeva mogu imati širok spektar znakova i simptoma koji variraju od blagih do ozbiljnih. Najčešći simptomi uključuju okultno (nevidljivo) ili očito rektalno krvarenje, promjene u ritmu pražnjenja crijeva, proljev (dijareja), zatvor (opstipacija), nadutost, anemiju te bolove u trbuhu. Unatoč tome, valja napomenuti da je rak debelog crijeva često bolest bez simptoma u ranim fazama i postaje simptomatski tek kada dosegne uznapredovali stadij.

Rektalno krvarenje, iako može biti alarmantan simptom, prisutno je i kod benignih stanja kao što su hemoroidi ili analne fisure (rane), kao i kod malignih tumora debelog crijeva i rektuma. Upravo zbog te nespecifičnosti, samo prisustvo krvarenja nije dovoljno za postavljanje dijagnoze. Stoga su potrebni dodatni testovi i pretrage kako bi se preciznije identificirale osobe koje zahtijevaju daljnje invazivnije postupke poput kolonoskopije ili biopsije [31,32].

S obzirom na to da je rano otkrivanje ključno za uspješno liječenje, preventivne mjere i pravovremeni pregledi imaju veliku važnost. Rano otkrivanje, uz pomoć testiranja na okultno krvarenje i drugih neinvazivnih metoda, može smanjiti potrebu za invazivnijim pretragama, osim kada klinička slika ili nalazi testova ukazuju na potrebu za daljnjom dijagnostikom [31,32].

1.1.6. Dijagnostika

Ako se rak debelog crijeva otkrije u ranoj fazi, stopa preživljavanja od 5 godina iznosi oko 90% i smanjuje se ako se rak proširi izvan debelog crijeva ili rektuma. Stoga je rano otkrivanje ključno za produženje života oboljelih. Trenutne uobičajene metode probira za rak debelog crijeva uključuju test okultne krvi u stolici, fleksibilnu sigmoidoskopiju i kolonoskopiju. Test na okultno krvarenje je široko dostupan i otkriva prisutnost hemoglobina u stolici enzimskim ili imunološkim metodama, ali njegova osjetljivost i specifičnost mogu varirati, što ograničava njegovu pouzdanost. Kolonoskopija se smatra zlatnim standardom za dijagnozu, ali je invazivna i uzrokuje nelagodu, što smanjuje stopu prihvatanja. Praćenje raka debelog crijeva nakon operacije obično uključuje slikovne metode poput CT-a i mjerenje tumorskih markera.

Test okultnog krvarenja (engl. *gFOBT, Guaiac Fecal Occult Blood Testing*) je brzi test pomoću kojega može se otkriti male količine krvi u stolici koje se ne mogu vidjeti golim okom. Male tragove krvi (hemoglobin) u stolici se otkrivaju pomoću kemikalija guaijak koje u kontaktu sa krvi mijenjaju boju dodatkom peroksidaze [33]. Otkrivanje ovako malih količina krvi u stolici može biti jedan od prvih znakova u otkrivanju različitih abnormalnosti u probavnom sustavu [33]. Osjetljivost testa varira između 12,9% i 79,4%, dok je specifičnost između 86,7% i 97,7% Test okultnog krvarenja jedan je od načina i strategija za Nacionalni program za rano otkrivanje raka debelog crijeva. Prema programu, test na okultno krvarenje osobama starijim od 50 godina. Šalje se na kućnu adresu te oni testiranje obave u kućnim uvjetima i šalju na daljnju analizu.

Genetsko ispitivanje stolice (FIT-DNA test) koristi kombinaciju genetskog (DNA) testiranja na prisutnost genetičkog materijala povezanog s rakom debelog crijeva i fekalnog imunološkog testa (FIT - antitijela usmjerena protiv ljudskog hemoglobina koji se koristi otkrivanje krvi u stolici). FIT ima veću osjetljivost (79%) i specifičnost (94%) u odnosu na gFOBT [33]. Pacijenti skupljaju uzorke kod kuće pomoću pribora te ih šalju u laboratorij.

Višeciljani test DNA stolice otkriva genetske promjene poput mutacija DNA, mikrosatelitne nestabilnosti, nepravilnog popravka pogrešaka u DNA i nenormalnih metilacija u uzorku

stolice. Test uključuje analizu mutiranog KRAS, metilirani BMP3 i NDRG4, te FIT za hemoglobin, s većom osjetljivošću za otkrivanje raka debelog crijeva ali nižom specifičnošću u usporedbi s gFOBT [33].

Endoskopija je medicinska dijagnostička procedura koja omogućuje liječnicima pregled unutarnjih organa i struktura tijela pomoću optičkog instrumenta endoskopa. Za dijagnosticiranje raka debelog crijeva kolonoskopija se smatra zlatnim standardom za pregled cijelog debelog crijeva, otkrivanje i uklanjanje polipa (adenoma). Kolonoskopija je primarna dijagnostička metoda za procjenu pozitivnih rezultata manje invazivnih testova, bilo da se radi o testovima stolice, seruma (krvi) ili slikovnim metodama za pregled crijeva [34]. Osim pregleda sluznice i polipa, liječnik može uzeti i komadić sluznice crijeva za patohistološku obradu gdje se uzorak dodatno može obraditi patohistološkim i imunohistološkim metodama. Kolonoskopija je invazivna metoda i stoga ima i svoja ograničenja. Za ovaj dijagnostički postupak potrebna je priprema crijeva, upotreba sedativa ili u nekim slučajevima anestezija. Uz navedeno, postoji rizik i od oštećenja sluznice crijeva kao i krvarenje nakon postupka [35].

Fleksibilna sigmoidoskopija je pretraga slična kolonoskopiji. Kolonoskopija pregledava cijelo debelo crijevo, dok sigmoidoskopija pokriva samo donji dio debelog crijeva i rektum. Osjetljivost i specifičnost sigmoidoskopije, koja pregledava prvih 60 cm debelog crijeva, slične su onima kod kolonoskopije, ali uz relativno manji rizik od perforacije [35].

CT kolonografija (virtualna kolonoskopija) se koristi kao komplementarna slikovna metoda za dijagnostiku polipa i raka debelog i završnog crijeva [19,33]. CT kolonografija je neinvazivna dijagnostička metoda koja koristi CT skener za stvaranje detaljnih slika debelog crijeva i rektuma. Ova metoda omogućuje liječnicima da pregledaju unutrašnjost crijeva kako bi otkrili polipe, tumore i druge promjene bez potrebe za umetanjem endoskopa. Omogućuje liječnicima pregled trodimenzionalnih slika debelog crijeva i prepoznavanje polipa veličine veće od 10 mm u 90% slučajeva, te polipa veličine 6–9 mm u 70–80% slučajeva [35]. Pacijent obično mora popiti kontrastno sredstvo kako bi se crijeva jasno prikazala na slikama. CT kolonografija je brža i manje invazivna od tradicionalne kolonoskopije, ali ne omogućuje istovremeno uklanjanje polipa ili biopsiju [35].

1.1.7. Tumorski biljezi (markeri)

U kliničkoj praksi, prilikom dijagnostike i terapijskih postupaka, koristi se nekoliko parametara koji su već dugo prepoznati po svojoj visokoj osjetljivosti, specifičnosti i pozitivnoj prediktivnoj vrijednosti. Ovi parametri odabrani su iz mnoštva molekula koje stanice proizvode,

a njihova je učinkovitost potvrđena kroz dugogodišnje laboratorijske analize, opservacijska istraživanja i kliničke studije. Koncentracije tumorskih biljega, ispitivane u ranoj fazi dijagnostike, smatraju se korisnima za rano otkrivanje raka i često se primjenjuju u probirnim testovima. Neki od tih biljega danas imaju veću važnost u praćenju liječenja i dugoročnom nadzoru pacijenata.

Također, kod određenih vrsta tumora, biljezi igraju ključnu ulogu u praćenju tijeka terapije, procjeni uspješnosti neoadjuvantnih tretmana, kirurških intervencija, adjuvantne kemoterapije i radioterapije te u nadzoru mogućeg povratka bolesti.

SEPT9 („SEPTIN9“) je član obitelji proteina koji vežu GTP (gvanozin trifosfat). Ima značajnu ulogu u ključnim staničnim procesima, uključujući promet vezikula, apoptozu i diobu stanica. U kontekstu karcinogeneze, tumorske stanice raka debelog crijeva oslobađaju mSEPT9 u perifernu krv. Ova karakteristika omogućuje relativno jednostavno i učestalo otkrivanje mSEPT9, prije, tijekom i nakon kirurških intervencija. Otkrivanje mSEPT9 u krvi potencijalno može pomoći u identificiranju i praćenju pacijenata oboljelih od raka debelog crijeva. Istraživanja usmjerena na analizu cirkulirajuće tumorske DNK u dijagnostici raka debelog crijeva pokazala su da je hipermetilacija SEPT9 jedan od najtočnijih biomarkera. Pokazana je visoka osjetljivost ovog biomarkera (do 100%) kao i snažna specifičnost (do 97%) za uznapredovali stadij raka debelog crijeva [36].

Karcinoembrionalni antigen ljudskog probavnog sustava (CEA), je glikoprotein specifičan za karcinomska tkiva probavnog sustava i fetalna tkiva [37]. Članovi CEA podskupine vezani su uz staničnu membranu te pokazuju složeni obrazac ekspresije u normalnim i tumorskim tkivima, pri čemu se CEA posebno ističe selektivnom ekspresijom u epitelu [38]. CEA biomarker se uglavnom koristi za praćenje učinka terapije i pokazatelj je ponovne aktivacije bolesti. Manje povišenje koncentracije CEA nakon operativnih zahvata može nam ukazati na lokalni povratak bolesti, dok visoko povećanje koncentracije CEA ukazuje na postojanje metastaza [39].

Karcinoantigen 19-9 (CA 19-9) je glikoprotein važan u dijagnostici raka debelog crijeva. Većina istraživača zaključila je da je osjetljivost CA 19-9 znatno niža od osjetljivosti CEA te da su povišene razine CA 19-9 loš prognostički faktor [40]. CA 19-9 (ugljikohidratni antigen) je glikoprotein visokog molekularnog težinskog koeficijenta koji se može osloboditi u krvotok. Ovaj biljeg koristi se u dijagnostici karcinoma gušterače, raka debelog crijeva i raka želuca. Kao i CEA, nije specifičan za određeni histološki tip karcinoma niti za organ iz kojeg potječe.

Međutim, kombinirani testovi CEA i CA 19-9 mogu povećati dijagnostičku osjetljivost. Nadalje, određivanje razina oba biljega koristi se kao postoperativni prognostički faktor za procjenu stadija bolesti i preživljenja [39].

Tkivno-specifični antigen polipeptida (TPS) opisan je kao koristan tumorski biljeg u mnogim malignim tumorima, kao i pokazatelj odgovora na kemoterapiju kod uznapredovalih gastrointestinalnih karcinoma. TPS je jedinstveni konjugirani lanac polipeptida koji se proizvodi u različitim fazama molekularnog ciklusa (S ili G2) te se nakon mitotske diobe oslobađa u tkivo. Visoka koncentracija TPS-a označava tumorsku aktivnost, ali ne nužno i masu tumora. Razine TPS-a u krvi, koje su snažno povezane s proliferacijom stanica raka, funkcija su brzine stanične diobe [40].

1.1.8. Patologija

Histologija ostaje ključna za određivanje stadija raka i planiranje liječenja. Uz TNM klasifikaciju (sustav koji se koristi za određivanje stadija karcinoma), sve važniji postaju histološko podtipiziranje, gradiranje i procjena limfatične, perineuralne i venske invazije. Tumorski biljezi poput MMR testa (engl. *mismatch repair* – *MMR*) i imunološkog skora dobivaju na značaju, posebno za identifikaciju Lynchovog sindroma i prilagodbu terapije. MMR testiranje se rutinski provodi imunohistokemijom, dok se PCR testiranje za MSI koristi u nejasnim slučajevima. Mutacije gena RAS i RAF imaju važnu ulogu kao prognostički i prediktivni biljezi u liječenju raka debelog i završnog crijeva [19,41].

1.1.9. Liječenje

Dijagnoza raka debelog crijeva zahtijeva sveobuhvatnu preoperativnu procjenu s ciljem određivanja lokalizacije tumora, procjene metastatske bolesti te identifikacije čimbenika povezanih s pacijentom i tumorom koji mogu utjecati na ishod ili promijeniti terapijski pristup.

Neki rani karcinomi mogu se uspješno liječiti isključivo lokalnim terapijskim pristupom. Učestalost ranih oblika raka debelog crijeva povećana je zahvaljujući programima probira, koji omogućuju otkrivanje malignih polipa u ranoj fazi. Takvi se polipi često mogu ukloniti endoskopskom resekcijom i biopsijom zahvaćenog tkiva [42]. Ova tehnika omogućuje patologu preciznu analizu rizičnih značajki, uključujući dubinu invazije submukoze, stupanj diferencijacije, prisutnost limfne invazije i pupanje tumora, kao i procjenu dubokih i lateralnih rubova. Endoskopska resekcija dokazano je održiva opcija za velike polipe i karcinome T1 stadija, pružajući prednost sigurnosti i nižih troškova u usporedbi s kirurškim zahvatom [19,43]. U slučajevima kada je endoskopska resekcija izazovna ili je rizik od komplikacija visok zbog

različitih čimbenika specifičnih za polip, poput veličine, lokacije, izgleda i sesilne prirode, kombinirana endoskopska i laparoskopska kirurgija (CELS) može značajno smanjiti troškove i stopu komplikacija, a istovremeno očuvati debelo crijevo pacijenta [42].

Kirurški zahvat ostaje temelj terapije raka debelog crijeva kada je cilj liječenje s kurativnom namjerom. Kvaliteta kirurške resekcije ključno je mjerilo ishoda i može se procijeniti objektivnim parametrima. Laparoskopska kirurgija postala je standardna metoda liječenja raka debelog crijeva u mnogim zemljama, s dokazanim kratkoročnim prednostima potvrđenim u randomiziranim studijama i populacijskim istraživanjima [42].

Radioterapija se koristi u liječenju lokalno uznapređovalog raka rektuma i metastatskog raka debelog crijeva. Standardna preoperativna terapija uključuje neoadjuvantnu radioterapiju s kemoterapijom, koja smanjuje volumen tumora i smanjuje lokalne recidive. Postoje dvije vrste terapije: dugotrajna (50,4 Gy u 25–28 frakcija) i kratkotrajna (25 Gy u 5 frakcija), s različitim profilima komplikacija [44]. Kod metastatskog raka debelog crijeva, stereotaktička ablativna radioterapija (SABR) koristi se za liječenje metastaza u jetri i plućima, posebno kod pacijenata koji nisu kandidati za operaciju, ali uz ograničenja zbog osjetljivosti zdravih tkiva i visokih stopa recidiva. Kombinacija SABR-a s drugim terapijama može poboljšati ishode. Ovakav multidisciplinarni pristup omogućuje personalizirano i precizno liječenje, optimizirajući ishode za pacijente s rakom debelog i završnog crijeva (39, 41).

1.1.10. Kemoterapija, imunoterapija i biološka terapija

Liječenje raka debelog crijeva kemoterapijom, imunoterapijom i biološkom terapijom ovisi o stadiju bolesti, prisutnosti metastaza i molekularnim obilježjima tumora (Slika 2). Provesti ovo u praksu, potrebno je razumjeti kako specifične terapije djeluju u skladu s karakteristikama tumora, što je posebno važno s obzirom na heterogenost bolesti i odgovor na terapiju. Uloga imunoterapije postaje sve značajnija, jer se pokazuje da može značajno poboljšati ishod pacijenata, posebno u kontekstu progresivnog oblika bolesti. Različiti biomarkeri mogu dodatno pomoći u personalizaciji tretmana i optimizaciji kliničkih ishoda.

Kemoterapija je medicinski tretman koji koristi lijekove za uništavanje stanica raka ili zaustavljanje njihovog rasta. Cilj kemoterapije je smanjiti veličinu tumora, spriječiti širenje raka ili eliminirati stanice raka koje su se proširile po tijelu. Standardni lijekovi u kemoterapiji raka debelog crijeva su citostatici bazirani na fluorouracilu. 5-fluorouracil (5-FU) je citostatik koji se koristi u liječenju raka debelog crijeva samostalno (kapecitabin - oralni oblik 5-FU) ili kombiniran s leukovorinom i oksaliplatinom (FOLFOX protokol) ili leukovorinom i

irinotekanom (FOLFIRI protokol) [45]. Primjenjuje se intravenski ili oralno u ciklusima svakih 2-3 tjedna, obično tijekom 3-6 mjeseci za adjuvantnu terapiju nakon operacije ili dulje za metastatsku bolest.

Imunoterapija je oblik liječenja raka koji koristi pacijentov vlastiti imunološki sustav za borbu protiv tumora. Cilj imunoterapije je pojačati ili ponovno aktivirati imunološki odgovor tijela kako bi prepoznao i uništio stanice raka. Imunoterapija je bazirana na korištenju pembrolizumaba i nivolumaba koji se koriste kod tumora s visokim mikrosatelitskim nestabilnostima (MSI-high) ili nedostatkom popravka neusklađenih baza (dMMR) [46,47]. Način primjene je intravenozno svaka 2-3 tjedna, ovisno o lijeku. Cilj ovakve terapije je poticanje imunološkog sustava na prepoznavanje i uništavanje stanica raka. Uglavnom se koristi za metastatski rak [48].

Biološki lijekovi u terapiji raka su medicinski pripravci proizvedeni iz živih organizama ili njihovih derivata koji ciljano djeluju na specifične molekule ili procese unutar stanica raka ili njihovog mikrookruženja. Za razliku od tradicionalnih kemoterapijskih lijekova koji nespecifično uništavaju stanice koje se brzo dijele, biološki lijekovi imaju precizan mehanizam djelovanja, čime se smanjuju nuspojave i povećava učinkovitost terapije. Od bioloških lijekova najčešće se koriste Bevacizumab (anti-VEGF), cetuksimab i panitumumab (anti-EGFR). Način primjene je intravenozno u kombinaciji s kemoterapijom, obično svaka 2-3 tjedna. Bevacizumab sprječava stvaranje krvnih žila koje hrane tumor, dok anti-EGFR terapija djeluje na tumore s divljim tipom gena KRAS/NRAS [47]. Optimalni pristup određuje se na temelju stadija bolesti, genetskih testova i općeg zdravstvenog stanja pacijenta.

Kemoterapija	Biološki lijekovi	Novi lijekovi	Ciljana terapija
• Fluorouracil • Oksaliplatin • Irinotekan	• Anti-VEGF lijekovi • Anti-EGFR lijekovi	• Regorafenib • Trifurane-pipidin (TAS-102)	• Imunoterapija • BRAF ili BRAF plus • MEK inhibitori

Slika 2. Terapija u liječenju raka debelog i završnog crijeva (prilagođeno prema referenci 19)

Sustavna terapija metastatskog raka debelog crijeva prilagođava se tumorskim biljezima specifičnim za pojedinog bolesnika i karakteristikama bolesti. Razvoj učinkovitih terapijskih opcija, u kombinaciji s napretkom u kirurškim i povezanim specijalnostima, značajno se produžilo ukupno preživljavanje pacijenata.

Ključna odluka u liječenju metastatskog raka debelog crijeva jest određivanje terapijskog cilja – kurativnog ili palijativnog. Ta odluka prvenstveno ovisi o opsegu metastatske bolesti. U određenim slučajevima, ograničene metastaze mogu biti kirurški resecirane s ciljem potencijalnog izlječenja. Također, kod pacijenata sa široko rasprostranjenim metastazama, uspješna primjena sustavne terapije može omogućiti lokalno liječenje u svrhu dugotrajnog upravljanja bolešću. Konverzijske terapije, usmjerene na smanjenje veličine tumora kako bi postali prikladni za kiruršku resekciju, sve se više koriste u ovakvim slučajevima.

Sustavna terapija za metastatski rak debelog crijeva temelji se na kemoterapijskim protokolima koji uključuju fluoropirimidine, oksaliplatin i irinotekan, primijenjene u dvostrukim ili trostrukim kombinacijama. Ovi režimi često se nadopunjuju biološkim lijekovima, odabranim na temelju specifičnih karakteristika tumora i pacijenta, poput molekularnih biljega. Pacijenti s metastatskim rakom debelog i završnog crijeva obično prolaze kroz nekoliko linija terapije, prilagođenih njihovom kliničkom stanju i odgovoru na liječenje [42].

Uz standardne terapijske modalitete, istraživanja sve više uključuju alternativne terapije poput protuupalnih lijekova, probiotika i lijekova na bazi zlata, s ciljem povećanja učinkovitosti liječenja i smanjenja nuspojava. Ove inovativne strategije predstavljaju važan korak prema personaliziranom pristupu u liječenju metastatskog raka debelog crijeva [49].

1.1.11. Mikrookoliš raka debelog crijeva

Tumorski mikrookoliš igra ključnu ulogu u razvoju, progresiji i terapijskoj otpornosti raka debelog crijeva. Naime, interakcije između tumorskih stanica i okolnih, staničnih i ne-staničnih komponenti, kao što su imunološke stanice, strome i ekstracelularna matrica, oblikuju imunološke odgovore i mogu dovesti do stvaranja povoljnog okruženja za rast tumora. Istraživanje ovih interakcija otkriva mogućnosti za ciljanje specifičnih mehanizama unutar mikrookoliša tumora kako bi se unaprijedila terapija. Primjerice, korištenje kratkolančanih masnih kiselina (SCFAs; *eng. Short-chain fatty acids*) može poboljšati imunološke odgovore i pospješiti učinkovitost liječenja raka debelog crijeva, čime se naglašava važnost mikrookoliša u strategijama liječenja. Ova važnost dodatno je objašnjena u nedavnim istraživanjima koja pokazuju potencijal mRNA-baziranih cjepiva koje istovremeno ciljaju heterogene populacije

raka, uključujući one s KRAS mutacijama, te tako unapređuju terapijske odgovore i smanjuju rast tumora u prisutnosti imuno-supresivne mikrookoline [50].

Aktivirani fibroblasti povezani s rakom (CAF; engl. *cancer-associated fibroblast*) potiču rast tumora, stvaranje novih krvnih žila i invaziju, dok istovremeno stvaraju imunosupresivno okruženje kroz izlučivanje citokina i kemokina [51]. Također, korištenje imunoloških blokada, kao što su inhibitori PD-1 i PD-L1, pokazalo je uspjeh u liječenju raznih tipova raka, no otpor prema tim terapijama ostaje veliki problem, što dodatno ističe potrebu za boljim razumijevanjem interakcija unutar mikrookoline [52].

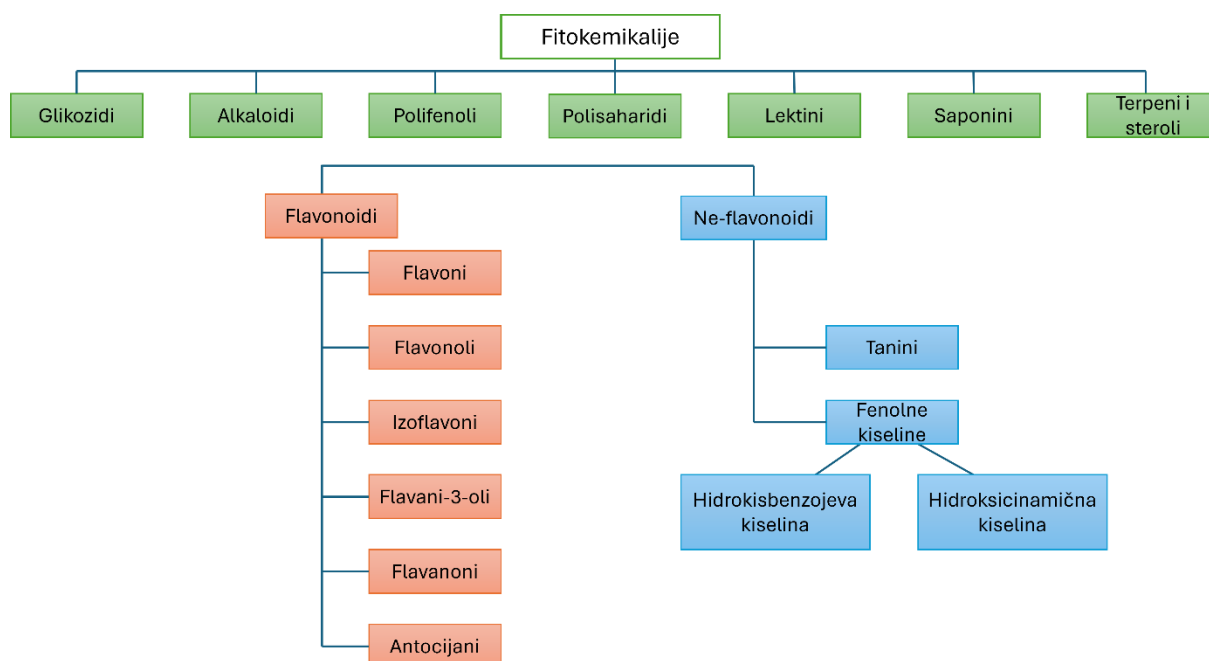
Tumori u crijevima, poput raka debelog crijeva, imaju raznolike stanične komponente koje čine mikrookruženje tumora. Među tim stanicama, imunološke stanice koje prodiru u tumor su važne za promjenu imunološkog odgovora i mogu utjecati na rezultate liječenja. Na primjer, te stanice mogu biti prepreka ili pomoć u liječenju, u zavisnosti o stanju stanične infiltracije i interakciji s drugim komponentama mikrookruženja [53]. Također, Wnt signalizacija, koja je bitna za razvoj i održavanje stanica, povezana je s karcinogenezom. Ovaj put može utjecati na karcinomske matične stanice, metastazu i kontrolu imunoloških odgovora [54]. Razumijevanje ovih interakcija je važno za razvoj učinkovitih strategija liječenja, obzirom da pravilna modifikacija staničnih komponenti može poboljšati rezultate liječenja i smanjiti otpornost na liječenje.

1.2. Fitokemikalije

Fitokemikalije su prirodni spojevi prisutni u biljkama koji imaju ključnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja i pružanju raznolike zdravstvene koristi. Fitokemikalije čine raznolik skup bioaktivnih spojeva koje klasificiramo prema kemijskoj strukturi, uključuju polifenole, alkaloidne, karotenoide i spojeve dušika [55]. Ovi spojevi prirodno se nalaze u voću, povrću, žitaricama i drugim biljnim proizvodima te su često odgovorni za specifične karakteristike biljaka, poput pigmentacije boje i mirisa. Štoviše, mnogi od njih ključni su za zaštitu domaćina od virusa, parazita i drugih štetnih vanjskih čimbenika. Istraživanja su pokazala da ovi spojevi mogu utjecati na proliferaciju stanica i regulaciju staničnog ciklusa te obično sudjeluju u raznim signalnim putevima koji su često poremećeni tijekom inicijacije, proliferacije i širenja tumora [55,56]. Biološka aktivnost fitokemikalija može značajno varirati ovisno o pripremi i prirodi biljaka što dodatno naglašava važnost daljnjih istraživanja i zanimanja znanstvenika.

Mnoge fitokemikalije, koje se nalaze u različitim biljkama, pokazuju važne farmakološke učinke i predmet su intenzivnih istraživanja. Na primjer, fenolne kiseline i flavonoidi, prisutni

u voću i povrću, djeluju kao snažni antioksidansi, štiteći stanice od oksidacijskog stresa i smanjujući rizik od kroničnih bolesti kao što su srčane bolesti i rak [56]. Također, saponini u nekim biljkama pokazuju protuupalna svojstva, što sugerira moguću primjenu u liječenju upalnih stanja. Istraživanja pokazuju širok spektar bioaktivnih tvari koje ne samo da hrane tijelo, nego i jačaju imunološki sustav i štite od raznih bolesti [57]. Različiti oblici prirodnih proizvoda, kao što su začini i biljni ekstrakti, pomažu u regulaciji metabolizma i poboljšavaju probavu, što dodatno potvrđuje važnost ubacivanja fitokemikalija u svakodnevnu prehranu [57]. Tako farmakološki učinci fitokemikalija ne samo da pomažu zdravlju, nego također otvaraju nove mogućnosti za inovativne pristupe u modernoj medicini.



Slika 3. Klasifikacija fitokemikalija (prilagođeno prema [58])

1.2.1. Fitokemikalije u prevenciji i liječenju raka debelog crijeva

Epidemiološka istraživanja pokazala su povezanost unosa hrane bogate fitokemikalijama s nižim rizikom od raka debelog crijeva. Utvrđeno je da fitokemikalije mogu modulirati ključne stanične signalne puteve ciljajući različite faze razvoja raka debelog crijeva uključujući faze inicijacije do faze progresije. Korištenjem *in vitro* i *in vivo* modela, prehrambene fitokemikalije su povezane s nizom antikancerogenih aktivnosti: antiproliferacijom, blokadom staničnog ciklusa, izmjenom popravka DNA, indukcijom apoptoze, protuupalnim djelovanjem, aktivacijom gena supresora tumora i supresijom onkogeni, regulacijom razina hormona i čimbenika rasta te inhibicijom invazije, angiogeneze i metastaza [56,59,60]. Učinkovitost

fitokemikalija dokazana je u modulaciji karcinogenih procesa putem izmjene različitih molekularnih meta, poput Wnt/ β -katenina, PI3K/Akt/mTOR, MAPK (p38, JNK i Erk1/2), EGFR/Kras/Braf, TGF- β /Smad2/3, STAT1-STAT3, NF- κ B, Nrf2 i kompleksa ciklina-CDK [56,59,61]. Mnogi od ovih signalnih puteva mogu predstavljati terapijsku metu novih suvremenih programa za otkrivanje novih lijekova u liječenju raka debelog crijeva. Fitokemikalije i njihovi derivati imaju značajnu ulogu u istraživanjima liječenja raka, uključujući i rak debelog crijeva. Međutim, većina fitokemikalija i njihovih derivata koristi se eksperimentalno, u kliničkim ispitivanjima ili kao komplementarna terapija, ali ne i kao standardni dio protokola.

1.2.1.1. Fitokemikalije u istraživanjima liječenja raka

Kurkuminoidi, čiji je glavni predstavnik kurkumin, prirodni su spojevi koji se nalaze u korijenu kurkuma (lat. *Curcuma longa*) iz obitelji đumbira (lat. *Zingiberaceae*) i jedni od najviše istraženih biljnih spojeva u ovom području. Poznati su po svom antioksidacijskom, protuupalnom i antiproliferativnom djelovanju [62]. Kurkumin može modulirati faktore rasta i nekoliko signalnih puteva koji su odgovorni za inicijaciju, proliferaciju i progresiju raka debelog crijeva.

U stanicama raka debelog crijeva kurkumin ili njegovi analozi su inhibirali staničnu proliferaciju ili preživljavanje ciljanjem različitih signalnih puteva, uključujući inhibiciju ekspresije EGFR, PI3k/Akt/mTOR, MEK, Wnt/ β -katenin, GSK-3 β kinaza i NF- κ B, kao i porast ekspresije signalizacije p-Erk1/2 i p-AMPK [63,64]. Dodatno, korištenje kurkumina izazvalo je disfunkciju mitohondrija i lizosoma te aktivaciju autofagije što je induciralo staničnu smrt. Iako je kurkumin u kliničkim ispitivanjima pokazao potencijal za modulaciju upalnih procesa i inhibiciju rasta stanica raka debelog crijeva, još uvijek nije standardiziran za terapijsku upotrebu [64].

Resveratrol, koji se nalazi u grožđu, kikirikiju i bobičastom voću, poznat je po svojoj sposobnosti indukcije apoptoze te inhibicije angiogeneze i metastaza. U istraživanjima, resveratrol je inducirao apoptozu aktiviranjem mitohondrija, direktnim ili indirektnim putem, reguliranjem ekspresije proapoptotičkih proteina kao što su Bok, Bak1, Bik, Bad, Noxa, Bax, Apaf1 i p53, te u isto vrijeme smanjujući ekspresiju antiapoptotičkih proteina Bcl-xL, Bcl-2 i Bag1 u stanicama raka debelog crijeva SW-620 i LoVo [65,66]. U stanicama raka debelog crijeva SW620 i HCT116 povećao je ekspresiju cijepanih oblika proteina PARP, te kaspaza-3,-7 i-9. Regulira signalne puteve poput p53, PI3K/Akt i NF- κ B, što ga čini zanimljivim

kandidatom za istraživanja u prevenciji raka debelog crijeva [65,66]. Posebno se proučava njegov potencijal za inhibiciju razvoja polipa kod osoba s visokim rizikom od razvoja raka.

Epigallocatehin-3-galat (EGCG) je snažan antioksidans prisutan u zelenom čaju (lat. *Camellia sinensis*). U različitim staničnim linijama raka debelog crijeva pokazano je da EGCG djeluje na modulaciju višestrukih signalnih puteva. EGCG je inhibirao proliferaciju stanica inhibicijom Wnt/ β -katenin i PI3K/Akt signalnih puteva i induciranje apoptoze putem aktivacije p53-ovisnih i p53-neovisnih signalnih puteva [67]. Dodatno, njegovo djelovanje uključuje inhibiciju angiogeneze i metastaza te poticanje apoptoze [68]. Pretkliničke studije pokazale su da EGCG smanjuje rast tumora raka debelog crijeva, čime je privukao pozornost kao potencijalno sredstvo u prevenciji raka debelog crijeva.

Genistein, izoflavon koji se nalazi u soji, ima antikarcinogena svojstva jer potiče apoptozu i inhibira angiogenezu. Kemopreventivno djelovanje genisteina ili njegovih derivata pokazano je u inhibiciji progresije raka debelog crijeva gdje u eksperimentalnim modelima inhibira signalni put Wnt/ β -katenin [69]. Antiproliferativno djelovanje temelji se na regulaciji signalnih puteva poput MAPK i PI3K/Akt. Apoptotička smrt stanica raka debelog crijeva povezana su s inhibicijom NF- κ B put, kao i smanjenim Bcl-2 proteinom, pojačanom ekspresijom Bax proteina [69,70].

1.2.1.2. Fitokemikalije u standardnim protokolima za liječenje raka

Iako fitokemikalije u svom izvornom obliku nisu često dio standardnih protokola za liječenje raka, njihovi derivati i sintetizirani spojevi značajno su doprinijeli razvoju moderne onkologije. Dva takva spoja s korijenima u fitokemijskom istraživanju ističu se svojom primjenom: paklitaksel i irinotekan.

Paklitaksel, poznat i pod trgovačkim imenom Taxol, prirodni je spoj dobiven iz kore pacifičke tise (lat. *Taxus brevifolia*). Ovaj spoj pokazuje snažno antitumorsko djelovanje inhibicijom stanične diobe, što postiže stabilizacijom mikrotubula tijekom mitoze, čime sprječava razdvajanje kromosoma [71,72]. Paklitaksel se koristi u liječenju nekoliko vrsta raka, uključujući rak dojke, jajnika i pluća. Međutim, iako je izuzetno učinkovit u tim indikacijama, paklitaksel nije dio standardnih protokola za liječenje raka debelog crijeva, jer za tu vrstu raka nije pokazao dovoljno ciljanog učinka.

S druge strane, irinotekan, polusintetski derivat kamptotecina, ima ključnu ulogu u terapiji raka debelog crijeva. Kamptotecin je prirodni alkaloid izoliran iz biljke *Camptotheca acuminata*,

poznate i kao "stablo sreće". Irinotekan djeluje kao inhibitor enzima topoizomerase I, koji je odgovoran za relaksiranje zavojitosti DNA tijekom replikacije. Inhibicijom topoizomerase I, irinotekan izaziva prekide u DNA lancima, što dovodi do smrti stanica raka [73,74].

Irinotekan je posebno značajan u liječenju metastatskog raka debelog crijeva, gdje se često primjenjuje u sklopu FOLFIRI protokola. Ovaj protokol kombinira irinotekan s leukovorinom (folnom kiselinom) i 5-fluorouracilom, djelujući sinergijski kako bi usporio progresiju bolesti i poboljšao preživljenje bolesnika. Irinotekan se pokazao izuzetno korisnim u liječenju bolesnika čija je bolest uznapredovala, a njegova uloga u standardnim protokolima čini ga jednim od najvažnijih lijekova temeljenih na istraživanju fitokemikalija [73,74].

Ovi primjeri ističu kako prirodni spojevi i njihovi derivati mogu pružiti temelj za razvoj učinkovitih terapija protiv raka, uključujući i one koje su postale standard u kliničkoj praksi.

1.2.1.3. Fitokemikalije u potpornoj terapiji raka debelog crijeva

Fitokemikalije, iako nisu dio glavnih terapijskih protokola, ponekad se koriste za ublažavanje nuspojava koje prate kemoterapiju, pružajući podršku pacijentima tijekom liječenja. Dva primjera fitokemikalija koje su se pokazale korisnima u tom kontekstu su gingerol i proantocijanidini.

Gingerol, bioaktivni spoj koji se nalazi u đumbiru (lat. *Zingiber officinale*), često se koristi za smanjenje mučnine i povraćanja povezanih s kemoterapijom. Njegovo djelovanje temelji se na sposobnosti moduliranja receptora serotonina i drugih puteva povezanih s gastrointestinalnim sustavom, čime se ublažava osjećaj nelagode kod pacijenata [75]. Đumbir i njegovi ekstrakti stoga su postali popularni dodaci u suportivnoj terapiji tijekom onkološkog liječenja.

Proantocijanidini, snažni antioksidansi prisutni u brusnicama (lat. *Vaccinium macrocarpon*), pokazali su potencijal u smanjenju oksidacijskog stresa izazvanog kemoterapijom. Kemoterapijski lijekovi često uzrokuju povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva, što može oštetiti zdrave stanice. Proantocijanidini djeluju neutralizacijom tih spojeva i zaštitom stanica od oksidacijskih oštećenja, čime pridonose smanjenju nuspojava terapije [76].

1.2.2. Utjecaj fitokemikalija na modulaciju oksidacijskog stresa u raku debelog crijeva

Oksidacijski stres u stanici nastaje kada postoji neravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i sposobnosti stanice da ih neutralizira pomoću antioksidacijskih sustava. Ovo stanje može dovesti do oštećenja biomolekula kao što

su proteini, lipidi i DNA, što može utjecati na normalnu funkciju stanice i dovesti do bolesti, primjerice tumora.

Jedna od ključnih prednosti fitokemikalija je njihova selektivnost. Ovi učinci ovise o koncentraciji fitokemikalija i specifičnom okruženju stanica. U zdravim stanicama, pri nižim koncentracijama, djeluju kao antioksidansi, neutralizirajući slobodne radikale i štiteći stanice od oksidacijskog stresa. S druge strane, u tumorskim stanicama, više koncentracije fitokemikalija mogu inducirati oksidacijski stres, što dovodi do oštećenja i apoptoze, odnosno smrti stanica raka. Ova selektivnost temelji se na razlikama u razinama reaktivnih kisikovih spojeva i kapacitetu za neutralizaciju oksidacijskog stresa između zdravih i tumorskih stanica [77].

Fitokemikalije, kao što su resveratrol, EGCG i kurkumin, neutraliziraju reaktivne kisikove spojeve u zdravim stanicama [62,66,67,76]. One štite biomolekule poput DNA, lipida i proteina od oksidacijskih oštećenja aktiviranjem endogenih antioksidacijskih enzima poput superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx). Također potiču ekspresiju regulatora oksidacijskog stresa, poput Nrf2, koji pokreće antioksidacijske gene i enzime za detoksikaciju [78,79]. Ovi spojevi popravljaju oštećenja DNA i smanjuju učestalost mutacija. Njihovo djelovanje smanjuje rizik od transformacije zdravih stanica u tumorske.

Tumorske stanice imaju povišenu razinu ROS-a zbog ubrzanog metabolizma i defektnih antioksidacijskih sustava. Fitokemikalije, poput kurkumina i sulforafana, pojačavaju proizvodnju ROS-a, čime premašuju sposobnost tumorskih stanica za neutralizaciju oksidacijskog stresa [76]. Ovo dovodi do oštećenja DNA, mitohondrijske disfunkcije i aktivacije apoptotičkih puteva. Povećana razina oksidacijskog stresa potiče smrt tumorskih stanica putem apoptoze. Fitokemikalije reguliraju proapoptotske signalne puteve poput p53 i Bax te inhibiraju antiapoptotske proteine (Bcl-2), čime ciljaju specifične mehanizme preživljavanja tumorskih stanica [76,79].

Istraživanja su pokazala da fitokemikalije kao što su flavonoidi mogu utjecati na oksidacijski stres, potičući procese poput apoptoze i autofagije, čime se usporava rast tumora. Ključni regulatorni proteini, kao što je Nrf2, igraju ključnu ulogu u staničnoj obrani od oksidacijskog oštećenja pojačavanjem ekspresije antioksidacijskih gena [78]. Disregulacija ovog puta može rezultirati smanjenom staničnom obranom, omogućujući nekontroliranu proliferaciju i preživljavanje malignih stanica. Naime, aktivacija putova poput MAPK i PI3K/Akt, često

pogoršana oksidacijskim stresom, dodatno pridonosi onkogenezi promicanjem rasta stanica i mehanizama preživljavanja [76,79].

1.2.3. Utjecaj fitokemikalija na modulaciju apoptoze u raku debelog crijeva

Apoptoza je programirani proces stanične smrti koji organizmu omogućuje uklanjanje oštećenih, nepotrebnih ili potencijalno štetnih stanica kako bi se održala stanična homeostaza i spriječila bolesti poput raka. Fitokemikalije imaju izraženu sposobnost modulacije signalnih puteva odgovornih za apoptozu, proliferaciju i metabolizam stanica, osobito kod raka debelog crijeva. Njihova uloga u regulaciji signalizacijskih kaskada, poput MAPK, PI3K/Akt i mTOR puteva, ključna je za vraćanje ravnoteže staničnih procesa koji su često poremećeni u malignim stanicama [76].

MAPK signalni put, odgovoran za regulaciju proliferacije, diferencijacije i apoptoze, često je disreguliran u raku debelog crijeva. Kurkumin i resveratrol, kao dva najviše istraživana fitokemijska spoja, pokazali su sposobnost inhibicije fosforilacije proteina u MAPK signalnom putu, uključujući ERK i p38 kinaze [64,66]. Ovi učinci rezultiraju smanjenjem proliferacije tumorskih stanica i poticanjem apoptotskih procesa, čime se prekida progresija tumora i smanjuje njihova otpornost na terapiju.

Uloga PI3K/Akt signalnog puta, čija disregulacija često vodi ka preživljavanju i otpornosti tumorskih stanica, dodatno ističe važnost fitokemikalija u terapiji raka debelog crijeva. Spojevi poput kurkumina djeluju inhibicijom PI3K/Akt puta, aktivirajući efektore poput FOXO3a, koji potiče ekspresiju pro-apoptotskih gena i odgovora na stanični stres [76,80]. Ova modulacija potiče proces apoptoze i smanjuje staničnu otpornost na citotoksične agense. Nadalje, resveratrol, poznat po svojim protuupalnim i antioksidacijskim svojstvima, dodatno doprinosi inhibiciji ovih signalnih puteva, istodobno smanjujući proliferaciju i povećavajući osjetljivost stanica na kemoterapijske tretmane [76].

Signalni put mTOR, često hiperaktiviran u stanicama raka debelog crijeva, ključno je mjesto djelovanja fitokemikalija. Ovaj put kontrolira anaboličke procese poput sinteze proteina i lipida, koji su neophodni za rast tumorskih stanica. Kurkumin je pokazao sposobnost inhibicije mTOR puta, čime se prekidaju ti procesi i potiče uništavanje abnormalnih stanica [80].

Osim toga, fitokemikalije mogu aktivirati transkripcijski faktor FOXO3a, potičući ekspresiju gena ključnih za apoptozu i odgovore na stanični stres [81,82]. Ovaj dvostruki mehanizam djelovanja otkriva potencijalnu strategiju u kojoj fitokemikalije mogu senzibilizirati stanice

raka debelog crijeva na postojeće terapijske protokole, ponovno uspostavljajući normalnu apoptotsku signalizaciju, što u konačnici vodi smanjenju rasta tumora i poboljšanim ishodima za pacijente.

Identifikacija i razumijevanje uloge proteina SIRT6 u apoptozi otvara nove mogućnosti za terapijska istraživanja raka debelog crijeva. Kao ključni regulator histonske acetilacije, SIRT6 utječe na ekspresiju brojnih gena povezanih s preživljavanjem stanica i apoptozom. Njegova sposobnost moduliranja MAPK puta pridonosi staničnim odgovorima na stres i apoptozu [83]. Osim toga, SIRT6 je povezan s regulacijom metabolizma glukoze i popravkom DNA, što je ključno za preživljavanje stanica raka. Ciljanjem puteva u kojima je SIRT6 uključen, fitokemikalije imaju potencijal preokrenuti otpornost na apoptozu kod stanica raka debelog crijeva. Stoga bi istraživanja usmjerena na razjašnjavanje funkcije SIRT6 u kombinaciji s drugim signalnim molekulama mogla otvoriti put inovativnim terapijskim strategijama koje optimiziraju apoptotske odgovore i povećavaju ukupnu učinkovitost liječenja raka debelog crijeva [84].

1.2.4. Utjecaj fitokemikalija na modulaciju autofagije (mitofagije) u raku debelog crijeva

Održavanje homeostaze proteina te integriteta i funkcije organela ključno je za staničnu homeostazu i održivost stanica. Autofagija je glavni mehanizam koji posreduje u dostavi različitih staničnih tereta do lizosoma radi razgradnje i recikliranja. Autofagija je stanični katabolički proces koji razgrađuje nefunkcionalne organele i nepravilno presavijene proteine, igrajući dvostruku ulogu u karcinogenezi, djelujući kao supresor tumora ili promotor, ovisno o kontekstu. U ranim fazama karcinogeneze, autofagija uklanja oštećene organele i održava staničnu homeostazu, što je ključno za sprječavanje genomske nestabilnosti. Nasuprot tome, u razvijenim tumorima autofagija može omogućiti preživljavanje tumorskih stanica pod metaboličkim stresom i podržati agresivne fenotipove osiguravanjem nutrijenata i energije razgradnjom staničnih komponenti [85]. Općenito, učinci autofagije ovise o stadiju tumora, specifičnim onkogenim mutacijama i staničnom kontekstu.

Ovaj složen regulatorni mehanizam pod utjecajem je različitih staničnih signalnih puteva koje fitokemikalije mogu modulirati. Na primjer, aktivacija PI3K/Akt/mTOR puta značajno je izmijenjena djelovanjem fitokemikalija, što potiče autofagiju u stanicama raka debelog crijeva, čime se otkrivaju potencijalne terapijske strategije [76,85,86].

Fitokemikalije, zahvaljujući svojim raznolikim bioaktivnim spojevima, imaju značajan utjecaj na regulaciju autofagije. Primjerice, fitokemikalija kurkumin modulira autofagiju u raku debelog crijeva kroz ključne signalne puteve poput PI3K/Akt/mTOR i MAPK [86]. Kurkumin inhibira mTORC1, koji inače potiskuje autofagiju, čime se aktivira produkcija autofagosoma i promiče autofagija. Također, djeluje kao MEK inhibitor, što sinergijski pojačava autofagiju i apoptozu u KRAS-mutiranim stanicama raka debelog crijeva u kombinaciji s regorafenibom [86]. Kombinacije kurkumina s drugim fitokemikalijama, poput resveratrola i krocina, dodatno reguliraju gene povezane s autofagijom (Akt1, JAK2, STAT3), čime se potvrđuje njegova uloga u inhibiciji PI3K/Akt puta i aktivaciji MAPK signalizacije [86].

Preživljavanje stanica raka značajno je određeno dinamikom mitohondrija, osobito procesom mitofagije, koji selektivno razgrađuje oštećene mitohondrije. Ovaj proces ključan je za održavanje stanične homeostaze jer disfunkcionalni mitohondriji mogu povećati oksidacijski stres i izazvati apoptozu. Kod raka debelog crijeva, mitofagija u suradnji s autofagijskim procesima ima važnu ulogu u prilagodbi stanica na stresne uvjete.

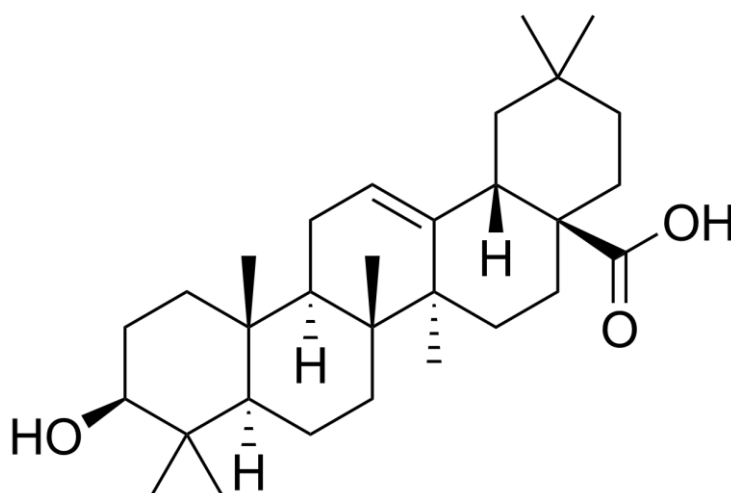
Mitohondriji, poznati kao "energetske centrale" zdravih stanica, proizvode manje energije u tumorskim stanicama zbog metaboličkog reprogramiranja, koje je rani znak karcinogeneze. PTEN-inducirana kinaza 1 (PINK1), ključni regulator mitofagije, odgovorna je za selektivnu eliminaciju oštećenih mitohondrija putem autofagije. Narušena mitofagija sve se više povezuje s razvojem bolesti, uključujući rak debelog crijeva [87,88].

Prekomjerna ekspresija PINK1 u tumorskim stanicama debelog crijeva povećava mitofagiju, smanjuje glikolizu i poboljšava mitohondrijsku respiraciju, djelomično putem aktivacije p53 signalnih puteva [87]. Nasuprot tome, gubitak PINK1 smanjuje apoptozu, povećava glikolizu i narušava mitohondrijsku funkciju. PINK1 se stoga pokazuje kao tumorski supresor, a njegova ekspresija u *in vivo* modelima povećava staničnu smrt putem apoptoze i smanjuje rast tumora [87].

Razumijevanje utjecaja fitokemikalija na autofagiju i mitofagiju moglo bi otvoriti nove terapijske mogućnosti za liječenje raka debelog crijeva. Kompleksni regulatorni mehanizmi koji uključuju interakcije fitokemikalija s autofagijskim sustavima ističu njihov potencijal u ciljanim terapijama protiv raka.

1.2.5. Oleanolična kiselina

Oleanolična kiselina (3 β -hidroksiolean-12-en-28-ojeva kiselina) jedan je od najčešćih pentacikličkih triterpenoidnih spojeva kojeg pronalazimo u različitim biljnim izvorima. Najvažniji izvori oleanolične kiseline u ljudskoj prehrani su masline (lat. *Olea europaea* L.), od kojih spoj dobiva svoje ime, i njihovi proizvodi, poput maslinovog ulja [89]. Triterpenoidni spojevi posjeduju velik farmakološki potencijal, a njihovi biosintetski putevi u biljkama su detaljno proučeni. U mnogim istraživanjima oleanolična kiselina je pokazala svoja kemopreventivna, hepatoprotektivna, tumorsupresivna, kontraceptivna, protuupalna, antioksidacijska, antimikrobna, antiparazitska, antivirusna i antineoplastična svojstva [89–93].



Slika 4. Kemijska struktura oleanolične kiseline

Zbog ograničene topljivosti u vodi i niske bioraspoloživosti nakon oralne primjene, razvoj oleanolične kiseline u farmakološkom smislu nailazi na prepreke, što otežava potpuno iskorištavanje njezinog terapijskog potencijala. Jedna od strategija za prevladavanje ovih izazova uključuje razvoj inovativnih farmaceutskih oblika oleanolične kiseline, poput nanočestica, liposoma, čvrstih disperzija i fosfolipidnih kompleksa, koji omogućuju poboljšanu otopljivost i apsorpciju [94,95].

Antitumorski utjecaj oleanolične kiseline ispitan je u mnogim *in vitro* i *in vivo* modelima raka uključujući rak jetre [96], dojke [97], pluća [98], prostate [99], gušterače [100], želudca [101], žučnog mjehura [102], hematoloških karcinoma kao što je leukemija [103] i rak debelog crijeva [104].

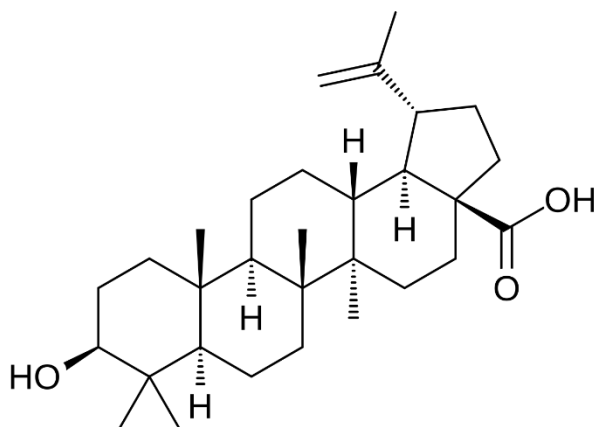
Utjecaj oleanolične kiseline istraživan je u različitim staničnim linijama raka debelog crijeva gdje su prikazani molekularni mehanizmi koji induciraju inhibiciju proliferacije stanica raka i

staničnu smrt. Changxiao Hu i suradnici istražili su mehanizam djelovanja oleanolične kiseline na stanice raka debelog crijeva HCT-116 i SW-480 gdje su uvrđili da oleanolična kiselina može učinkovito inhibirati proliferaciju i vijabilnost stanica raka debelog crijeva. Pokazali su da antitumorska aktivnost oleanolične kiseline je usko povezana s aktivacijom AMPK/mTOR signalnog puta uz indukciju autofagije i apoptoze [105]. U drugom istraživanju, Li Li i suradnici, pokazali su korištenjem modela mišijeg xenografta za rak debelog crijeva i stanične linije HT-29 da oleanolična kiselina značajno inhibira rast tumora u volumenu i težini te da izaziva indukciju apoptoze i inhibiciju proliferacije stanica uz smanjenje ekspresije ključnih proteina Bcl-2, Cyclin D1 i CKD4, dok je ekspresija Bax-a i p21 bila snažno povećana [106].

Buduća istraživanja trebala bi se fokusirati na dublje razjašnjenje molekularnih mehanizama djelovanja oleanolične kiseline, kao i na istraživanje njezine kombinacije s postojećim kemoterapijskim spojevima radi povećanja učinkovitosti. Dodatno razumijevanje njezinih interakcija unutar stanice i uloga u biologiji raka moglo bi unaprijediti nove terapijske strategije, osobito u liječenju raka debelog crijeva.

1.2.6. Betulinska kiselina

Betulinska kiselina (3 β -hidroksi-lupa-20(29)-enska-28-oinska kiselina) je pentaciklički triterpenoidni spoj koji se primarno izolira iz kore bijele breze. Betulinska kiselina i njezini derivati (sintetizirani modifikacijom na C-3, C-20 i C-28 položajima) posjeduju širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antitumorsko, protuupalno, anti-HIV, antimalarijsko, antibakterijsko i antioksidacijsko djelovanje [107–109].



Slika 5. Kemijska struktura betulinske kiseline

Brojna istraživanja pokazala su značajne antitumorske učinke betulinske kiseline kod melanoma [110], raka prostate [111], raka dojke [112], raka debelog crijeva [113] i raka pluća [114]. Antitumorska svojstva i citotoksičnost betulinske kiseline istraženi su u različitim ljudskim tumorskim staničnim linijama, primarnim tumorskim uzorcima te ksenografskim modelima na miševima. Ključna prednost betulinske kiseline i njezinih derivata je selektivna citotoksičnost prema tumorskim stanicama, uz znatno manju toksičnost za normalne stanice [115].

Prvotno je u eksperimentalnim studijama na životinjama utvrđeno da potpuno inhibira rast humanog melanoma bez štetnog djelovanja na normalne stanice. U posljednjim istraživanjima betulinska kiselina privlači posebnu pozornost zbog svoje jedinstvene aktivnosti – selektivne inhibicije rasta tumora i indukcije apoptoze stanica [115]. Pokazano je da inhibira fosforilaciju AKT-mTOR signalnog puta, ključnog regulatora autofagije, čime inducira smrt stanica raka debelog crijeva [113].

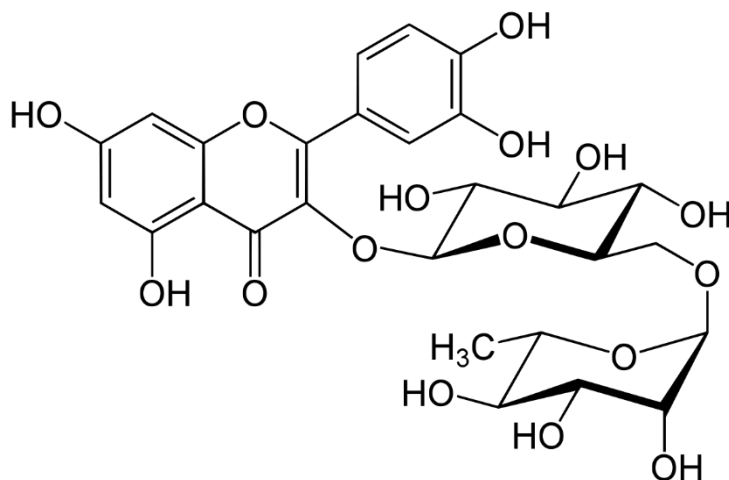
Trenutna istraživanja sugeriraju da betulinska kiselina ostvaruje svoj antikancerogeni učinak izravnim vezanjem ili interakcijom s ciljnim molekulama, poput kanabinoidnih receptora i GRP78 [112]. Mehanizam djelovanja betulinske kiseline u borbi protiv raka uključuje indukciju oksidacijskog stresa u mitohondrijima, regulaciju staničnog ciklusa te inhibiciju angiogeneze. Među glavnim ciljevima betulinske kiseline u tumorskim stanicama ističu se nuklearni faktor- κ B (NF- κ B), specifični transkripcijski proteini (Sp), vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) i obitelj ZBTB proteina [116,117]. Ovaj pregled usmjeren je na mehanizme djelovanja betulinske kiseline u liječenju malignih tumora putem različitih molekularnih ciljeva.

Betulinska kiselina nudi obećavajući potencijal za ciljanu terapiju raka debelog crijeva kroz kompleksnu modulaciju signalnih putova. Buduća istraživanja trebala bi se fokusirati na specifične molekularne interakcije između betulinske kiseline i ključnih signalnih mehanizama, uključujući obitelj proteina Bcl-2 i mitohondrijsku stabilnost. Translacijska istraživanja, u kombinaciji s detaljnim molekularnim studijama, bit će ključna za potpuno iskorištavanje terapijskog potencijala betulinske kiseline u liječenju raka debelog crijeva i drugih malignih bolesti.

1.2.7. Rutin

Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-rutinozid) je flavonoidni glikozid koji se istaknuo kao potencijalni kandidat u terapiji raka zahvaljujući svojoj sposobnosti modulacije različitih signalnih putova povezanih s rastom i progresijom tumora. Također poznat kao rutozid, vitamin

P, kvercetin-3-O-rutinozid i soforin. Njegovi prirodni izvori uključuju voće, ljekovito bilje i razne biljke [118].



Slika 6. Kemijska struktura rutina

Pokazano je da rutin djeluje protiv različitih vrsta raka putem više mehanizama, uključujući zaustavljanje staničnog ciklusa, inhibiciju upale, sprječavanje rasta malignih stanica, smanjenje oksidacijskog stresa, indukciju apoptoze i modulaciju angiogeneze, pri čemu svi ti učinci proizlaze iz regulacije staničnih signalnih putova. Nekoliko *in vitro* studija potvrdilo je značajan antikancerogeni potencijal rutina, pri čemu je pokazana inhibicija proliferacije različitih vrsta tumorskih stanica, uključujući rak dojke [119], jetre [120], gušterače [118], pluća [121], prostate [122], kože [123] i vrata maternice [124].

U istraživanju na stanicama raka grlića maternice pokazano je da rutin smanjuje ekspresiju Notch-1 i Hes-1 te inducira apoptozu modulacijom gena povezanih s apoptozom (Bax, Bcl2) i staničnim ciklusom (Cyclin D1 i CDK4), što u konačnici dovodi do zaustavljanja progresije staničnog ciklusa [124]. Zhao i sur. pokazali su u istraživanju na stanicama matičnih stanica parodontnog ligamenta (PDLSCs) da rutin potiče njihovu osteogenu diferencijaciju i proliferaciju. Učinak rutina na PDLSCs posredovan je PI3K/AKT/mTOR signalnim putem, pri čemu rutin aktivira ovaj signalni put putem GPR30 receptora [125].

Na temelju dosadašnjih istraživanja, rutin se ističe kao spoj s velikim terapijskim potencijalom u onkologiji zahvaljujući svojoj sposobnosti modulacije ključnih signalnih putova.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Fitokemikalije su prepoznate kao spojevi s velikim potencijalom u prevenciji i terapiji raka, uključujući rak debelog crijeva. Dosadašnja istraživanja ukazala su na njihovu sposobnost moduliranja ključnih bioloških procesa, poput oksidacijskog stresa, apoptoze i autofagije, no molekularni mehanizmi kojima ovi spojevi djeluju još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Daljnja istraživanja tih mehanizama moglo bi doprinijeti razvoju novih terapijskih pristupa i unaprijediti postojeće strategije liječenja. Prema tome, u ovom istraživanju predložena je sljedeća hipoteza i ciljevi:

Hipoteza:

Fitokemikalije, oleanolična kiselina, betulinska kiselina i rutin utječu na razvoj raka debelog crijeva putem modulacije signalnih putova unutar stanica, uključujući one povezane s oksidacijskim stresom, apoptozom te autofagijom i mitofagijom.

Cilj je istraživanja produbiti razumijevanje djelovanja odabranih fitokemikalija: oleanolične kiseline, betulinske kiseline i rutina, na molekularne mehanizme kancerogeneze raka debelog crijeva.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Odrediti utjecaj ispitivanih fitokemikalija na vijabilnost stanica raka debelog crijeva i sposobnost formiranja staničnih kolonija nakon tretmana,
2. Odrediti ulogu oksidacijskog stresa, apoptoze i autofagije/mitofagiju u mehanizmu citotoksičnosti odabranih fitokemikalija na stanice raka debelog crijeva,
3. Odrediti ulogu SIRT6 u aktivaciji FOXO3a nakon tretmana ispitivanim fitokemikalijama,
4. Predložiti molekularni mehanizam terapijskog djelovanja odabranih fitokemikalija u stanicama raka debelog crijeva,
5. Izazvati kemosenzitizaciju stanica raka debelog crijeva na 5-FU ispitivanim fitokemikalijama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanična kultura HCT116

In vitro istraživanje utjecaja i mehanizma djelovanja fitokemikalija oleanolične kiseline, betulinske kiseline i rutina na rak debelog crijeva provedeni su na staničnoj liniji humanog raka debelog crijeva HCT116 (ATCC[®] CCL-247[™], LGC Standards GmbH, Wesel, Njemačka). Stanice HCT116 izolirane su iz debelog crijeva odraslog muškarca s rakom debelog crijeva. Stanice su adhezivne s epitelnom morfologijom. Uzgajane su u McCoy's 5A mediju s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS) (Fetal Bovine Serum, Cat. No.: FBS-HI-11A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka), 2 mM L-glutamina (L-Glutamin, 200 mM, Cat. No.: GLN-B, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka), penicilina (10000 UI/mL) i streptomicina (10000 UI/mL) (Penicilin/Streptomycin (100x), Cat. No.: PS-B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) na 37°C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ u tikvicama za kulturu tkiva (TPP, Trasadingen, Švicarska).

Broj stanica određen je pomoću *Neubauerove* komore (BR718605-1E BRANDT[™] counting chamber BLAUBRAND[®] Neubauer pattern, without clips, double ruled) brojanjem stanica. Suspenzija stanica volumena 10 µL je stavljena pod pokrovnim stakalcem *Neubauerove* komore te su se stanice brojale pod invertnim mikroskopom (OCO-2 255 Halogen, KERN Optics, Njemačka). Broj stanica određen je prema formuli: broj stanica/mL = $N/4 = X * 10^4$ stanica/mL, pri čemu je N – broj stanica, 4 – broj polja u komorici (svako polje ima 16 kvadrata). Za podizanje stanica iz tikvica za kulturu stanica koristili smo postupak tripsinizacije (Trypsin-EDTA (0,05%) in DPBS, Cat. No.: TRY-1B, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka) ili postupak struganja stanica u svrhu prijenosa stanica u nove tikvice za uzgoj, smanjenja konfulencije ili zbog sakupljanja stanica za analize.

Broj nasađenih stanica u svim pokusima iznosio je 5×10^4 stanica/mL. Stanice su uzgajane do postizanja 80–90% konfluentnosti, nakon čega bi uslijedio tretman. Prije tretmana odabranim fitokemikalijama, oleanoličnom kiselinom, betulinskom kiselinom i rutinom kao i prije tretmana sa inhibitorima 3-MA, TAK-715 u odgovarajućim koncentracijama, stanice smo ispirali PBS-om (pH 7,4) tri puta.

Nakon inkubacije od 72 sata, medij je uklonjen, stanice su isprane tri puta sa PBS-om te se sa stanicama postupalo ovisno o analizi koja se provodila prema za to određenom protokolu, što je opisano u nastavku. Negativne kontrole (netretirane stanice) korištene su u svim pokusima. Svaki pokus ponovljen je tri puta u triplikatu.

3.2. Priprema oleanolične kiseline, betulinske kiseline i rutina za tretman HCT116 stanica

Oleanolična kiselina, betulinska kiselina i rutin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka), otopljeni su u DMSO uz dodatak Tween-80 (Art. No. 4859.1, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka), a zatim razrijeđeni u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika do određenih koncentracija potrebnih za provođenje tretmana (eksperimentalne koncentracije). Konačna koncentracija DMSO u mediju nije bila veća od 0,005%, a koncentracija Tween-80 nije bila veća od 0,1%.

3.3. Priprema 3-MA za tretman HCT116 stanica

3-Metiladenin (3-MA) (Selleckchem, Houston, Teksas, SAD) inhibitor je PI3K. 3-MA je široko korišten inhibitor autofagije putem svojeg inhibicijskog učinka na klasu III PI3K. Za tretman HCT116 stanica otopljen je u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika do koncentracije otopine 5 mM.

3.4. Priprema p-38 inhibitora (TAK-715) za tretman HCT116 stanica

Inhibitor p-38, TAK-715 (Selleckchem, Houston, Teksas, SAD) otopljen je u DMSO i razrijeđen u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika do koncentracije otopine 10 μ M kojom su tretirane stanice.

3.5. Priprema 5-fluorouracila (5-FU) za tretman HCT116 stanica

Antitumorski spoj 5-fluorauracil (5-FU) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) otopljen je u DMSO i razrijeđen u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika do koncentracije otopine 1 μ M i 5 μ M kojom su tretirane stanice.

3.6. Analiza vijabilnosti stanica

Za analizu vijabilnosti stanica koristio se test redukcije 2, 3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium5-karboksanilid unutarnje soli (XTT) (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, SAD) prema uputi proizvođača. Vijabilnost stanica predstavlja postotak (%) preživljavanja stanica nakon tretmana koji je određen u odnosu na kontrolnu skupinu čija je vijabilnost označena 100%. Određivanjem vrijednosti polovice maksimalne inhibicijske koncentracije (IC_{50}) istražili smo toksičnost spojeva korištenih u pokusima. Princip testa jest da nevijabilne stanice gube metaboličku sposobnost redukcije XTT-a putem enzima dehidrogenaza u visokointenzivnu formazan boju. Nakon 72-satnog tretmana spojevima u koncentracijama od 0,5 – 1000 μ M, kvantificirala se vijabilnost stanica mjerenjem apsorbancije

na 450 nm korištenjem čitača mikrotitarskih ploča (BioTek Elx808, Winooski, VT, USA). Svaki pokus proveden je tri puta u triplicatu.

3.7. Eksperimentalne skupine

Na temelju vrijednosti IC_{50} , testom stanične vijabilnosti, odabrale su se koncentracije fitokemikalija (oleanolična kiselina, betulinska kiselina i rutin) niže od vrijednosti IC_{50} . Testiranje je provedeno u sljedećim vremenskim intervalima: 24, 48 i 72 sata. Pritom je potvrđeno optimalno djelovanje fitokemikalija u nižim koncentracijama (ispod IC_{50}) pri vremenu od 72 sata. Prema dobivenim rezultatima testa stanične vijabilnosti i vrijednosti IC_{50} , fitokemikalije koje su odabrane za daljnje testiranje su oleanolična kiselina i betulinska kiselina. Prema tome skupine su podijeljene na: kontrolu (netretirane stanice), stanice tretirane fitokemikalijama (oleanolična kiselina, betulinska kiselina) u odabranim koncentracijama, stanice u kotretmanu fitokemikalija s odabranim inhibitorima, stanice tretirane 5-FU-om i stanice u kotretmanu fitokemikalija s 5-FU-om.

3.8. Eksperimentalne skupine u pokusima istraživanja učinka oleanolične kiseline

U pokusima istraživanja učinka oleanolične kiseline u *in vitro* eksperimentalnom modelu raka debelog crijeva, za fluorescencijske analize apoptoze i autofagije, imunofluorescencijske analize odabranih proteina te za analizu izražaja proteina Western blotom, HCT116 stanice podijeljene su na sljedeće skupine:

1. Kontrola – stanice tretirane u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika
2. OA 7,5 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 7,5 μ M
3. OA 10 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 10 μ M

Za određivanje stanične vijabilnosti kod istraživanja uloge inhibicije autofagije u mehanizmu djelovanja oleanolične kiseline u raku debelog crijeva, HCT116 stanice su podijeljene u sljedeće skupine:

1. Kontrola – stanice tretirane u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika
2. 3-MA – stanice tretirane s 3-MA u koncentraciji 5 mM
3. OA 7,5 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 7,5 μ M
4. OA 7,5 + 3-MA – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 7,5 μ M i 3-MA u koncentraciji 5 mM
5. OA 10 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 10 μ M

6. OA 10 + 3-MA – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 10 μ M i 3-MA u koncentraciji 5 mM

Za određivanje stanične vijabilnosti i analizu izražaja proteina Western blotom kod istraživanja uloge p-38 signalnog puta u mehanizmu djelovanja oleanolične kiseline u raku debelog crijeva, HCT116 stanice su podijeljene u sljedeće skupine:

1. Kontrola – stanice tretirane u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika
2. OA 10 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 10 μ M
3. Inh p-38 – stanice tretirane s TAK-715 u koncentraciji 10 μ M
4. OA 10 + inh p-38 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 10 μ M i TAK-715 u koncentraciji 10 μ M

Za određivanje stanične vijabilnosti kod istraživanja kemosenzitizacije stanica raka debelog crijeva HCT116 antitumorskim lijekom 5-FU, te istraživanje sinergističkog djelovanja oleanolične kiseline i 5-FU, stanice su podijeljene u sljedeće skupine:

1. Kontrola – stanice tretirane u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika
2. OA 10 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 10 μ M
3. 5-FU 1 – stanice tretirane s 5-FU u koncentraciji 1 μ M
4. 5-FU 5 – stanice tretirane s 5-FU u koncentraciji 5 μ M
5. OA 10 + 5-FU 1 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 10 μ M i s 5-FU u koncentraciji 1 μ M
6. OA 10 + 5-FU 5 – stanice tretirane oleanoličnom kiselinom u koncentraciji 10 μ M i s 5-FU u koncentraciji 5 μ M

3.9. Eksperimentalne skupine u pokusima istraživanja učinka betulinske kiseline

U pokusima istraživanja učinka betulinske kiseline u *in vitro* eksperimentalnom modelu raka debelog crijeva, za fluorescencijske analize apoptoze i autofagije, imunofluorescencijske analize odabranih proteina te za analizu izražaja proteina Western blotom, HCT116 stanice podijeljene su na sljedeće skupine:

1. Kontrola – stanice tretirane u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika
2. BA 0,5 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 0,5 μ M
3. BA 1 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 1 μ M
4. BA 2 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 2 μ M

Za određivanje stanične vijabilnosti kod istraživanja uloge inhibicije autofagije u mehanizmu djelovanja betulinske kiseline u raku debelog crijeva, HCT116 stanice su podijeljene u sljedeće skupine:

1. Kontrola – stanice tretirane u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika
2. 3-MA – stanice tretirane s 3-MA u koncentraciji 5 mM
3. BA 0,5 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 0,5 μ M
4. BA 0,5 + 3-MA – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 0,5 μ M i 3-MA u koncentraciji 5 mM
5. BA 1 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 1 μ M
6. BA 1 + 3-MA – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 1 μ M i 3-MA u koncentraciji 5 mM
7. BA 2 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 2 μ M
8. BA 2 + 3-MA – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 2 μ M i 3-MA u koncentraciji 5 mM

Za određivanje stanične vijabilnosti kod istraživanja kemosenzitizacije stanica raka debelog crijeva HCT116 antitumorskim lijekom 5-FU, te istraživanje sinergističkog djelovanja betulinske kiseline i 5-FU, stanice su podijeljene u sljedeće skupine:

1. Kontrola – stanice tretirane u McCoy's 5A mediju bez dodatka antibiotika
2. BA 2 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 2 μ M
3. 5-FU 1 – stanice tretirane s 5-FU u koncentraciji 1 μ M
4. 5-FU 5 – stanice tretirane s 5-FU u koncentraciji 5 μ M
5. BA 2 + 5-FU 1 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 2 μ M i s 5-FU u koncentraciji 1 μ M
6. BA 2 + 5-FU 5 – stanice tretirane betulinskom kiselinom u koncentraciji 2 μ M i s 5-FU u koncentraciji 5 μ M

3.10. Western blot analiza proteina

Za analizu izražaja ciljnih proteina, stanice su se homogenizirale u radioimunoprecipitacijskom puferu za liziranje (engl. *radioimmunoprecipitation assay*, RIPA) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) uz dodatak inhibitora fosfataza i proteaza. Koncentracija ukupnih proteina u svakom uzorku odredila se metodom bicinkoninične kiseline (BCA) (eng. *bicinchoninic acid*) mjerenjem apsorbancije na 490 nm prema standardu koristeći upute proizvođača (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), nakon

čega su se proteini u svim skupinama izjednačili po koncentraciji. Vrijednost apsorbancije izravno je proporcionalna koncentraciji ukupnih proteina u uzorku koja je izračunata korištenjem linearne jednadžbe kalibracijske krivulje albumin standarda (BSA).

Proteini su se razdvojili SDS-PAGE gel elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, a zatim prenijeli na polivinilidenfluoridnu (PVDF) membranu (Merck Millipore, Carrigtwohill, Ireland) polusuhim transferom (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) u trajanju od 45 minuta pri 17 V. Membrana je blokirana u 5%-tnom nemasnom mlijeku (Blotting-Grade Blocker, Cat. #170-6404, Bio-Rad Laboratories, Inc. Sad) otopljenom u tris otopini pufera (TBS, engl. *Tris buffered saline*) (pH 7,5) s dodatkom Tween 20 (0,05%) (Code No. 17-1316-01, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Švedska) (TBS-T) 1 sat na sobnoj temperaturi. Membrana se zatim inkubirala u primarnim protutijelima 2 sata na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4°C. Nakon inkubacije, membrana se ispirala u TBS-T-u tri puta u trajanju od 5 minuta, a potom je inkubirana sekundarnim protutijelima 1 sat na sobnoj temperaturi poslije čega membrana se opet ispirala TBS-T-om tri puta po 5 minuta. Završni korak je inkubacija reagensom za kemiluminiscencijsku detekciju (SignalFire Elite ECL Reagent, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), a potom skeniranje membrane (Allianze 4.0, Cambridge, UK). Kvantifikacija izražaja proteina izvršila se koristeći ImageJ (U.S. NIH, Bethesda, Maryland, USA), računalni program za obradu slika i fotografija. Zone su se normirale prema odgovarajućem kućepaziteljskom proteinu.

Za analizu izražaja ciljnih proteina koristila su se primarna protutijela na sljedeće proteine:

- Akt1/2/3, Protein kinaza B 1/2/3 (engl. *Akt1/2/3*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:2000)
- AMPK, AMP-aktivirana proteinska kinaza (engl. *AMP-activated protein kinase*) (Cell Signaling, Danvers, MA, SAD) (1:1000)
- Bax, Bcl-2-asocirani X protein (engl. *Bcl-2-associated X protein*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:1000)
- Bcl-2, B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:100)
- Beklin-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:500)
- BIM (H-5), Bcl-2 interakcijski medijator stanične smrti (engl. *Bcl-2 interacting mediator of cell death*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- β-aktin, Beta-aktin (engl. *β-actin*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:5000)
- ciklin D1 (engl. *Cyclin D1*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:1000)

- cijepana kaspaza-3 (engl. *Cleaved caspase-3*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:200)
- ERK1/2, Ekstracelularno signalom regulirana kinaza 1/2 (engl. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- FOXO3a, Forkhead okvirni protein O3a (engl. *Forkhead box O3a*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- GAPDH, Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (Proteintech, SAD) (1:200000)
- GPX-1 (C8C4), Glutation peroksidaza 1 (engl. *Glutathione peroxidase 1*) (Cell Signaling, Danvers, MA, SAD) (1:1000)
- HO-1, Heme oksigenaza 1 (engl. *Heme oxygenase 1*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:2000)
- JNK1/2, c-Jun N-terminalna kinaza 1/2 (engl. *c-Jun N-terminal kinase 1/2*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- LC3B-I/II, Laki lanac mikrotubulima pridruženih proteina 3B-I/II (engl. *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:500)
- mTOR, Mehanička meta rapamicina (engl. *Mechanistic target of rapamycin*) (Cell Signaling, Danvers, MA, SAD) (1:1000)
- NOXA, Protein induciran forbol-12-miristat-13-acetatom 1 (engl. *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:500)
- p38, Mitogenom aktivirana proteinska kinaza p38 (engl. *p38 mitogen-activated protein kinase*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- p62, P62/sequestosom-1 (engl. *p62/sequestosome-1*) (Cell Signaling, Danvers, MA, SAD) (1:1000)
- PARKIN, Produkt gena obiteljskog Parkinsonove bolesti (engl. *Familial Parkinson disease gene product*) (Cell Signaling, Danvers, MA, SAD) (1:1000)
- PARP, Poli (ADP-riboza) polimeraza (engl. *Poly (ADP-ribose) polymerase*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- p-Akt (Ser473), Fosforilirani Akt (Ser473) (engl. *Phosphorylated Akt (Ser473)*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:1000)
- p-AMPK, Fosforilirana AMP-aktivirana proteinska kinaza (engl. *Phosphorylated AMP-activated protein kinase*) (Cell Signaling, Danvers, MA, SAD) (1:1000)

- p-ERK1/2, Fosforilirani ERK1/2 (engl. *Phosphorylated ERK1/2*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:2000)
- p-FOXO3a (Ser294), Fosforilirani FOXO3a (Ser294) (engl. *Phosphorylated FOXO3a (Ser294)*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- p-JNK1/2, Fosforilirani JNK1/2 (engl. *Phosphorylated JNK1/2*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- p-mTOR, Fosforilirani mTOR (engl. *Phosphorylated mechanistic target of rapamycin*) (Cell Signaling, Danvers, MA, SAD) (1:1000)
- p-p38, Fosforilirani p38 (engl. *Phosphorylated p38*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:1000)
- p21, Ciklin-ovisni kinazni inhibitor p21 (engl. *Cyclin-dependent kinase inhibitor p21*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:1000)
- PINK1, PTEN-inducirana pretpostavljena kinaza 1 (engl. *PTEN induced putative kinase 1*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:500)
- SIRT6, Sirtuin 6 (engl. *Sirtuin 6*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:500)
- TOMM20, Translokaza vanjske mitohondrijske membrane 20 (engl. *Translocase of outer mitochondrial membrane 20*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:500)

Sekundarna protutijela koja su korištena su mišja (1:10000), kappa mišja (1:5000) i zečja (1:20000) (Abcam, Cambridge, UK).

3.11. Fluorescencijske metode

Kako bi se pokazala indukcija autofagije, provedena je fluorescencijska analiza za vizualizaciju kiselih vezikularnih organela u stanicama nakon bojanja akridin-oranžom (AO). U obojenim stanicama, citoplazma i jezgra fluorescirale su zeleno, dok su kisele autofagične vezikule fluorescirale narančasto do crveno. Apoptoza i nekroza inducirane tretmanom stanica analizirane su bojanjem akridin-oranžom i propidij jodidom (AO/PI). Kvantificirane su: a) žive stanice sa zeleno obojenom jezgrom i očuvanom strukturom, b) stanice u ranoj apoptozi sa svijetlozeleno obojenom jezgrom i kondenziranim kromatinom u jezgri, c) stanice u kasnoj apoptozi s narančasto obojenim područjima kondenziranog kromatina u jezgri i d) stanice u nekrozi s crveno obojenom netaknutom jezgrom. Na ploče s 24 jažice nasade su stanice u koncentraciji $1 \times 10^5/\text{mL}$ u potpunom mediju za uzgoj stanica bez dodatka antibiotika, pri čemu

su stanice uzgajane na staklenim pokrovnica. Kada je postignuta konfluencija od 80–90 %, medij je uklonjen i zamijenjen svježim potpunim medijem bez antibiotika, koji je sadržavao eksperimentalne koncentracije ispitivanih fitokemikalija. Kontrolna skupina uključivala je stanice tretirane samo medijem. Nakon 72 sata inkubacije, stanice su isprane PBS-om tri puta. Stakalca su zatim bojana AO bojom (1 µg/mL) tijekom 10 minuta, a potom ponovno isprana PBS-om tri puta. Za AO/PI bojanje, dodatno je korištena PI boja (0,6 µg/mL) zajedno s AO bojom. Nakon postupka bojenja, stanice su fiksirane hladnim metanolom i postavljene na predmetno stakalce.

Za analizu apoptoze stanica korištena je TUNEL analiza (engl. *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*) koristeći komercijalno dostupan kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Stanice su prethodno uzgojene na staklenim pokrovnica. Nakon tretmana, stanice su fiksirane u hladnom metanolu i blokirane otopinom vodikovog peroksida u metanolu. Potom su stanice inkubirane s TUNEL reakcijskom smjesom i obojane fluorescencijskom bojom DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) za vizualizaciju staničnih jezgara (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Nakon bojenja, stanice su uklopljene pomoću Mowiol-488 medija (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Ovom metodom stanice u apoptozi fluoresciraju zeleno jer TUNEL reakcijska smjesa sadrži fluorescentno obilježene deoksiuridin trifosfatne (dUTP) nukleotide, koji se vežu na 3' krajeve fragmentirane DNK – obilježje karakteristično za apoptotske stanice.

Analiza i snimanje obojenih stanica provedeni su koristeći fluorescentni mikroskop Olympus BX51, opremljen kamerom Olympus DP70, dok je za analizu korišten računalni program Olympus cellSens Standard.

3.12. Imunofluorescencijske metode

Za određivanje ekspresije i lokalizacije unutarstaničnih proteina u stanicama, provedena je imunofluorescencijska analiza. Stanice raka debelog crijeva bile su nasadene na stakalca, tretirane ispitivanim spojevima te fiksirane u ledenom metanolu. Nakon fiksacije, stanice su blokirane kako bi se spriječilo nespecifično vezivanje protutijela.

Stanice su zatim inkubirane s odabranim primarnim protutijelima u vlažnoj komori preko noći na +4 °C, a nakon toga s fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima. Za vizualizaciju staničnih jezgri stanice su obojane DAPI ili Hoechst bojom (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). Nakon bojanja, stanice su uklopljene u medij za očuvanje fluorescencije.

Korištena primarna protutijela su:

- ATG5, Autophagy related protein 5 (*engl. Autophagy-related protein 5*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:500)
- FOXO3A, Forkhead okvirni protein O3A (*engl. Forkhead box O3A*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:200)
- p-FOXO3A, Fosforilirani FOXO3A (*engl. Phosphorylated Forkhead box O3A*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:200)
- LC3-I/II, Laki lanac mikrotubulima pridruženog proteina 3 (*engl. Microtubule-associated protein light chain 3*) (Abcam, Cambridge, UK) (1:200)
- TOMM20, Translokaza vanjske mitohondrijske membrane 20 (*engl. Translocase of outer mitochondrial membrane 20*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) (1:600)
- Sekundarna protutijela koja su korištena su mišja (1:500), kappa mišija (1:250) i zečja (1:500) (Abcam, Cambridge, UK).

Fotografiranje obojenih stanica provedeno je fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51, opremljenim kamerom Olympus DP70, dok je analiza izvršena korištenjem računalnog programa Olympus cellSens Standard.

3.13. Statistička obrada podataka

Kvalitativni podaci obrađeni su i kvantificirani pomoću računalnog programa ImageJ 1.8.0 (Bethesda, Maryland, SAD), dok je analiza provedena koristeći računalni softver StatSoft STATISTICA verzije 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Kvantitativni podaci testirani su na normalnost distribucije primjenom Kolmogorov-Smirnovljeva testa te su prikazani koristeći deskriptivne statističke metode, uključujući aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju za podatke s normalnom distribucijom.

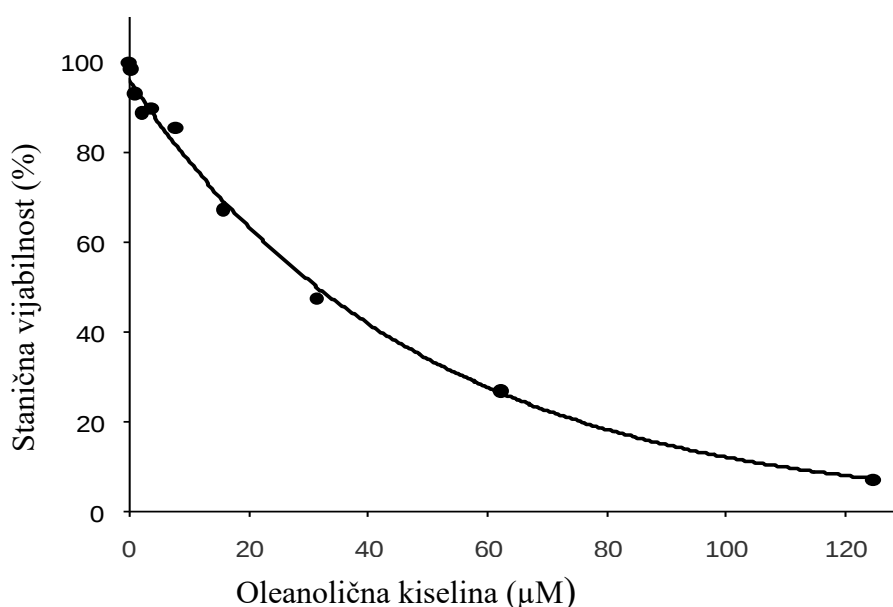
Za utvrđivanje statistički značajnih razlika među više nezavisnih skupina korišten je parametrijski test, odnosno jednosmjerna analiza varijance (ANOVA). U slučajevima kada je nul-hipoteza odbačena, dodatna analiza provedena je pomoću Tukey post-hoc testa kako bi se identificirale skupine među kojima postoje značajne razlike. Vrijednosti $P < 0,05$ smatrane su statistički značajnima.

4. REZULTATI

4.1. Utjecaj oleanolične kiseline na stanice raka debelog crijeva HCT116

4.1.1. Tretman oleanoličnom kiselinom smanjuje vijabilnost HCT116 stanica

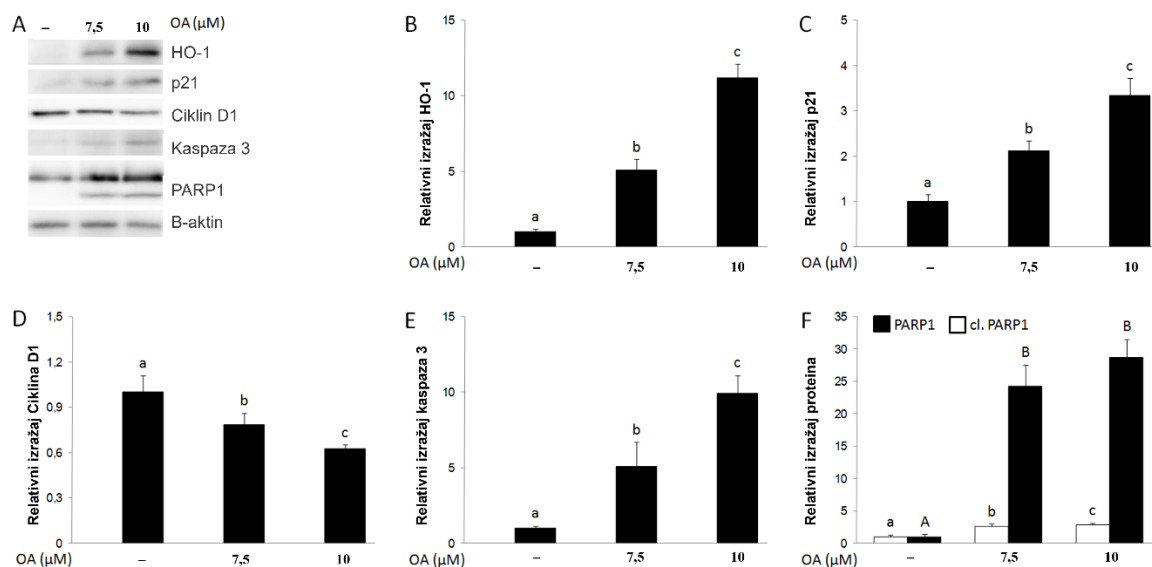
Kako bismo proučili utjecaj na metaboličku aktivnost stanica tretmanom, mjerili smo učinak oleanolične kiseline na vijabilnost HCT116 stanica pomoću XTT testa nakon 72 sata izlaganja. OK-a je značajno smanjila vijabilnost stanica ovisno o dozi, s IC_{50} vrijednošću od 29,3 μM (Slika 7). Koncentracije od 7,5 i 10 μM odabrane su za daljnje eksperimente temeljem preliminarnih podataka koji su pokazali da te koncentracije pružaju jasan biološki odgovor bez prekomjerne toksičnosti.



Slika 7. Učinak oleanolične kiseline na vijabilnost HCT116 stanica u ovisnosti o dozi nakon 72 sata. Za XTT test vijabilnosti, stanice su uzgajane u mediju s 10% FBS-om i tretirane oleanoličnom kiselinom tijekom 72 sata. Postotak citotoksičnosti izračunat je u usporedbi s netretiranim stanicama, koje su uzete kao 100%. Pola maksimalne inhibicijske koncentracije (IC_{50}) određena je korištenjem nelinearne regresijske analize.

4.1.2. Oleanolična kiselina inducira oksidacijski stres u HCT116 stanicama

Povećanje ekspresije HO-1 može igrati ključnu ulogu u modulaciji staničnog oksidacijskog stresa, djelujući kao važan zaštitni mehanizam protiv oksidacijskih oštećenja. Rezultati Western blot analize jasno su pokazali da tretman s oleanoličnom kiselinom dovodi do značajnog povećanja ekspresije HO-1 u HCT116 stanicama (Slika 8). Ovo povećanje bilo je proporcionalno primijenjenim dozama oleanolične kiseline, što upućuje na učinak ovisan o povećanju doze tretmana.



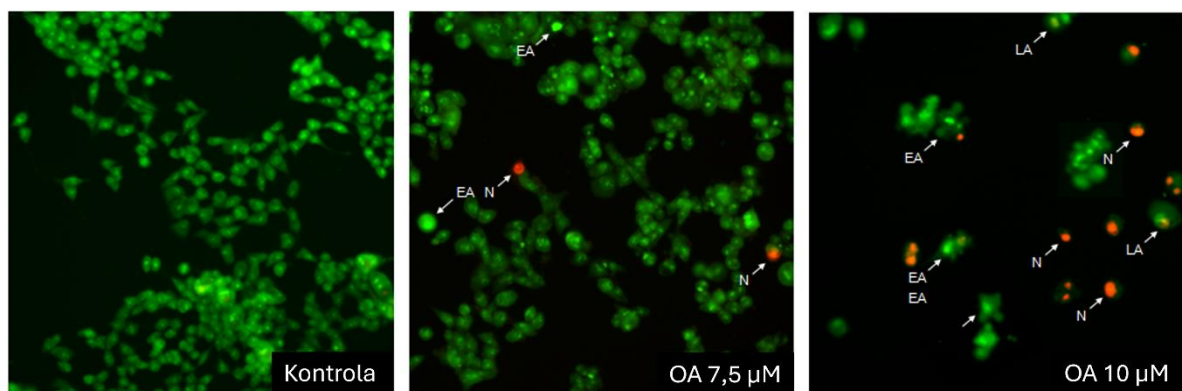
Slika 8. Ekspresija antioksidacijskih te pro- i anti-apoptotskih proteina u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana oleanoličnom kiselinom (OA). Reprezentativni imunoblotovi HO-1, p21, ciklina D1, cijepane kaspaze-3 i PARP1 (A). Tretman s OA rezultirao je povećanjem ekspresije HO-1 (B) i p21 (C) ovisno o dozi, kao i povećanim cijepanjem kaspaze-3 (E) i PARP1 (F), uz istodobno smanjenje ekspresije ciklina D1 (D). Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. Različita slova označavaju statističku razliku između skupina ($P < 0,05$).

4.1.3. Oleanolična kiselina inducira apoptozu u HCT116 stanicama

U cilju dubljeg razumijevanja mehanizama kroz koje oleanolična kiselina smanjuje vijabilnost stanica karcinoma HCT116, proveli smo detaljnu analizu ekspresije proteina koji reguliraju stanični ciklus i apoptozu korištenjem Western blot metode. Naši rezultati su pokazali značajno povećanje ekspresije p21 proteina (Slika 8C) nakon tretmana oleanoličnom kiselinom, što ukazuje na zaustavljanje staničnog ciklusa. Paralelno, zabilježili smo smanjenu ekspresiju ciklina D1 (Slika 8D), što dodatno podržava hipotezu o inhibiciji proliferacije stanica.

Daljnja analiza apoptoze otkrila je povećanje cijepanja kaspaze-3 (Slika 8E) i poli(ADP-riboza) polimeraze 1 (PARP1) (Slika 8F), ključnih markera apoptotskog procesa. Ovi podaci jasno impliciraju da oleanolična kiselina inducira apoptozu u HCT116 stanicama.

Potvrdu ovih rezultata dobili smo primjenom AO/PI (akridin orange/propidium iodid) bojenja, gdje smo opazili povećanje broja stanica u apoptotskoj i nekrotičnoj fazi u ovisnosti o dozi oleanolične kiseline (Slika 9). Ovi rezultati pružaju sveobuhvatne dokaze da oleanolična kiselina djeluje antitumorski putem indukcije apoptoze i zaustavljanja staničnog ciklusa.



Slika 9. Reprezentativne mikrofotografije s akridin narančastim/propidij jodidom za detekciju smrti HCT116 stanica nakon 72 sata tretmana oleanoličnom kiselinom (OA). Održivije stanice imaju zelenu jezgru s netaknutom strukturom, dok rane apoptotske stanice pokazuju svijetlozelenu jezgru i izbočine membrane (EA). Kasne apoptotske (LA) stanice imaju narančastu jezgru koja pokazuje kondenzaciju kromatina, dok nekrotične stanice (N) pokazuju narančastu jezgru s netaknutom strukturom. Tretman višim dozama oleanoličnom kiselinom rezultirao je povećanom pojavom apoptotskih i nekrotičnih stanica.

4.1.4. Oleanolična kiselina inducira autofagiju i mitofagiju u HCT116 stanicama

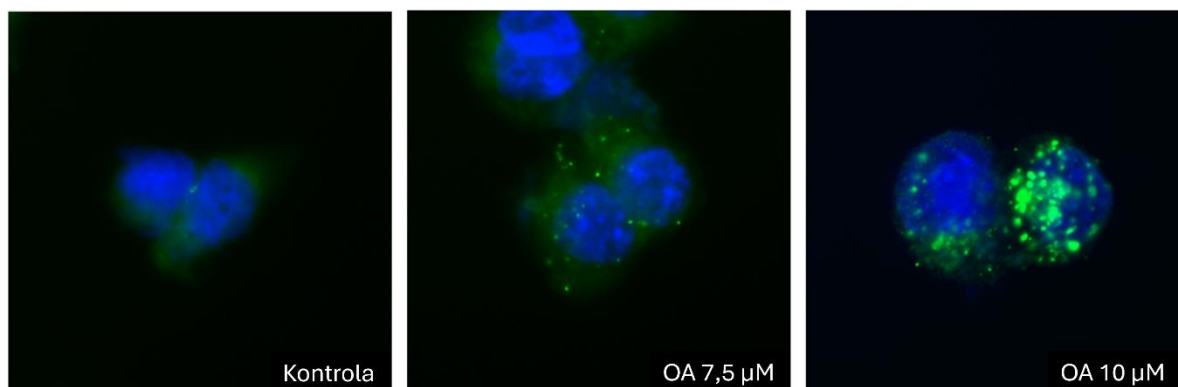
Detaljno smo istražili utjecaj OK na autofagiju i mitofagiju u HCT116 stanicama. Proveli smo niz eksperimenata kako bismo odredili promjene u ekspresiji ključnih molekula uključenih u ove procese. Western blot analizom potvrdili smo značajno, ovisno o povećanju doze, povećanje ekspresije proteina LC3B-I i LC3B-II, koji su važni za formiranje autofagosoma (Slika 12C). Ovi rezultati sugeriraju da oleanolična kiselina potiče autofagiju povećanjem pretvorbe LC3B proteina, što je ključni pokazatelj formiranja autofagosoma.

Imunofluorescentna analiza dodatno je potvrdila ove rezultate, prikazujući formiranje točkastih struktura LC3B–I/II i Atg5, što ukazuje na aktivaciju autofagijskog procesa (Slika 11). Povećana ekspresija Beclin-1, važnog regulatora autofagije, te smanjena ekspresija anti-apoptotskog proteina Bcl-2, dodatno potvrđuju da oleanolična kiselina inducira autofagiju u HCT116 stanicama povećavajući dozu tretmana (Slike 12D i 12E).

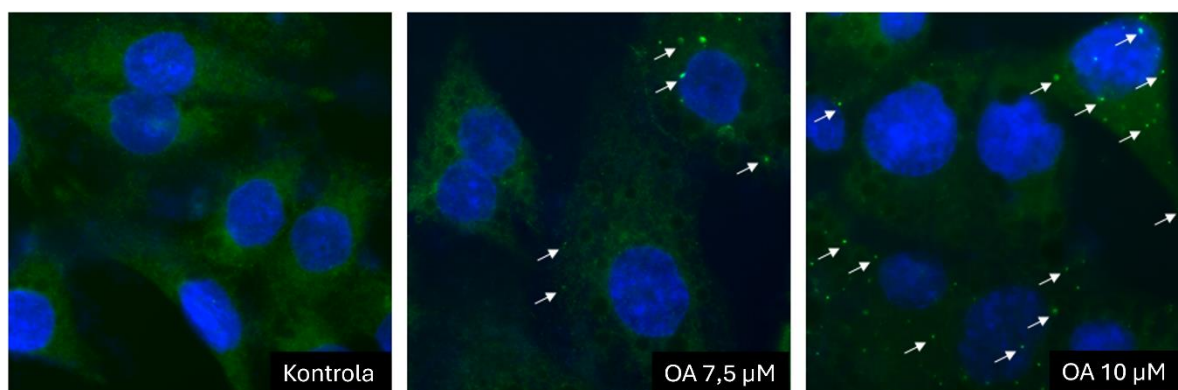
Osim toga, tretman oleanoličnom kiselinom rezultirao je povećanjem ekspresije p62 i PINK-1, dok je ekspresija Parkin i TOMM20 proteina bila smanjena, što ukazuje na indukciju mitofagije, posebne forme autofagije usmjerene na razgradnju oštećenih mitohondrija (Slike 12F-H). Kolokalizacija proteina TOMM20 i LC3B u HCT116 stanicama, prikazana imunofluorescentnom mikroskopijom, dodatno podržava ovu hipotezu (Slika 13).

Povećano formiranje kiselih autofagijskih vakuola nakon tretmana oleanoličnom kiselinom, dokazano akridin oranž bojenjem, potvrđuje aktivaciju autofagijskog procesa (Slika 14). Ovi

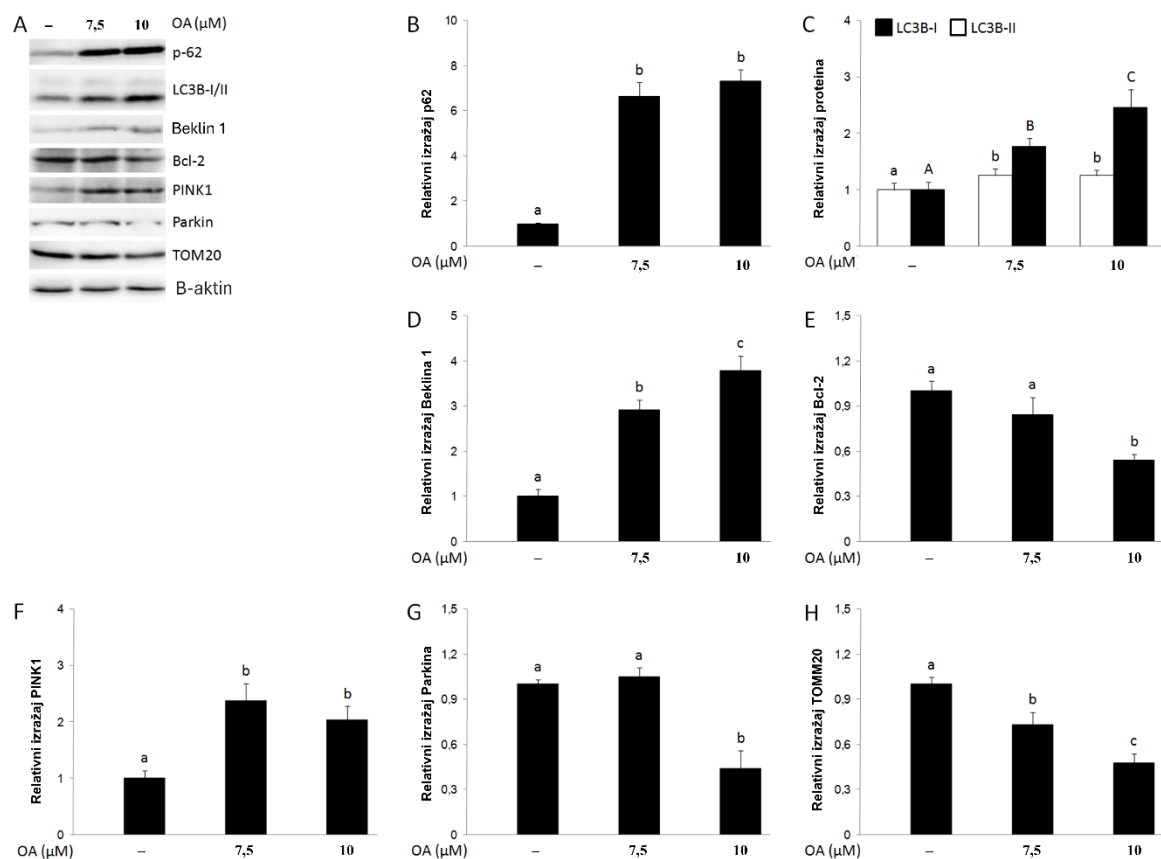
rezultati zajedno sugeriraju da oleanolična kiselina inducira autofagiju i mitofagiju potencijalno kao odgovor na oksidacijski stres ili oštećenje mitohondrija.



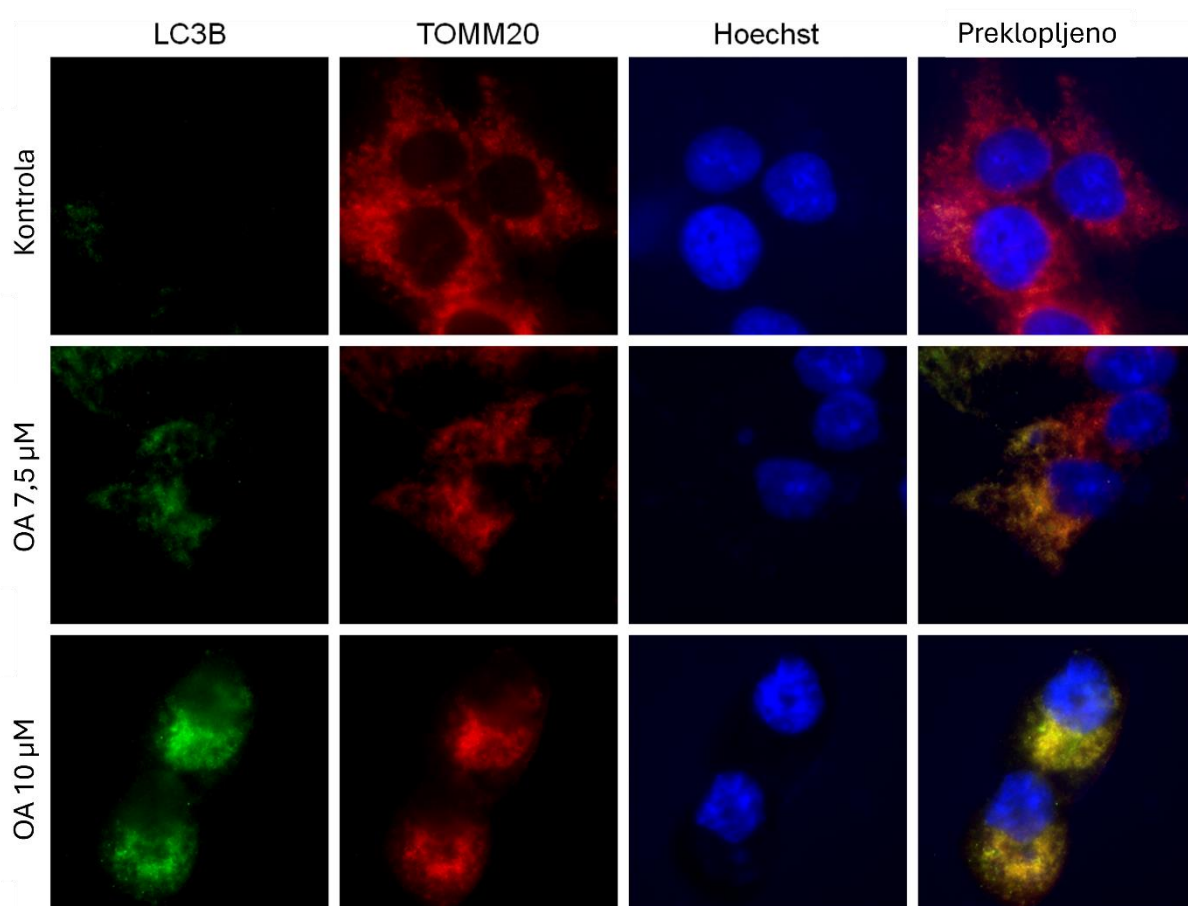
Slika 10. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije proteina LC3B, biljega uključenog u formiranje autofagosoma i autolizosoma. Protein LC3B detektiran je 72 sata nakon tretmana sa oleanoličnom kiselinom (OA) kao karakteristične fluorescentne točke (zeleno) u citoplazmi HCT116 stanicama.



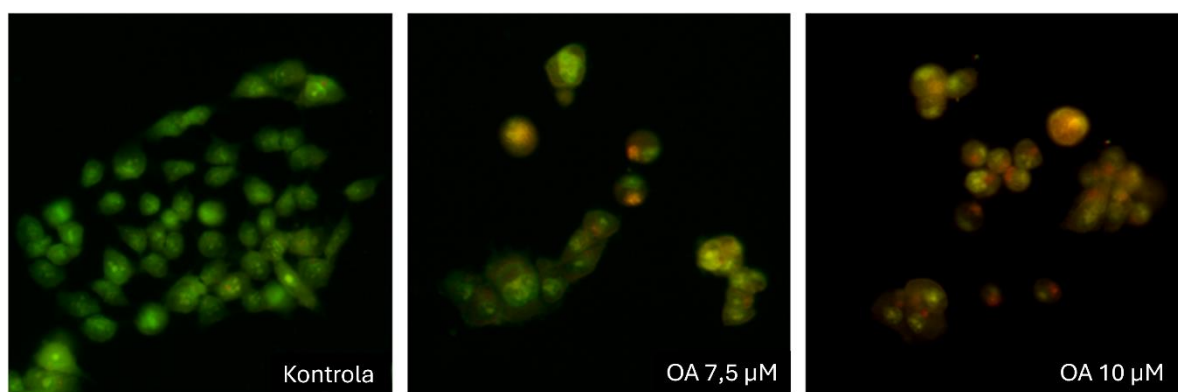
Slika 11. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije proteina ATG5, biljega uključenog u formiranje autofagosoma i autolizosoma. Protein ATG5 detektiran je 72 sata nakon tretmana sa oleanoličnom kiselinom (OA) kao karakteristične fluorescentne točke (zeleno) u citoplazmi HCT116 stanicama.



Slika 12. Ekspresija autofagičnih i mitofagičnih proteina u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana oleanoličnom kiselinom (OA). Reprezentativni imunoblotovi za ekspresiju LC3B, Beclin-1, Bcl2, p62, PINK1, Parkin i TOMM20 (A). Tretman s oleanoličnom kiselinom rezultirao je povećanjem ekspresije LC3B-I, a posebno LC3B-II (C) ovisno o dozi, kao i povećanjem ekspresije Beclin-1 (D), uz istodobno smanjenje ekspresije Bcl-2 (E). Ekspresija mitofagičnih proteina p62 (B) i PINK1 (F) bila je inducirana oleanoličnom kiselinom, dok su Parkin (G) i TOMM20 (H) bili smanjeni. Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. Različita slova označavaju statističku razliku između skupina ($P < 0,05$)



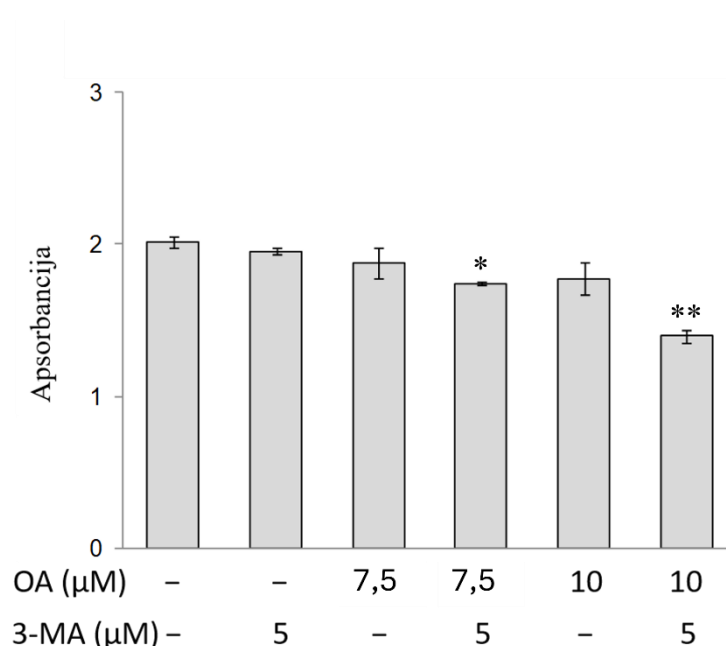
Slika 13. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije LC3B i TOMM20. Oba proteina su kolokalizirana u citoplazmi HCT116 stanica tretiranih oleanoličnom kiselinom (OA), ali ne i u kontrolnim stanicama, nakon 72 sata, što ukazuje na indukciju mitofagije.



Slika 14. Reprezentativne mikrofotografije akridin narančastog za detekciju autofagije u kontrolnim stanicama i stanicama tretiranim oleanoličnom kiselinom (OA) tijekom 72 sata. Citoplazma i jezgra obojenih stanica fluoresciraju svijetlozeleno, dok kisele autofagične vakuole fluoresciraju svijetlocrveno. Tretman višom dozom oleanolične kiseline rezultirao je povećanjem narančaste fluorescencije, što ukazuje na povećanje broja autofagičnih vakuola.

4.1.5. Inhibicija autofagije povećala je citotoksičnost oleanolične kiseline u HCT116 stanicama

U cilju razumijevanja uloge autofagije u citotoksičnom djelovanju oleanolične kiseline na HCT116 stanice, proveli smo eksperiment koristeći 3-metiladenin (3-MA), specifičan inhibitor autofagije. Rezultati prikazani na Slici 15 pokazuju učinak 3-MA na vijabilnost HCT116 stanica tretiranih oleanoličnom kiselinom. Inkubacija stanica s 3-MA značajno je smanjila vijabilnost HCT116 stanica koje su bile tretirane oleanoličnom kiselinom, što snažno sugerira da autofagija ima zaštitnu ulogu u tretmanu sa oleanoličnom kiselinom.



Slika 15. Učinak 3-metiladenina (3-MA) na održivost HCT116 stanica tretiranih oleanoličnom kiselinom (OA). Stanice su uzgajane u mediju s 10% FBS-om i tretirane oleanoličnom kiselinom tijekom 72 sata. Postotak citotoksičnosti izračunat je u usporedbi s netretiranim stanicama, koje su uzete kao 100%. Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, OA plus 3-MA u usporedbi s oleanoličnom kiselinom.

4.1.6. Učinak oleanolične kiseline na AMPK i PI3K/Akt signalne putove u HCT116 stanicama

Kako bismo detaljno istražili mehanizam putem kojeg oleanolična kiselina uzrokuje citotoksičnost u HCT116 stanicama, usmjerili smo se na analizu ključnih signalnih putova koji igraju važnu ulogu u karcinogenezi. Naši eksperimenti su se fokusirali na AMPK i PI3K/Akt signalne putove, koji su poznati po svojoj ulozi u regulaciji stanične energije, rasta i preživljavanja.

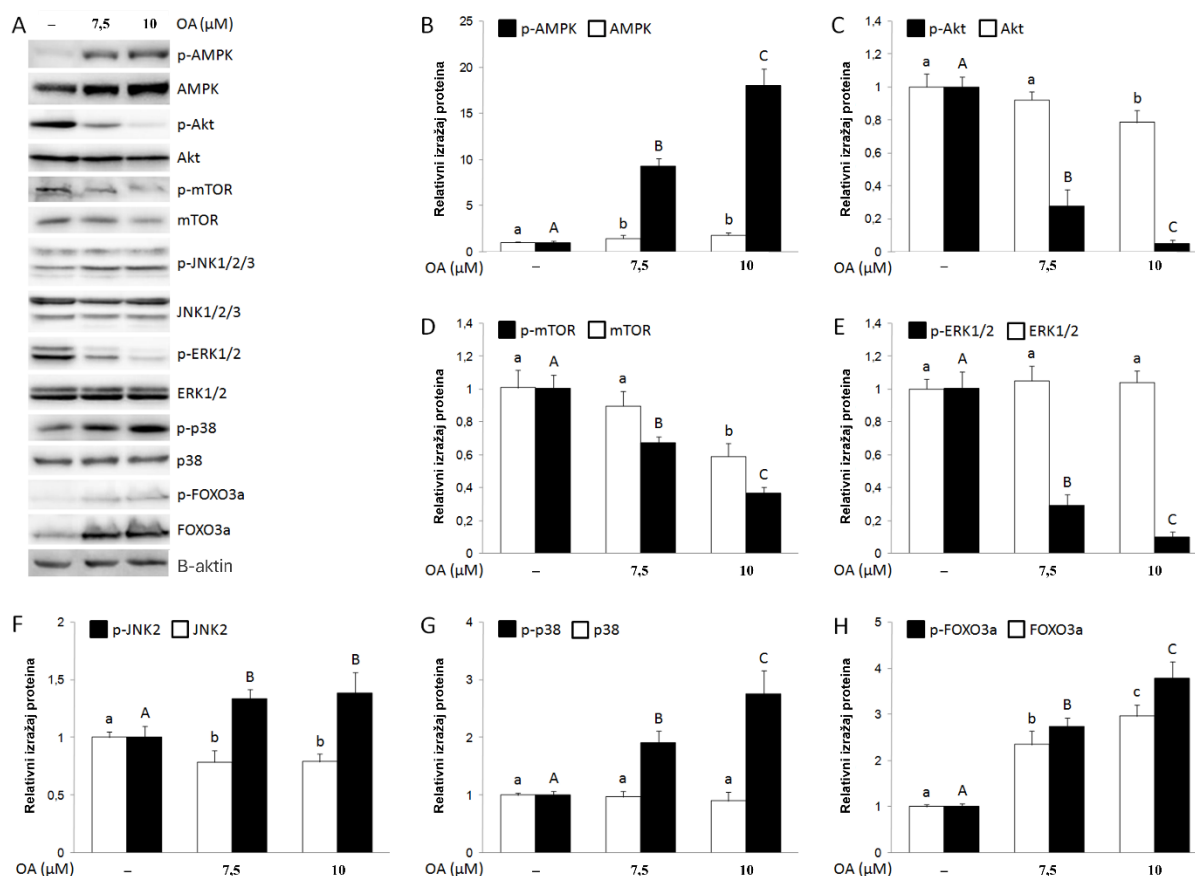
Rezultati Western blot analize, prikazani na Slici 16A, pokazali su da tretman oleanoličnom kiselinom dovodi indukcije fosforilacije AMPK, ovisno o dozi (Slika 16B), što sugerira aktivaciju ovog energetski osjetljivog signalnog puta. Uz aktivaciju AMPK, rezultati su pokazali značajno smanjenje ekspresije fosforiliranih oblika Akt (p-Akt) (Slika 16C) i mTOR (p-mTOR) (Slika 16D).

4.1.7. Učinak oleanolične kiseline na ekspresiju MAP kinaza u HCT116 stanicama

U cilju razjašnjavanja uloge MAPK signalnog puta u citotoksičnosti induciranoj oleanoličnom kiselinom u stanicama karcinoma debelog crijeva HCT116, proveli smo detaljnu analizu aktivacije ključnih MAPK proteina, uključujući ERK1/2, JNK1/2 i p38, korištenjem Western blot analize.

Naši rezultati pokazuju da tretman oleanoličnom kiselinom dovodi do značajnog, ovisno o dozi, smanjenja ekspresije fosforiliranih oblika ERK1/2 (p-ERK1/2) i JNK1/2 (p-JNK1/2). Smanjenje ekspresije p-ERK1/2 (Slika 16E) i p-JNK1/2 (Slika 16F) ukazuje na inhibiciju ovih signalnih puteva. ERK1/2 i JNK1/2 su ključni regulatori staničnog rasta, diferencijacije i preživljavanja, te njihova inhibicija može dovesti do smanjenja proliferacije stanica i indukcije apoptoze, što doprinosi citotoksičnosti oleanolične kiseline.

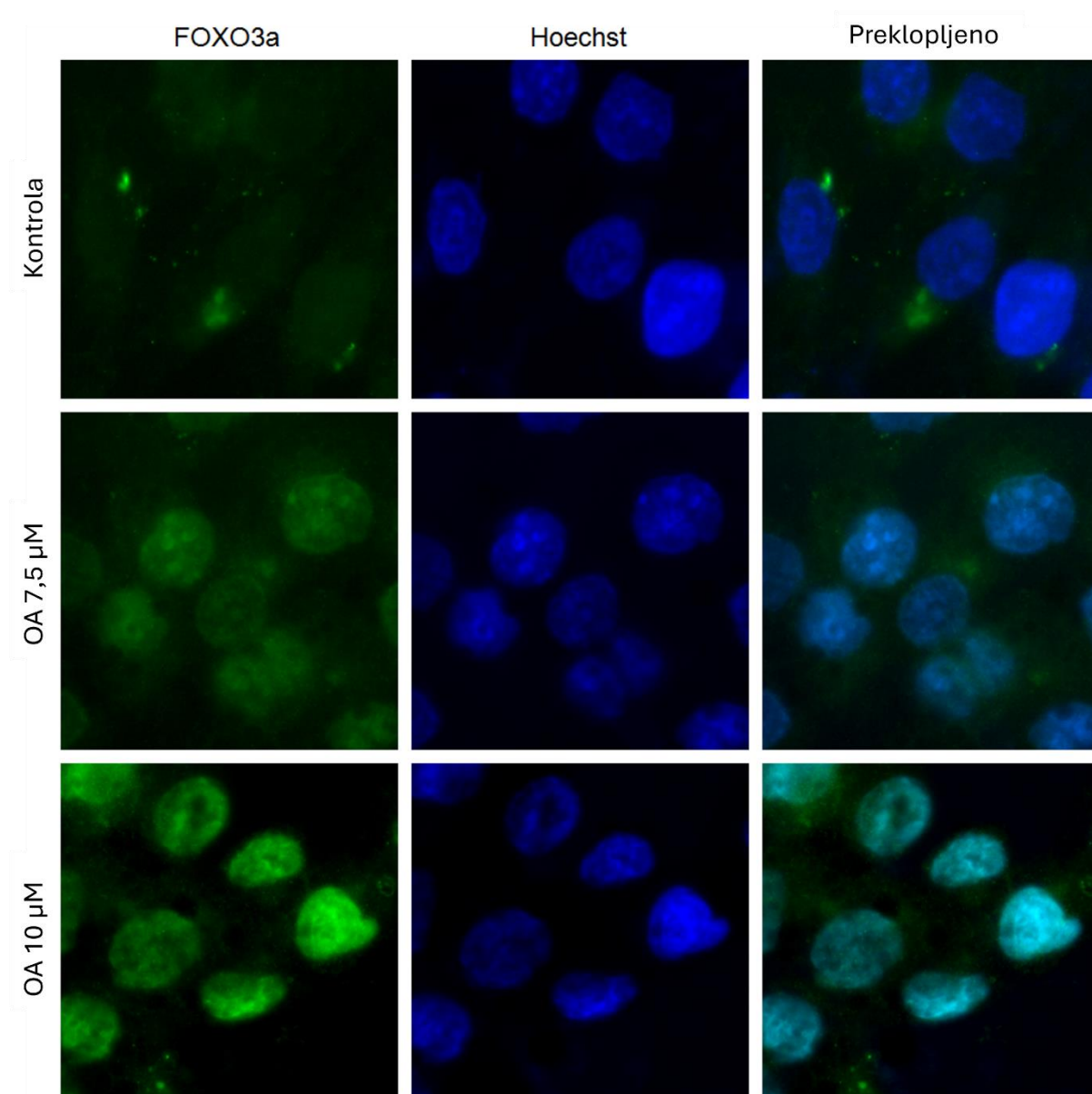
S druge strane, ekspresija fosforiliranog p38 (p-p38) bila je značajno povećana nakon tretmana oleanoličnom kiselinom, ovisno o dozi (Slika 16G). Aktivacija p38 MAPK puta poznata je po svojoj ulozi u odgovoru na stres i oštećenja stanica, te njegova povećana aktivnost može posredovati proapoptotski učinak oleanolične kiseline u HCT116 stanicama.



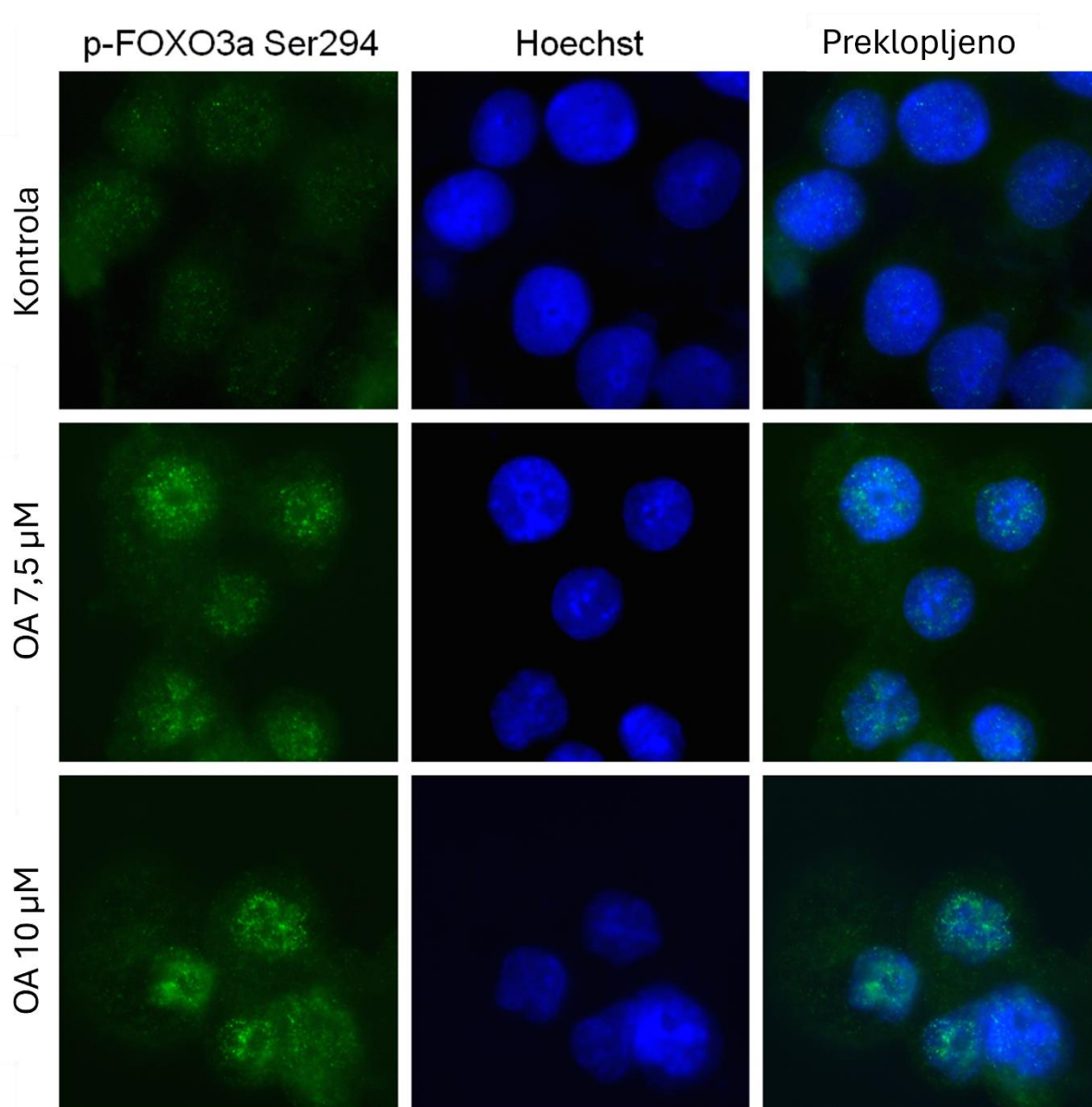
Slika 16. Ekspresija ključnih signalnih molekula u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana oleanoličnom kiselinom (OA). Reprezentativni imunoblotovi AMPK, PI3K/Akt, MAPK i FOXO3a puteva (A). Tretman s oleanoličnom kiselinom rezultirao je povećanjem fosforilacije AMPK-a (B) ovisno o dozi i smanjenjem fosforilacije Akt-a (C), mTOR-a (D) i ERK1/2 (E). Ekspresija fosfo-JNK1 (F), a osobito fosfo-p38 (G), povećana je nakon tretmana s oleanoličnom kiselinom. Primjena oleanolične kiseline rezultirala je povećanjem ekspresije FOXO3a i fosfo-FOXO3a (Ser294) (H). Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. Različita slova označavaju statističku razliku između skupina ($P < 0,05$).

4.1.8. Oleanolična kiselina povećava ekspresiju FOXO3a u HCT116 stanicama

Istražili smo učinak oleanolične kiseline na regulaciju gena povezanih s preživljavanjem i apoptozom. Proveli smo analizu ekspresije i lokalizacije proteina FOXO3a u HCT116 stanicama. Korištenjem Western blot analize, otkrili smo da tretman oleanoličnom kiselinom dovodi do povećanja ekspresije FOXO3a i njegovog fosforiliranog oblika, p-FOXO3a (Slika 16H). Potvrda ovih nalaza dobivena je imunofluorescentnom analizom, koja je pokazala da se FOXO3a i p-FOXO3a akumuliraju u staničnoj jezgri nakon tretmana oleanoličnom kiselinom (Slike 17 i 18). Akumulacija u jezgri sugerira da FOXO3a djeluje kao aktivni transkripcijski faktor, regulirajući ekspresiju svojih ciljanih gena koji su uključeni u staničnu smrt i preživljavanje.



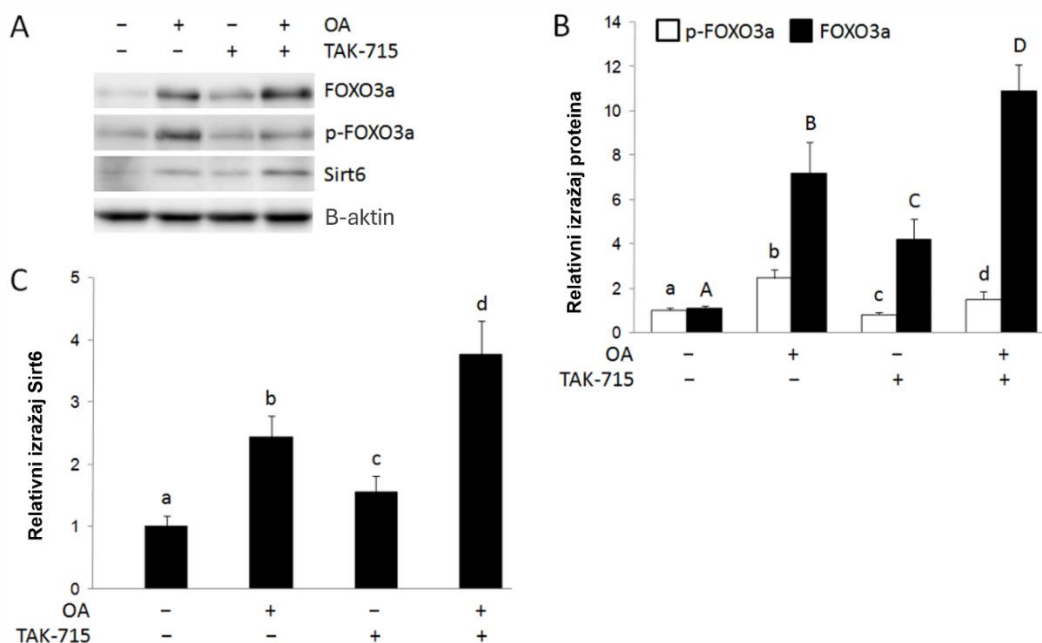
Slika 17. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije FOXO3a. Povećanje ekspresije FOXO3a ovisno o dozi otkriveno je u citoplazmi i jezgri HCT116 stanica tretiranih oleanoličnom kiselinom (OA) nakon 72 sata. Tretman s višom dozom oleanolične kiseline rezultirao je povećanom imunofluorescencijom FOXO3a u jezgri.



Slika 18. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije fosforiliranog FOXO3a. Znatno povećanje imunofluorescencije fosfo-FOXO3a otkriveno je u citoplazmi i jezgri HCT116 stanica tretiranih oleanoličnom kiselinom (OA) nakon 72 sata, u usporedbi s kontrolnim stanicama.

4.1.9. Inhibicija p-38 inducira ekspresiju FOXO3a i Sirt6

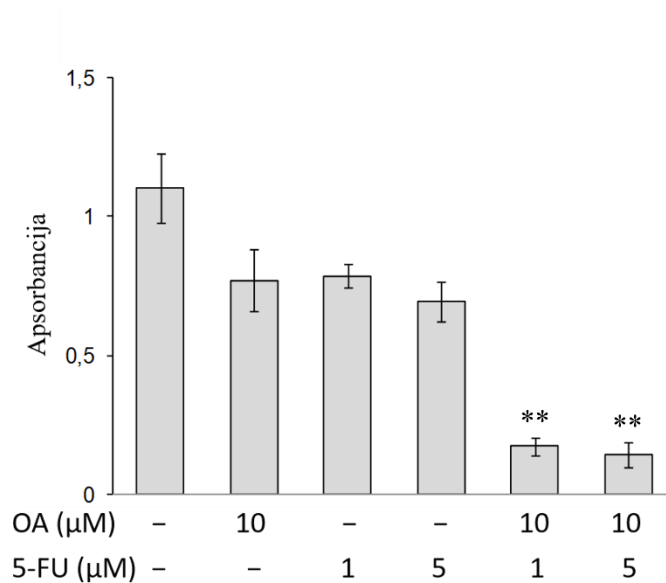
U cilju razumijevanja uloge p38 MAPK signalnog puta u citotoksičnosti induciranoj oleanoličnom kiselinom u HCT116 stanicama, proveli smo eksperiment koristeći TAK-715, specifičan inhibitor p38. Naša analiza fokusirala se na promjene u ekspresiji transkripcijskog faktora FOXO3a i deacetilaze Sirt6. Rezultati prikazani na Slici 19 pokazali su da tretman HCT116 stanica s TAK-715 dovodi do značajnog povećanja ekspresije FOXO3a i Sirt6.



Slika 19. Reprezentativni imunoblotovi ekspresije FOXO3a i Sirt6 (A). Tretman s TAK-715 značajno je povećao ekspresiju FOXO3a (B) i Sirt6 (C) u stanicama HCT116, dok je kotretman s oleanoličnom kiselinom (OA) dodatno povećao njihovu ekspresiju. Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. Različita slova označavaju statističku razliku između skupina ($P < 0,05$).

4.1.10. Kotretman oleanoličnom kiselinom i 5-FU smanjuje vijabilnost HCT116 stanica

U cilju istraživanja potencijalnih terapijskih strategija za poboljšanje učinkovitosti antikancerogenih tretmana, proučili smo kombinirani učinak oleanolične kiseline i 5-fluorouracila (5-FU) na vijabilnost HCT116 stanica, korištenjem XTT testa. Rezultati, prikazani na Slici 20, otkrivaju značajan sinergistički učinak ove kombinacije tretmana na smanjenje vijabilnosti stanica karcinoma debelog crijeva. Naši rezultati pokazali su da tretman oleanoličnom kiselinom kemosenzibilizira HCT116 stanice, čineći ih osjetljivijima na citotoksične učinke 5-FU-a.

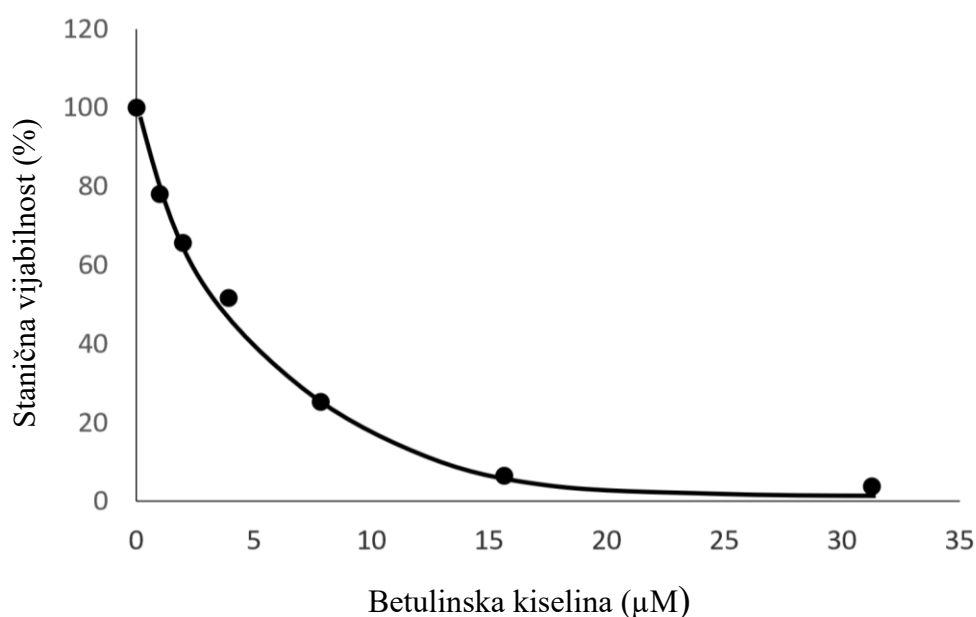


Slika 20. Učinak oleanolične kiseline (OA) na vijabilnost HCT116 stanica tretiranih 5-fluorouracilom (5-FU) i oleanoličnom kiselinom i 5-FU sinergistički su smanjili održivost stanica raka. Stanice su uzgajane u mediju s 10% FBS i tretirane oleanoličnom kiselinom tijekom 72 sata. Postotak citotoksičnosti izračunat je u usporedbi s netretiranim stanicama, koje su uzete kao 100%. Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. ** $P < 0,01$, OA plus 5-FU u usporedbi s 5-FU.

4.2. Utjecaj betulinske kiseline na stanice raka debelog crijeva HCT116

4.2.1. Tretman betulinskom kiselinom smanjuje vijabilnost HCT116 stanica

Kako bismo istražili utjecaj tretmana betulinskom kiselinom na metaboličku aktivnost stanica, proveli smo mjerenje vijabilnosti HCT116 stanica korištenjem XTT testa nakon 72 sata. Rezultati su pokazali da betulinska kiselina značajno smanjuje vijabilnost stanica na način ovisan o dozi, s IC_{50} vrijednošću od 4,26 μM (Slika 21). Za daljnje eksperimente odabrane su koncentracije od 0,5, 1 i 2 μM , temeljem preliminarnih podataka koji su pokazali da te koncentracije pružaju biološki učinak uz minimalnu toksičnost.

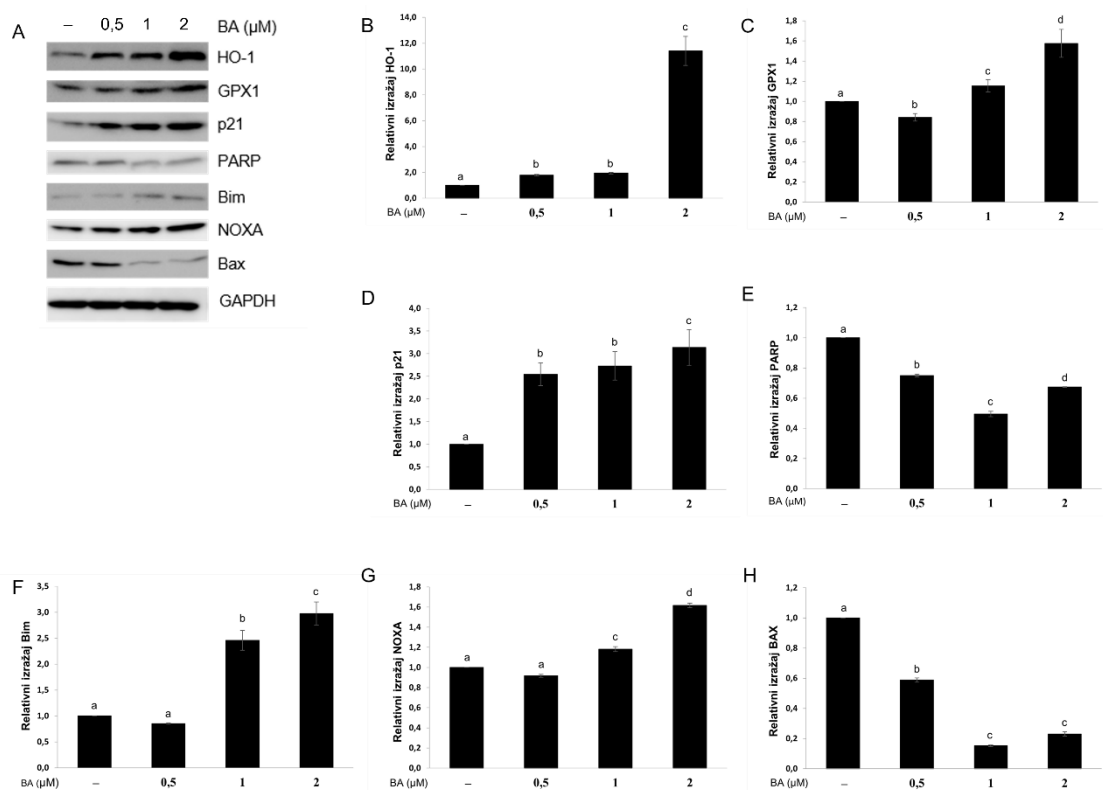


Slika 21. Učinak betulinske kiseline na vijabilnost HCT116 stanica u ovisnosti o dozi nakon 72 sata. Za XTT test vijabilnosti, stanice su uzgajane u mediju s 10% FBS-om i tretirane betulinskom kiselinom tijekom 72 sata. Postotak citotoksičnosti izračunat je u usporedbi s netretiranim stanicama, koje su uzete kao 100%. Pola maksimalne inhibicijske koncentracije (IC_{50}) određena je korištenjem nelinearne regresijske analize.

4.2.2. Betulinska kiselina inducira oksidacijski stres u HCT116 stanicama

Analiza provedena Western blot metodom potvrdila je da tretman betulinskom kiselinom značajno povećava ekspresiju proteina HO-1 i GPX1 u HCT116 stanicama (Slika 22B i 22C). Ovo povećanje bilo je izravno proporcionalno primijenjenim dozama betulinske kiseline,

naglašavajući učinak ovisan o dozi i potencijal betulinske kiseline u regulaciji stanične otpornosti na oksidacijski i stres.



Slika 22. Ekspresija antioksidativnih te pro- i anti-apoptotskih proteina u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana betulinskom kiselinom (BA). Reprezentativni imunoblotovi HO-1, GPX1, p21, PARP1, Bim, NOXA i Bax (A). Tretman s betulinskom kiselinom rezultirao je povećanjem ekspresije HO-1 (B), GPX1 (C), p21 (D), Bim (F) i NOXA (G) ovisno o dozi, uz istodobno smanjenje ekspresije Bax (H) i PARP1 (E). Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. Različita slova označavaju statističku razliku između skupina ($P < 0,05$).

Povećana ekspresija HO-1 može imati ključnu ulogu u regulaciji oksidacijskog stresa, djelujući kao važan obrambeni mehanizam stanica protiv oksidacijskih oštećenja. Rezultati su pokazali i porast razine proteina GPX1 nakon tretmana, što sugerira aktivaciju staničnog odgovora na oksidacijski stres izazvan tretmanom. GPX1 je esencijalan za neutralizaciju reaktivnih kisikovih spojeva i održavanje redoks ravnoteže unutar stanica.

4.2.3. Tretman betulinskom kiselinom ne potiče apoptozu u HCT116 stanicama

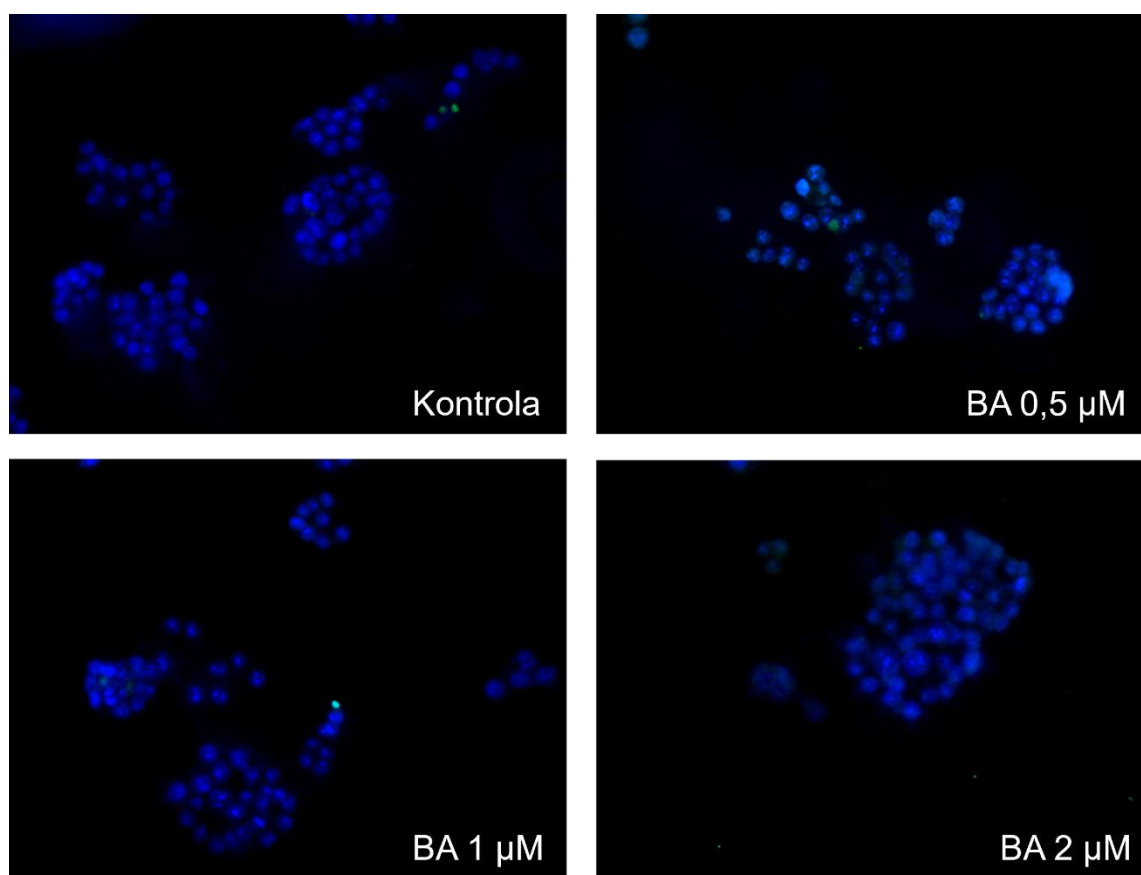
Rezultati istraživanja utjecaja betulinske kiseline na proces apoptoze u HCT116 stanicama pokazali su specifične promjene u ekspresiji ključnih proteina povezanih s ovom staničnom smrću, kao i odsutnost određenih događaja karakterističnih za apoptozu.

Analiza Western blot metodom otkrila je povećanu ekspresiju proapoptotičkih proteina Bim (Slika 22F) i Noxa ovisno o dozi (Slika 22G). Ovi rezultati sugeriraju da betulinska kiselina

može modulirati signalne puteve koji aktiviraju apoptozu, barem djelomično, putem ovih proteina. Nasuprot tome, ekspresija proteina Bax (Slika 22H), također poznatog po svojoj ulozi u apoptozi, pokazala je smanjenje ovisno o dozi. Što se tiče PARP proteina (Slika 22E), nije zabilježena promjena u njegovoj ekspresiji; ostao je u necijepanom obliku bez obzira na dozu tretmana. Ovaj rezultat ukazuje na odsutnost aktivacije kasnijih faza apoptoze koje bi uključivale cijepanje PARP-a, što se često koristi kao marker za ovu vrstu stanične smrti.

Dodatno, TUNEL analiza, koja je provedena kako bi se procijenio stupanj fragmentacije DNA kao ključni pokazatelj apoptoze, nije pokazala nikakve značajne promjene bez obzira na dozu betulinske kiseline (Slika 23). Ovaj rezultat potvrđuje da tretman nije uzrokovao povećanje apoptoze na razini DNA fragmentacije.

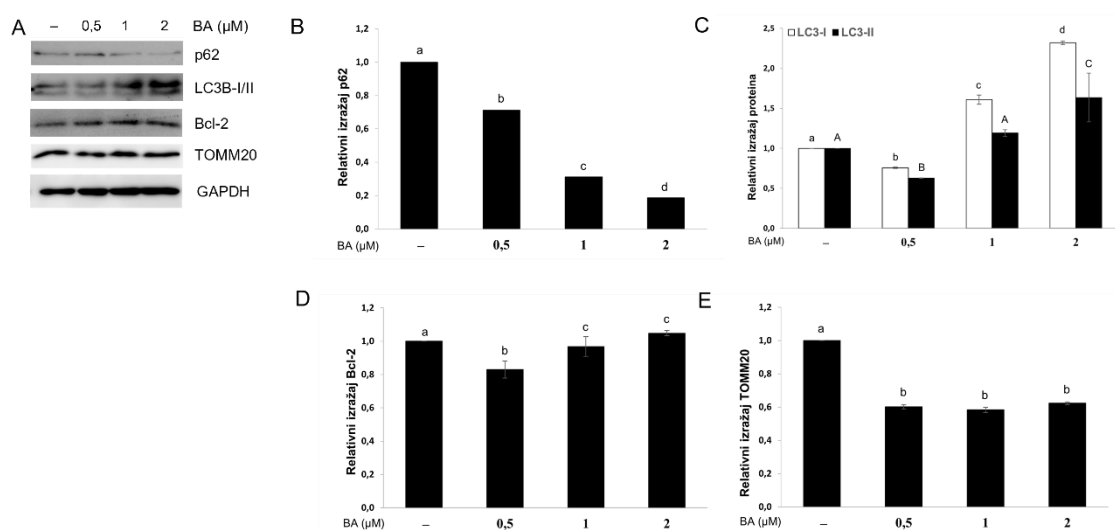
Sveukupno, rezultati upućuju na to da betulinska kiselina inducira određene promjene u ekspresiji proapoptotičkih proteina, no bez jasne aktivacije kasnijih faza apoptoze, kao što su cijepanje PARP-a ili DNA fragmentacija. Ovi podaci sugeriraju specifičan, ali ne potpuni proapoptotički učinak betulinske kiseline u ovom eksperimentalnom modelu.



Slika 23. Reprezentativne mikrofotografije za detekciju apoptotske stanične smrti pomoću imunofluorescentnog TUNEL testa. Terapija betulinskom kiselinom u dozama od 0,5 μ M, 1 μ M i 2 μ M nije rezultiralo povećanjem broja TUNEL-pozitivnih stanica ovisno o dozi, u usporedbi s kontrolom.

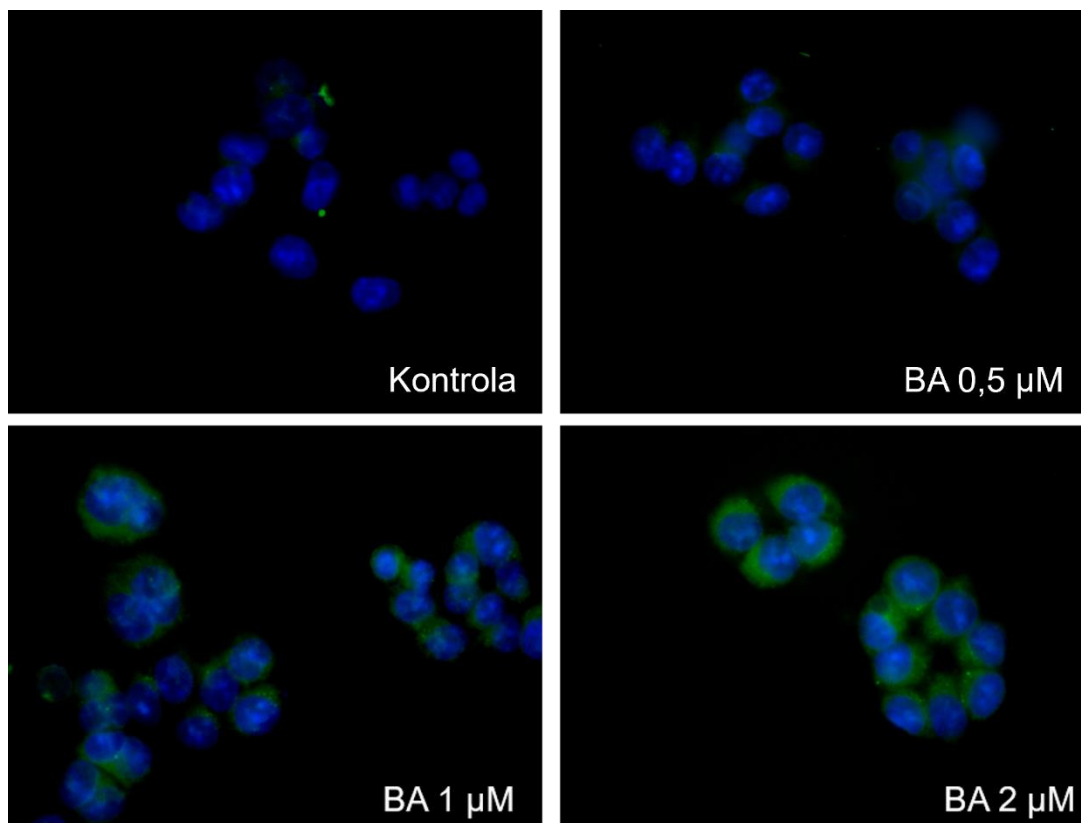
4.2.4. Betulinska kiselina inducira autofagiju u HCT116 stanicama

Rezultati istraživanja utjecaja betulinske kiseline na proces autofagije u HCT116 stanicama pokazali su značajne promjene u ekspresiji ključnih proteina te staničnim događajima povezanim s autofagijom. Analiza Western blot metodom otkrila je smanjenu ekspresiju proteina p62 (Slika 24B) u ovisnosti o dozi betulinske kiseline, što sugerira negativnu regulaciju ovog proteina u kontekstu autofagijskih procesa. Protein Bcl-2 (Slika 24D) pokazao je blagi porast ekspresije koji je bio proporcionalan povećanju doze, iako ta promjena nije bila statistički značajna. Nasuprot tome, protein TOMM20 (Slika 24E) nije pokazao promjene u ekspresiji ovisno o dozi tretmana, što ukazuje na stabilnost njegove ekspresije u uvjetima eksperimentalnog modela.



Slika 24. Ekspresija autofagičnih i mitofagičnih proteina u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana betulinskom kiselinom (BA). Reprezentativni imunoblotovi za ekspresiju p62, LC3B-I/II, Bcl2 i TOMM20 (A). Tretman s betulinskom kiselinom rezultirao je povećanjem ekspresije LC3B-I, a posebno LC3B-II (C) ovisno o dozi, kao i povećanjem ekspresije Bcl-2 (D). Ekspresija mitofagičnih proteina p62 (B) i TOMM20 (E) bila je smanjena. Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. Različita slova označavaju statističku razliku između skupina ($P < 0,05$)

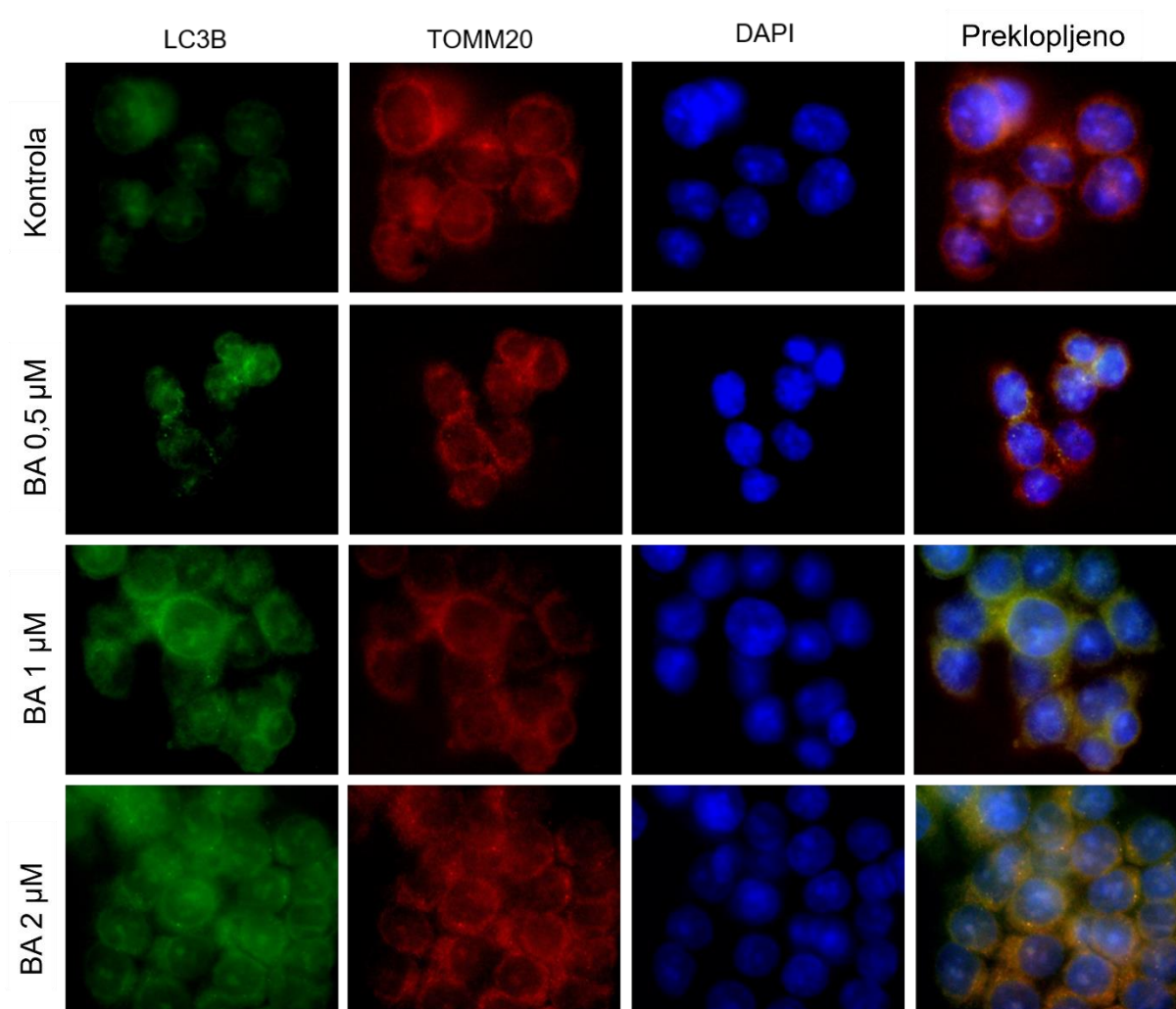
Ključni autofagijski biljeg, LC3B-I/II (Slika 24C), pokazao je značajan porast ekspresije u skladu s povećanjem doze betulinske kiseline. Ovaj nalaz ukazuje na indukciju autofagije, što se može povezati s funkcijom LC3 proteina u formiranju autofagosoma i regulaciji autofagijskog procesa.



Slika 25. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije proteina LC3B, biljega uključenog u formiranje autofagosoma i autolizosoma. Protein LC3B detektiran je 72 sata nakon tretmana sa betulinskom kiselinom (BA) kao karakteristična fluorescentna točka (zeleno) u citoplazmi HCT116 stanicama.

Rezultati prikazanih mikrofotografija ukazuju na indukciju autofagije u HCT116 stanicama nakon tretmana betulinskom kiselinom. Protein LC3B, poznat kao ključni biljeg autofagije, detektiran je 72 sata nakon tretmana kao karakteristične fluorescentne točke (zeleno) u citoplazmi tretiranih stanica, što sugerira aktivno formiranje autofagosoma i autolizosoma (Slika 25).

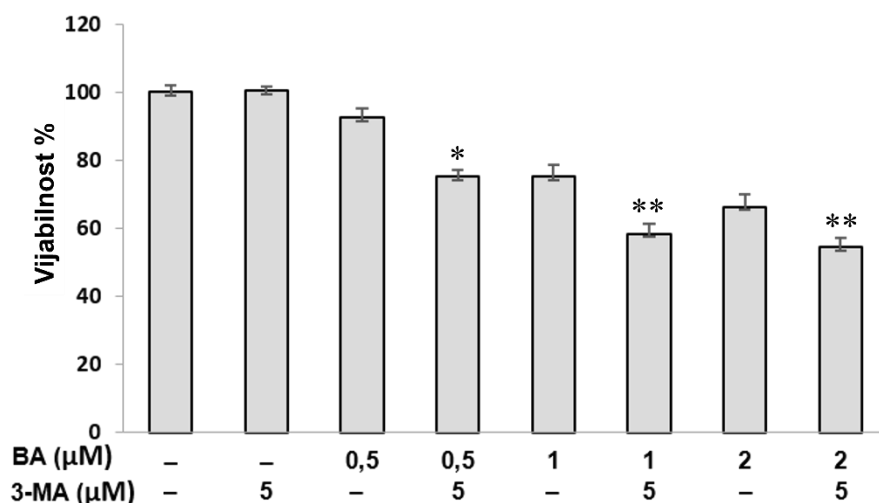
Mikrofotografije dodatno prikazuju kolokalizaciju proteina LC3B i TOMM20 (Slika 26) u citoplazmi tretiranih stanica, što ukazuje na njihovu prostornu povezanost u autofagijskom procesu. Međutim, budući da Western blot analiza nije pokazala promjene u ekspresiji TOMM20 proteina ovisno o dozi betulinske kiseline, zaključak se temelji prvenstveno na lokalizacijskim karakteristikama proteina LC3B i njegovoj ulozi u autofagiji.



Slika 26. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije LC3B i TOMM20. Oba proteina su kolokalizirana u citoplazmi HCT116 stanica tretiranih betulinskom kiselinom (BA), ali ne i u kontrolnim stanicama, nakon 72 sata.

4.2.5. Inhibicija autofagije povećala je citotoksičnost betulinske kiseline u HCT116 stanicama

Kako bismo bolje razumjeli ulogu autofagije u citotoksičnom djelovanju betulinske kiseline na HCT116 stanice, proveli smo eksperiment s 3-metiladeninom (3-MA), specifičnim inhibitorom autofagije. Rezultati prikazani na Slici 27 prikazuju učinak 3-MA na vijabilnost HCT116 stanica tretiranih betulinskom kiselinom. Primjena 3-MA dovela je do smanjenja vijabilnosti HCT116 stanica tretiranih betulinskom kiselinom, što upućuje na zaštitnu ulogu autofagije u odgovoru stanica na tretman.



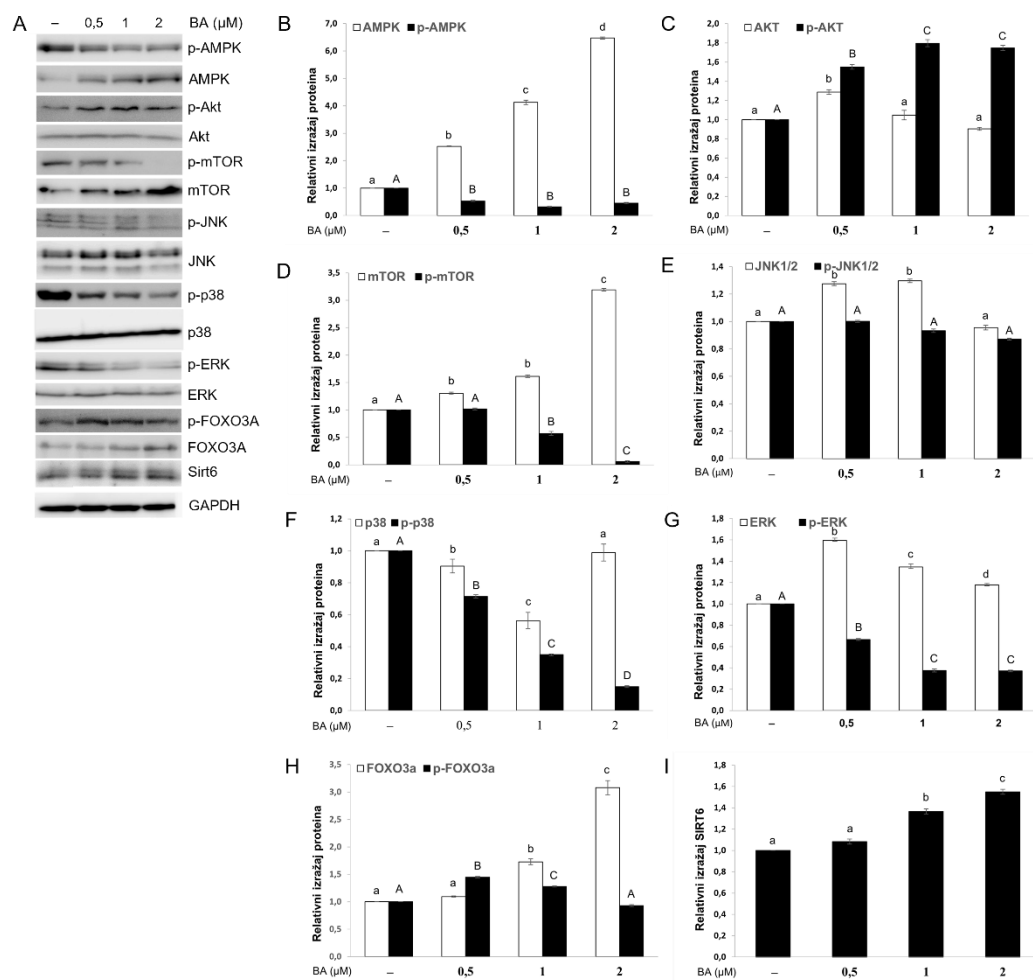
Slika 27. Učinak 3-metiladenina (3-MA) na održivost HCT116 stanica tretiranih betulinskom kiselinom (BA). Stanice su uzgajane u mediju s 10% FBS i tretirane betulinskom kiselinom tijekom 72 sata. Postotak citotoksičnosti izračunat je u usporedbi s netretiranim stanicama, koje su uzete kao 100%. Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, BA plus 3-MA u usporedbi s BA.

4.2.6. Utjecaj betulinske kiseline na signalne puteve AMPK, PI3K/Akt i MAPK u HCT116 stanicama

Rezultati analize utjecaja betulinske kiseline na signalne puteve AMPK, PI3K/Akt i MAPK u HCT116 stanicama ukazali su na specifične, ovisno o dozi, promjene u ekspresiji ključnih proteina uključenih u te signalne puteve.

Analiza Western blot metodom pokazala je da tretman BK-om izaziva povećanje ekspresije proteina AMPK (Slika 28B), p-AKT (Slika 28C) i mTOR (Slika 28D) ovisno o dozi. Ovi rezultati sugeriraju aktivaciju signalnih puteva povezanih s energetsom homeostazom (AMPK) i staničnom proliferacijom (PI3K/Akt-mTOR).

Nasuprot tome, smanjenje ekspresije proteina AKT (Slika 28C), p-mTOR (Slika 28D), JNK1/2 (Slika 28E), p-p38 (Slika 28F), ERK (Slika 28G) i p-ERK (Slika 28G) u ovisnosti o dozi tretmana ukazuje na supresiju određenih komponenti MAPK signalnog puta (JNK, p38, ERK), kao i regulaciju PI3K/Akt-mTOR signalizacije prema specifičnom modulatornom učinku betulinske kiseline. Ovi nalazi sugeriraju da betulinska kiselina modulira signalne puteve povezane s energetsom metabolizmom, proliferacijom i stresnim odgovorima u HCT116 stanicama, s potencijalno značajnim implikacijama za staničnu sudbinu, uključujući apoptozu i autofagiju.



Slika 28. Ekspresija ključnih signalnih molekula u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana betulinskom kiselinom (BA). Reprezentativni imunoblotovi AMPK, PI3K/Akt, mTOR, MAPK i FOXO3a puteva (A). Tretman s BK rezultirao je povećanjem fosforilacije AKT (C) ovisno o dozi i smanjenjem fosforilacije AMPK (B), mTOR-a (D), JNK1/2 (E), p38 (F) i ERK1/2 (G). Ekspresija SIRT6 (I) povećana je nakon tretmana s betulinskom kiselinom. Primjena betulinske kiseline rezultirala je povećanjem ekspresije FOXO3a i smanjenjem fosfo-FOXO3a (Ser294) (H). Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. Različita slova označavaju statističku razliku između skupina ($P < 0,05$).

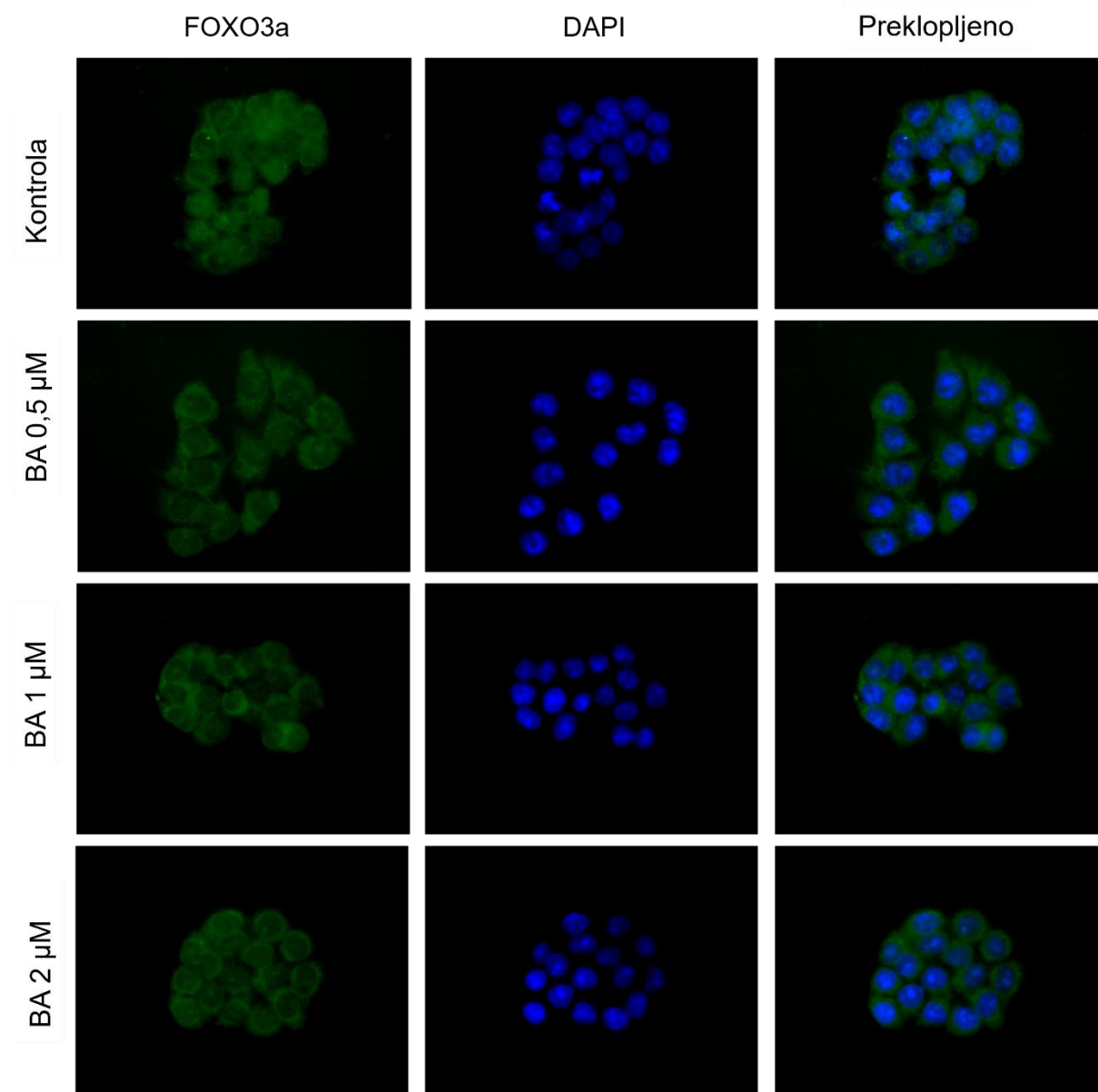
4.2.7. Betulinska kiselina povećava ekspresiju FOXO3a i SIRT6 u HCT116 stanicama

Rezultati analize učinka betulinske kiseline na ekspresiju proteina FOXO3a i SIRT6 u HCT116 stanicama ukazuju na značajne promjene koje se odnose na signalne puteve povezane s regulacijom staničnog preživljavanja, stresa i metaboličke ravnoteže.

Western blot analiza pokazala je povećanje ekspresije ukupnog FOXO3a (Slika 28H) ovisno o dozi, dok je fosforilirani oblik ovog proteina (p-FOXO3a) (Slika 28H) pokazao smanjenu ekspresiju proporcionalno s povećanjem doze betulinske kiseline. Ovi nalazi sugeriraju da betulinska kiselina može regulirati aktivaciju FOXO3a proteina putem supresije njegove

fosforilacije, čime se povećava njegova aktivnost i potencijalni transport u jezgru, gdje može djelovati kao transkripcijski faktor.

Ekspresija SIRT6 također se povećala ovisno o dozi betulinske kiseline (Slika 28I), što ukazuje na modulaciju ovog deacetilaznog enzima koji ima ključnu ulogu u staničnoj stresnoj signalizaciji, popravku DNA i regulaciji metabolizma. Ovaj rezultat implicira potencijalnu suradnju između FOXO3a i SIRT6 u odgovorima stanica na tretman betulinskom kiselinom.

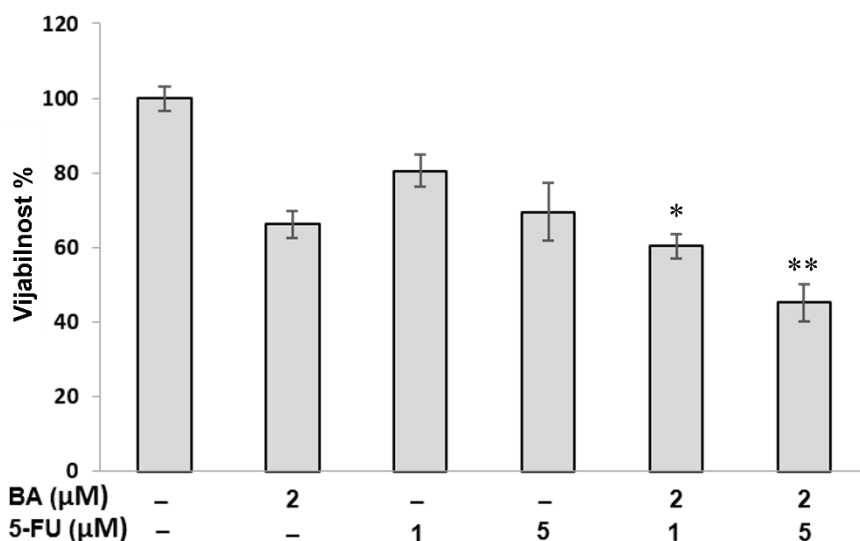


Slika 29. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije FOXO3a. Povećanje ekspresije FOXO3a ovisno o dozi otkriveno je u citoplazmi i jezgri HCT116 stanica tretiranih betulinskom kiselinom (BA) nakon 72 sata. Tretman s višom dozom betulinske kiseline rezultirao je povećanom imunofluorescencijom FOXO3a u jezgri.

Imunofluorescencijska analiza dodatno je potvrdila povećanje ekspresije FOXO3a proteina ovisno o dozi (Slika 29). Reprezentativne slike pokazuju povećanu prisutnost FOXO3a proteina unutar stanica tretiranih višim dozama betulinske kiseline, što vizualno potvrđuje nalaze Western blot analize. Intenzivna fluorescentna signalizacija FOXO3a posebno u jezgri stanica upućuje na povećanu transkripcijsku aktivnost ovog proteina pod utjecajem tretmana.

4.2.8. Kotretman betulinske kiseline i 5-FU smanjuje vijabilnost HCT116 stanica

Kako bismo istražili potencijalne terapijske strategije za povećanje učinkovitosti antitumorskih tretmana, ispitali smo kombinirani učinak betulinske kiseline i 5-fluorouracila (5-FU) na vijabilnost HCT116 stanica koristeći XTT test. Rezultati prikazani na Slici 30 pokazuju izražen sinergistički učinak ove kombinacije tretmana, što je dovelo do značajnog smanjenja vijabilnosti stanica raka debelog crijeva. Naši nalazi upućuju na to da betulinska kiselina povećava osjetljivost HCT116 stanica na citotoksične učinke 5-FU, djelujući kao kemosenzibilizator i poboljšavajući ukupnu učinkovitost tretmana.

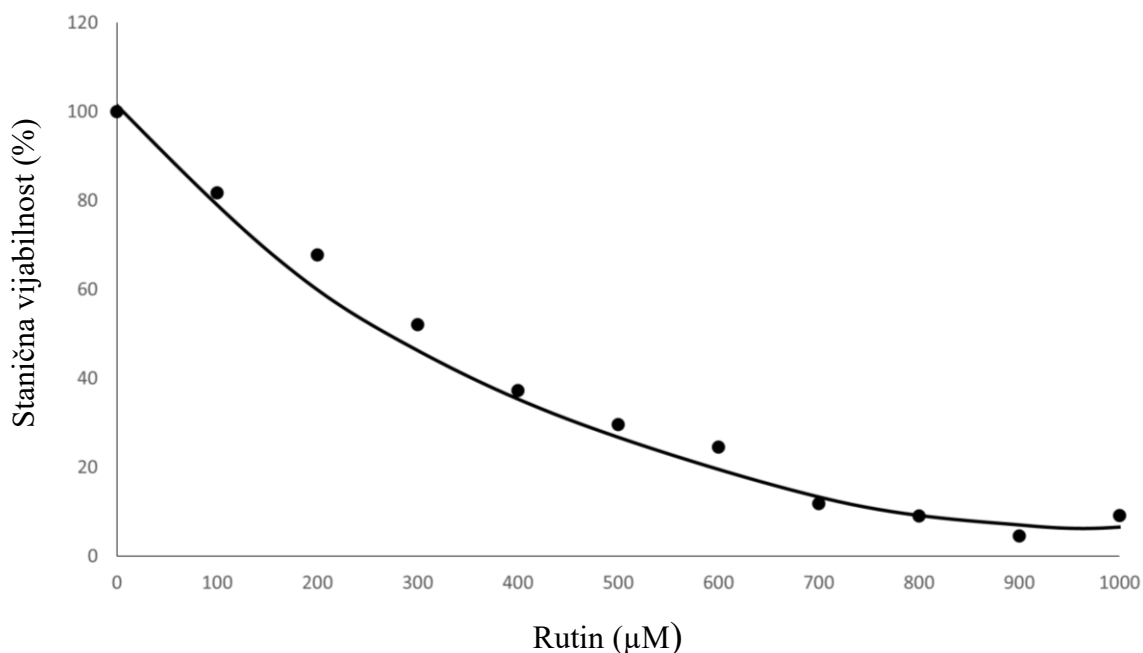


*Slika 30. Učinak betulinske kiseline (BA) na održivost HCT116 stanica tretiranih 5-fluorouracilom (5-FU). I betulinska kiselina i 5-FU sinergistički su smanjili održivost stanica raka. Stanice su uzgajane u mediju s 10% FBS-om i tretirane betulinskom kiselinom tijekom 72 sata. Postotak citotoksičnosti izračunat je u usporedbi s netretiranim stanicama, koje su uzete kao 100%. Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti $\pm$ SD iz tri neovisna pokusa. ** $P < 0,01$, OA plus 5-FU u usporedbi s 5-FU.*

4.3. Utjecaj rutina na HCT116 stanice raka debelog crijeva

4.3.1. Tretman rutinom smanjuje vijabilnost HCT116 stanica

Kako bi se istražio učinak tretmana rutina na metaboličku aktivnost stanica, provedeno je mjerenje vijabilnosti HCT116 stanica korištenjem XTT testa nakon 72 sata inkubacije. Rezultati su pokazali da rutin uzrokuje smanjenje vijabilnosti stanica na način ovisan o koncentraciji, pri čemu je utvrđena IC_{50} vrijednost od 355 μM (Slika 31). Rutin je pokazao inferiorno djelovanje u usporedbi s oleanoličnom i betulinskom kiselinom i nije se pokazao kao dobar kandidat za tretman ili kemosenzitivizaciju stanica raka debelog crijeva. S obzirom na visoke terapijske koncentracije potrebne za postizanje učinka rutina u stanicama raka debelog crijeva, daljnja istraživanja s ovim spojem nisu provedena. U znanstvenoj literaturi je uobičajeno u preliminarnim ispitivanjima koristiti raspon doza od 1 do 100 μM za određivanje farmakološkog djelovanja fitokemikalija, što se smatra prihvatljivim terapijskim dozama [126]. U nastavku istraživanja koriste se doze koje su bile najučinkovitije ($IC_{50} < 100 \mu M$) [127]. Iz toga razloga nismo nastavili istraživanja s rutinom.



Slika 31. Učinak rutina na vijabilnost HCT116 stanica u ovisnosti o dozi nakon 72 sata. Za XTT test vijabilnosti, stanice su uzgajane u mediju s 10% FBS-om i tretirane rutinom tijekom 72 sata. Postotak citotoksičnosti izračunat je u usporedbi s netretiranim stanicama, koje su uzete kao 100%. Pola maksimalne inhibicijske koncentracije (IC_{50}) određena je korištenjem nelinearne regresijske analize.

5. RASPRAVA

U ovom doktorskom radu istražen je učinak i mehanizam djelovanja triju fitokemikalija: dva pentaciklička triterpenoida, oleanolične kiseline i betulinske kiseline, te glikozida rutina, u tretmanu raka debelog crijeva. Rak debelog crijeva predstavlja jedan od vodećih uzroka obolijevanja i smrtnosti od karcinoma u svijetu, a već dugi niz godina zauzima visoko mjesto u globalnim statistikama. Klasični terapijski pristupi, koji uključuju kirurške zahvate, kemoterapiju, biološku terapiju i imunoterapiju, iako učinkoviti, suočavaju se s određenim ograničenjima, poput razvoja kemorezistencije, niske stope izlječenja, čestih recidiva bolesti te značajnih nuspojava koje znatno narušavaju kvalitetu života pacijenata i predstavljaju veliko opterećenje za zdravstveni sustav.

U potrazi za novim, učinkovitijim rješenjima, znanstvena zajednica sve više usmjerava pažnju na istraživanje prirodnih spojeva i njihovih derivata, poput fitokemikalija, zbog njihovog potencijala u liječenju raka. Fitokemikalije, bilo kao samostalni terapijski pristup, dodatak postojećim terapijama radi smanjenja nuspojava i kemorezistencije, ili kao suportivna terapija za ublažavanje simptoma, pokazale su značajan potencijal. Osobito su zanimljive zbog svoje selektivnosti prema stanicama raka i minimalnog utjecaja na zdrava tkiva, čime značajno smanjuju pojavu štetnih nuspojava u usporedbi s klasičnom kemoterapijom.

Posebno se pažnja posvećuje istraživanju sinergijskog djelovanja fitokemikalija s postojećim lijekovima, s ciljem smanjenja potrebnih doza kemoterapije, a time i pridruženih toksičnih učinaka, što bi moglo rezultirati poboljšanjem ishoda liječenja i kvalitete života pacijenata.

S obzirom na navedeno, u ovom istraživanju usmjereni smo na ispitivanje djelovanja rutina, oleanolične kiseline i betulinske kiseline na stanice raka debelog crijeva korištenjem *in vitro* modela na HCT116 stanicama. HCT116 stanice su humane stanice kolorektalnog adenokarcinoma, izolirane iz tumora debelog crijeva. Karakterizira ih mikrosatelitna nestabilnost (MSI-High), mutacija KRAS (G13D) i netaknuti p53 tumorski supresor, što ih čini važnim modelom za istraživanje mehanizama karcinogeneze, signalnih puteva i testiranje novih antitumorskih terapija [128].

Da bismo odredili terapijske doze tretmana kao i IC₅₀ vrijednost ispitivanih fitokemikalija na HCT116 stanice ispitali smo citotoksični učinak u rasponu doza od 0,5 do 1000 µM. IC₅₀, polovica maksimalne inhibicijske koncentracije, je vrijednost koja nam govori o koncentraciji nekog spoja potrebne za inhibiciju 50% neke određene biološke aktivnosti ili odgovora u odnosu na kontrolnu skupinu. Određivanje IC₅₀ vrijednosti u *in vitro* pokusima ključno je jer

pruža temeljni uvid u učinkovitost kemikalija protiv stanica raka i služi kao početna točka za planiranje daljnjih istraživanja na *in vivo* modelima. Ta vrijednost nam pokazuje da što je niža vrijednost IC_{50} , to je spoj učinkovitiji u inhibiranju rasta ili preživljavanja stanica (vijabilnosti) i obrnuto, što je viša vrijednost IC_{50} to pokazuje da je potrebna visoka koncentracija spoja za postizanje inhibicije. Ti podaci potom usmjeravaju sljedeće korake u istraživanjima na složenijim živim sustavima, uključujući životinjske modele i klinička ispitivanja na ljudima. Prilikom prijelaza s *in vitro* na *in vivo* modele, osim IC_{50} vrijednosti, potrebno je uzeti u obzir parametre poput bioraspoloživosti, distribucije lijeka u organizmu i toksičnosti. Međutim, IC_{50} vrijednost ostaje ključna polazna točka za odabir spojeva s najboljim potencijalom za terapijsku primjenu [129].

Ispitivanje citotoksičnog učinka fitokemikalija u tretmanu HCT116 stanica pokazalo je da sve tri fitokemikalije smanjuju vijabilnost HCT116 stanica sa različitim IC_{50} vrijednostima u tretmanu od 72 sata. Rutin smanjuje vijabilnost HCT116 stanica sa IC_{50} od 355 μM , oleanolična kiselina sa IC_{50} od 29,3 μM i betulinska kiselina 4,26 μM . Spoj sa visokom IC_{50} vrijednošću, rutin, eliminiran je iz daljnjih istraživanja zbog ograničenog potencijala pri visokim koncentracijama.

Mehanizam djelovanja oleanolične kiseline u tretmanu raka debelog crijeva u in vitro modelu na HCT116 stanicama

Fitokemikalije pokazuju selektivno djelovanje na zdrave i tumorske stanice, osobito u kontekstu oksidacijskog stresa. Njihov učinak ovisi o dozi, vrsti stanica i uvjetima mikrokruženja, čime ostvaruju širok spektar bioloških aktivnosti. Reaktivne kisikove vrste (ROS) imaju važnu ulogu u razvoju raka osobito u kontekstu održavanja proliferacije stanica. Poticanje antioksidacijskog djelovanja u stanicama raka ima važnost u cilju inhibicije proliferacije stanica raka a time i poticanje stanične smrti [130]. Rezultati istraživanja sugeriraju pojačani oksidacijski stres u HCT116 stanicama raka debelog crijeva izazvan oleanoličnom kiselinom. Jedan od glavnih regulatornih puteva za unutarstaničnu obranu od oksidacijskog stresa je Nrf2/HO-1 signalni put. HO-1 je gen, kojim upravljaju Nrf2, i jedan je od najvažnijih citoprotektivnih molekula [131–133]. Tretmanom oleanoličnom kiselinom u HCT116 stanicama dolazi do značajnog povećanja ekspresije HO-1 ovisno o dozi.

Dinamička regulacija apoptoze i autofagije pomoću fitokemikalija u raku prepoznata je kao obećavajući terapijski pristup s minimalnom citotoksičnošću i povećanom biološkom aktivnošću. Prehrambene fitokemikalije i njihovi sintetski analozi pokazali su učinkovitost u modulaciji apoptoze i autofagije u brojnim stanicama raka, bilo samostalno ili u kombinaciji s već postojećim antitumorskim lijekovima odobrenim od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*) [134]. Ciljanje modulacije stanične signalizacije za poticanje apoptoze nudi obećavajuću strategiju u terapiji raka debelog crijeva.

Rezultati tretmana oleanoličnom kiselinom na HCT116 stanicama pokazali su da oleanolična kiselina izaziva povećanje ekspresije inhibitora staničnog ciklusa p21 i smanjenu ekspresiju ciklina D1 ovisno o dozi. P21 je poznati inhibitor ciklina ovisnih kinaza (CDK) te njegovo povećanje rezultira inhibicijom aktivnosti CDK enzima koji su ključni za prijelaz stanica iz G1 u S fazu staničnog ciklusa [135]. To dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi, što smanjuje sposobnost stanica da se dijele i proliferiraju. Također, Ciklin D1 igra ključnu ulogu u poticanju prijelaza iz G1 u S fazu staničnog ciklusa [136]. Njegovo smanjenje također doprinosi blokadi napretka kroz stanični ciklus, što dodatno usporava ili zaustavlja proliferaciju stanica. Zhang i suradnici (2012) su u istraživanju utjecaja EGCG (epigalokatehin-3-galat), polifenola u zelenom čaju, opisali da transkripcijska aktivacija p21 i degradacija ciklina D1 doprinose suzbijanju rasta stanica raka debelog crijeva [137].

Nadalje, cijepana kaspaza-3 pokazala je povećanje ekspresije, slično p21, sugerirajući indukciju apoptoze koja je bila ovisna o dozi oleanolične kiseline. Porter i Jänicke (1999) ističu da je kaspaza-3 ključni izvršitelj apoptoze, odgovoran za cijepanje važnih proteinskih substrata poput PARP1 [138]. Kaspaze su specifične cisteinske proteaze koje igraju ključnu ulogu u procesu apoptoze, odnosno programirane stanične smrti. Aktivacija ovih enzima pokreće kaskadu proteolitičkih reakcija koje rezultiraju cijepanjem različitih proteinskih substrata unutar stanice. Jedan od tih važnih substrata je PARP1, protein koji je primarno zadužen za popravak oštećenja DNK. Tijekom apoptoze, aktivirane kaspaze, osobito kaspaza-3, cijepaju PARP1, čime se onemogućuje popravak DNK [138]. Cijepanje PARP1 ukazalo je na značajno povećanje nakon tretmana oleanoličnom kiselinom u HCT116 stanicama. Indukciju apoptoze potvrdili smo i AO/PI bojanjem koje je potvrdilo povećanje ranih i kasnih apoptotskih HCT116 stanica raka debelog crijeva.

U svrhu detaljnog proučavanja mehanizama citotoksičnog djelovanja fitokemikalija na stanice raka debelog crijeva HCT116 usmjerili smo se na proučavanje važnih signalnih puteva u karcinogenezi. Shackelford i Shaw (2009) opisali su da je AMPK put ključan za regulaciju staničnog metabolizma i kontrole rasta, te da njegova aktivacija igra važnu ulogu u supresiji tumora, dok disfunkcija ovog puta može doprinijeti razvoju raka [139]. PI3K/Akt signalni put ključan za regulaciju rasta, preživljavanja i metabolizma stanica, a njegova disfunkcija često doprinosi karcinogenezi, uključujući rak debelog crijeva [140]. Dobiveni rezultati, u tretmanu HCT116 stanica oleanoličnom kiselinom, pokazali su povećanu ekspresiju fosforilacije AMPK, ovisno o dozi, uz smanjenje ekspresije fosforiliranih oblika Akt i mTOR, ključnih komponenti signalnog puta koji promiče stanični rast i preživljavanje, čime se dodatno potiče antitumorski učinak. mTOR je centralni regulator rasta, metabolizma i preživljavanja stanica. U kontekstu raka, prekomjerna aktivacija mTOR signalnog puta potiče nekontrolirani rast stanica i doprinosi karcinogenezi čime postaje važan cilj za antitumorske terapije [141].

Dhillon i suradnici (2007) opisuju MAPK signalni put kao ključnog regulatora staničnih procesa, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu, a njegova disfunkcija može potaknuti nekontroliran rast stanica u karcinogenezi, uključujući rak debelog crijeva [142]. Prema dobivenim rezultatima, PI3K/Akt, ERK i JNK signalizacije bile su inhibirane oleanoličnom kiselinom u HCT116 stanicama, što je rezultiralo indukcijom apoptoze. Ovo djelovanje oleanolične kiseline na signalne puteve može predstavljati ključni mehanizam antitumorskog djelovanja oleanolične kiseline, potencijalno dovodeći do smanjenja proliferacije stanica raka [142]. Prethodna istraživanja pokazala su da oleanolična kiselina

inhibira brojne unutarstanične ciljeve, čime se suzbija rast raka debelog crijeva, uključujući Akt i MAPK puteve [143]. Osim ERK-a i JNK-a, p38 MAPK ima ključnu ulogu u iniciranju programirane smrti stanica [144,145]. Istraživanja sugeriraju da reaktivne vrste kisika i signalizacija putem p53 posreduju fosforilaciji p38 i aktivaciji kaspaza tijekom apoptoze stanica raka debelog crijeva [145]. Rezultati su u skladu s ovim istraživanjima, implicirajući da oleanolična kiselina inducira apoptozu kroz aktivaciju p38.

FOXO3a je transkripcijski faktor tipa *forkhead* koji regulira mnoštvo važnih staničnih procesa, uključujući proliferaciju, apoptozu, diferencijaciju i metabolizam [146]. Pokazano je da FOXO3a inhibira proliferaciju i invazivnost stanica raka te je ključni medijator djelovanja antitumorskih lijekova [146]. Poremećaji u staničnoj homeostazi aktiviraju nadređene regulatorne puteve (poput Akt, MAPK i AMPK) koji, zauzvrat, moduliraju substaničnu lokalizaciju i funkcionalnu aktivnost FOXO3a [146]. Nakupljanje FOXO3a u jezgri od strane ERK-a i Akt-a rezultira translokacijom fosforiliranog FOXO3a (p-FOXO3a) iz jezgre u citoplazmu te njegovom proteasomalnom degradacijom. Nasuprot tome, fosforilacija od strane JNK-a i p38 MAPK-a dovodi do izvoza FOXO3a natrag u jezgru, gdje pokreće transkripcijske programe uključene u regulaciju staničnog ciklusa, apoptoze, staničnog metabolizma i autofagije [146,147]. Zanimljivo je da prethodna istraživanja pokazuju kako AMPK fosforilira FOXO3a isključivo kada se on nalazi u jezgri [148,149]. Nakupljanje u jezgri FOXO3a dovodi do povećanja njegove transkripcijske aktivnosti [146], što se može odraziti na indukciju p21 i supresiju ciklina D1 [150]. Rezultati su pokazali povećanje fosforilacije FOXO3a koje nije ovisilo o Aktu, ERK-u niti JNK-u. Gómez-Puerto i suradnici (2016) utvrdili su da se FOXO3a može fosforilirati na poziciji Ser²⁹⁴ od strane JNK-a, kao i p38, osim od strane ERK-a [151,152]. Ovo je u skladu s dobivenim rezultatima, budući da je pokazano da oleanolična kiselina inducira povećanje ekspresije p38 te akumulaciju p-FOXO3a na poziciji Ser²⁹⁴ u jezgri. Daljnja analiza sugerirala je da p38 negativno regulira ekspresiju FOXO3a, kao i Sirt6, što se podudara s nedavno objavljenim podacima [153]. Pokazano je da Sirt6 djeluje kao supresor tumora u raznim vrstama raka, uključujući rak debelog crijeva, jetre i jajnika, te da posjeduje antitumorski učinak induciranjem apoptoze u stanicama raka debelog crijeva [153].

Inhibicija preživljavanja stanica i indukcija stanične smrti glavni su pristupi u terapiji tumora [154]. Autofagija igra važnu ulogu u održavanju stanične metaboličke homeostaze eliminacijom disfunkcionalnih ili nepotrebnih proteina te oštećenih ili starijih staničnih organela, čime se recikliraju njihovi sastavni metaboliti koji omogućuju održavanje preživljavanja stanica i genetske stabilnosti, a također potiču razvoj rezistencije na lijekove, što

znatno ograničava učinkovitost kemoterapijskih lijekova [154,155]. Mitofagija je specifična forma autofagije koja se bavi selektivnim uklanjanjem oštećenih ili disfunkcionalnih mitohondrija iz stanice. Taj proces je ključan za održavanje mitohondrijske funkcionalnosti i stanične homeostaze, budući da oštećeni mitohondriji mogu generirati visoke razine reaktivnih kisikovih spojeva, što dovodi do oksidacijskog stresa i potencijalno inducira staničnu smrt [156]. Rezultati su pokazali smanjenje vijabilnosti HCT116 stanica nakon tretmana inhibitorom autofagije/mitofagije 3-MA, što sugerira zaštitnu ulogu autofagije u citotoksičnosti posredovanoj tretmanom oleanoličnom kiselinom. Glavni indikatori autofagije (Beclin-1, Atg5, LC3B) i mitofagije (p62, PINK1, Parkin, TOMM20) značajno su izmijenjeni nakon tretmana oleanoličnom kiselinom. Tijekom progresije autofagije, sekvencijalno se uključuju proteini poput Atg5 i LC3B, koji posreduju u formiranju kiselih autofagosomskih vezikula [157]. AO bojanje otkrilo je akumulaciju autofagosoma induciranu oleanoličnom kiselinom ovisno o dozi, čime se potvrđuje njegova aktivacija autofagije.

PI3K/Akt i ERK putovi djeluju kao ključni regulatori autofagije. Brojni prirodni spojevi ciljaju signalizaciju putem PI3K/Akt i ERK puteva, što rezultira suzbijanjem rasta tumora [158,159]. Ciljanje autofagije posredovane putem PI3K/Akt/mTOR i ERK nije samo važna terapijska strategija u liječenju raka, već također značajno doprinosi povećanju kemosenzibilizacije stanica raka, čime se sprječava razvoj rezistencije na lijekove [158]. Suzbijanje oba signalna puta tretmanom oleanoličnom kiselinom u ovom istraživanju bilo je povezano s povećanom osjetljivošću HCT116 stanica na citotoksičnost 5-FU. Uz to, pokazana je povećana ekspresija p38 u HCT116 stanicama nakon tretmana oleanoličnom kiselinom, uz istodobnu indukciju autofagije. Prethodne studije pokazale su da inhibicija p38 MAPK-a može dovesti do smanjenja autofagije [160], što je u skladu s dobivenim rezultatima. Nadalje, p38 može fosforilirati FOXO3a kako bi stimulirao autofagiju aktiviranjem transkripcije gena povezanih s autofagijom, poput LC3B [161].

Put PINK1/Parkin predstavlja središnji regulatorni mehanizam u mitofagiji [162]. Nakon depolarizacije membrane, mitohondrijski unos PINK1-a je spriječen, što omogućuje stabilizaciju PINK1-a na vanjskoj mitohondrijskoj membrani i posljedičnu translokaciju Parkina na mitohondrijsku površinu. To dovodi do ubiquitinacije proteina vanjske mitohondrijske membrane te pokreće selektivnu autofagiju [163]. Aktivacija PINK1/Parkin puta u ovom istraživanju bila je praćena smanjenom ekspresijom receptora TOMM20. Smanjena ekspresija Parkina u 72 sata mogla bi biti povezana s njegovim privremenim povećanjem tijekom rane faze mitofagije [164]. Smanjena ekspresija mitohondrijskog receptora

TOMM20 ukazuje na smanjenje broja mitohondrija i povećanu aktivnost mitofagije [165]. Autofagički adaptorni protein p62 prepoznaje fosforilirane poliubikvitinske lance na mitohondrijskim proteinima te, interakcijom s LC3, potiče stvaranje autofagosoma [163]. Nekoliko studija pokazalo je povećanu ekspresiju p62 i LC3 tijekom mitofagije [166–168], što je u skladu s rezultatima istraživanja Nadalje, tijekom autofagije, LC3 se nakuplja na membranama koje postupno okružuju stanični materijal namijenjen razgradnji [169]. Kolokalizacija TOMM20 i LC3B u ovom istraživanju ukazala je na modulaciju mitofagije inducirane oleanoličnom kiselinom. Korištenjem inhibitora autofagije/mitofagije 3-MA, pokazano je da mitofagija igra važnu ulogu u mehanizmu preživljavanja HCT116 stanica, što je u skladu sa sličnim nalazima u A549 stanicama raka pluća [170]. Slično, sugerirano je da FOXO3a djeluje kao regulator zaštitne autofagije u hematopoetskim matičnim stanicama i neuroblastoma stanicama [171,172].

Zaključno, oleanolična kiselina je inducirala oksidacijski stres i aktivirala apoptotski mehanizam u HCT116 stanicama. Dobiveni rezultati dali su prvi uvid o svojstvima oleanolične kiseline u induciranju mitofagije u stanicama raka debelog crijeva. Razumijevanje molekularnih mehanizama može pridonijeti otkrivanju novih antikancerogenih lijekova koji specifično ciljaju mitofagiju kako bi smanjili kancerogeni potencijal stanica raka debelog crijeva.

Mehanizam djelovanja betulinske kiseline u tretmanu raka debelog crijeva u in vitro modelu na HCT116 stanicama

U ovom radu istražen je mehanizam djelovanja betulinske kiseline u tretmanu raka debelog crijeva koristeći *in vitro* model na HCT116 stanicama. Kao i tretman oleanoličnom kiselinom, tretman betulinskom kiselinom pokazao je slične učinke na oksidacijski stres u HCT116 stanicama. Rezultati su pokazali povećanje ekspresije HO-1 i GPX-1 ovisno o dozi. HO-1 ima važnu citoprotektivnu ulogu, sudjelujući u adaptivnom odgovoru na oksidacijski stres i doprinoseći smanjenju oštećenja stanica induciranih reaktivnim kisikovim spojevima [131,132]. Posebno važnu ulogu u antioksidacijskim procesima unutar stanice imaju proteini iz obitelji glutathion peroksidaza (GPX), među kojima se ističe glutathion peroksidaza 1 (GPX-1). GPX-1 je ključni antioksidacijski enzim koji katalizira smanjenje vodikovog peroksida (H_2O_2) u vodu, čime učinkovito neutralizira reaktivne kisikove spojeve i štiti stanice od oksidacijskih oštećenja [173,174]. Dobiveni rezultati podudaraju se sa smanjenjem vijabilnosti HCT116 stanica i poticanjem antitumorskih signalnih puteva povezanih s oksidacijskim stresom i smrću stanica raka.

U procesu apoptoze dolazi do značajnih promjena u ekspresiji i posttranslacijskim modifikacijama proteina koji reguliraju staničnu smrt. Primjerice, proteini koji sadrže isključivo BH3 domenu poput BIM-a i NOXA-e povećavaju se kao odgovor na stanični stres ili aktivaciju p53 signalizacije, čime se inhibira antiapoptotička aktivnost Bcl-2 obitelji i potiče aktivacija izvršnih kaspaza, što rezultira programiranom staničnom smrću [173,174]. U tretmanu stanica raka debelog crijeva HCT116 betulinskom kiselinom parametri apoptoze bili su smanjeni, uključujući Bax, cijepanu kaspazu-3 i cijepani PARP1, uz povećanu ekspresiju proapoptotičkih proteina Bim i Noxa ovisno o dozi.

S druge strane, tijekom autofagije ključni proteini poput Beclin-1, Atg5 i LC3B prolaze kroz specifične posttranslacijske modifikacije koje omogućuju formiranje autofagosoma, struktura potrebnih za obuhvaćanje i degradaciju staničnih komponenti. Osim toga, proteini koji sadrže isključivo BH3 domenu (Bim i NOXA) mogu sudjelovati u regulaciji autofagije, time usklađujući signalizacijske puteve apoptoze i autofagije kako bi stanica mogla adekvatno odgovoriti na stresne uvjete i održati staničnu homeostazu [174,175].

TUNEL test potvrdio je da apoptoza nije bila prisutna kao citotoksički mehanizam u HCT116 stanicama tretiranim betulinskom kiselinom nakon 72 sata u testiranim dozama. Rezultati su u suprotnosti sa literaturom koja navodi proapoptotično djelovanje betulinske kiseline u

stanicama raka [110–117]. Istraživanje provedeno na tumorskim linijama SW480 i HCT116 raka debelog crijeva pokazalo je da betulinska kiselina inducira apoptozu u ovim stanicama povećanjem ekspresije Bax proteina i cijepane kaspaze-3, uz smanjenje Bcl-2 proteina u tretmanima od 24 i 48 sati [176]. Ovakvi rezultati mogu posljedica različitih eksperimentalnih uvjeta, doza ili vremena izlaganja.

Međutim, tretman betulinskom kiselinom na HCT116 stanicama pokazao je indukciju autofagije. Rezultati su pokazali značajan porast ekspresije LC3-I/II ovisno o povećanju doze. Za razliku od tretmana oleanoličnom kiselinom, betulinska kiselina nije pokazala utjecaj na modulaciju mitofagije u ovom eksperimentalnom modelu. Rezultati su pokazali da autofagija ima zaštitnu ulogu u tretmanu betulinskom kiselinom nakon tretmana inhibitorom autofagije 3-MA, što se poklapa sa rezultatima dobivenima i u tretmanu sa oleanoličnom kiselinom. Ovi rezultati podržavaju prethodna istraživanja koja su navela zaštitnu ulogu autofagije u kontekstu betulinske kiseline [177,178].

Rezultati utjecaja tretmana betulinskom kiselinom u stanicama raka debelog crijeva HCT116 pokazali su nešto drugačije rezultate nego sa tretmanom oleanoličnom kiselinom u istraživanju signalnih puteva AMPK, PI3K/Akt i MAPK. Tretman s betulinskom kiselinom rezultirao je povećanjem fosforilacije AKT-a, ovisno o dozi, što implicira aktivaciju ovog signalnog puta.

Aktivacija Akt-a povezana je s inhibicijom apoptoze jer fosforilacija ključnih pro-apoptotičkih proteina, poput Bada i faktora FOXO3a, smanjuje njihovu sposobnost da induciraju apoptotske procese, čime se povećava preživljavanje stanica. U kontekstu karcinogeneze, povećana aktivnost Akt-a doprinosi ne samo rastu i proliferaciji stanica, nego i razvijanju rezistencije na kemoterapijske tretmane [179,180].

Rezultati istraživanja pokazuju značajno smanjenje fosforilacije ključnih komponenti MAPK signalnih puteva, uključujući JNK1/2, p38 i ERK1/2. MAPK putevi reguliraju stanične odgovore na stres, apoptozu i proliferaciju. U kontekstu karcinogeneze, hiperaktivacija posebno ERK puta doprinosi povećanoj proliferaciji i preživljavanju karcinomskih stanica, dok JNK i p38 mogu potaknuti apoptozu u odgovor na stanična oštećenja. Stoga inhibicija ovih puteva može rezultirati smanjenjem proapoptotičkih signala, što u konačnici može utjecati na razvoj i napredovanje tumora. Ovi nalazi su u skladu s istraživanjem Dhillon-a i suradnika (2007), koji detaljno opisuju dvosmjernu ulogu MAPK signalizacije u karcinogenezi [142], te s istraživanjem Cuadrado-a i suradnika (2010), koji naglašavaju ulogu MAPK komponenti u regulaciji apoptoze [181].

AMPK/mTOR put je klasični regulator autofagije; u uvjetima niske energetske razine, aktivirani AMPK inhibira mTOR, što dovodi do indukcije autofagije kao mehanizma preživljavanja. Međutim, rezultati pokazuju značajno smanjenje fosforilacije AMPK, što sugerira da klasični AMPK/mTOR put možda nije primarni mehanizam indukcije autofagije u ovom sustavu. Ovaj nalaz sugerira postojanje drugih puteva aktivacije autofagije, poput onih povezanih s reaktivnim vrstama kisika ili odgovorima na stanični stres. Ovaj koncept detaljno su predstavili Laplante i Sabatini (2012) [141] te Klionsky et al. (2016) [182], koji opisuju složenost mehanizama regulacije autofagije u stanici.

Rezultati tretmana betulinskom kiselinom pokazali su blago povećanje ukupne ekspresije FOXO3a, dok je fosforilirani oblik FOXO3a (koji je često povezan s inhibicijom njegove transkripcijske aktivnosti) blago smanjen, a ti rezultati su nezavisni o signalnim putevima Akt, AMPK, ERK, JNK i p38. Paralelno s tim, ekspresija Sirt6 bila je značajno povećana ovisno o dozi u HCT116 stanicama. Prethodna istraživanja sugeriraju da Sirt6 može modulirati aktivnost FOXO3a putem deacetilacije, čime se potiče njegovu transkripcijsku funkciju te se inducira ekspresija autofagijskih gena, što doprinosi aktivaciji autofagije kao mehanizma preživljavanja u uvjetima staničnog stresa [84,183]. Ova interakcija između FOXO3a i Sirt6 predstavlja važan regulatorni signalni put u koordinaciji autofagije i staničnog odgovora na stres, što može imati značajne implikacije u kontekstu terapijskih pristupa u karcinogenezi.

Istraživanje je pokazalo da betulinska kiselina inducira autofagiju, ali ne i apoptozu, u HCT116 stanicama raka debelog crijeva. Iako su prethodna istraživanja sugerirala njeno proapoptotično djelovanje, naši rezultati ukazuju na zaštitnu ulogu autofagije, što je potvrđeno inhibicijom autofagije 3-MA inhibitorom. Ovi nalazi sugeriraju da, iako betulinska kiselina ne inducira izravno apoptozu u HCT116 stanicama, ona potiče autofagiju koja može djelovati kao zaštitni mehanizam za stanice raka, a inhibicija autofagije može povećati učinkovitost betulinske kiseline kao antikancerogenog agensa, što otvara mogućnost kombiniranih terapija koje ciljaju autofagiju kako bi se pojačao terapijski učinak [184]. Tretman betulinskom kiselinom modulirao je ključne signalne puteve, uključujući Akt, MAPK i AMPK/mTOR, pri čemu je aktivacija Akt-a potencijalno doprinijela preživljavanju stanica, no usprkos tome, stanice pod tretmanom su na kraju podlegle citotoksičnom učinku. Nadalje, povećana ekspresija Sirt6 i FOXO3a sugerira alternativne puteve regulacije autofagije. Rezultati nam pokazuju koliko su male promjene na molekularnoj razini ključne za radikalne razlike u mehanizmu djelovanja protutumorskih lijekova. Ovi nalazi naglašavaju kompleksnost odgovora stanica raka na

betulinsku kiselinu i ukazuju na mogućnost njenog djelovanja kroz mehanizme neovisne o klasičnim apoptotskim putevima.

Kemosenzibilizacija stanica raka debelog crijeva HCT116 fitokemikalijama 5-FU sa oleanoličnom kiselinom i betulinskom kiselinom

U ovom istraživanju analizirane su potencijalne terapijske strategije za poboljšanje učinkovitosti antitumorskih tretmana, istražujući sinergistički učinak oleanolične kiseline i 5-fluorouracila (5-FU), kao i betulinske kiseline i 5-FU-a, na vijabilnost HCT116 stanica raka debelog crijeva. Rezultati su pokazali da oba tretmana značajno smanjuju vijabilnost stanica te sugeriraju da oleanolična kiselina i betulinska kiselina mogu djelovati kao kemosenzibilizatori, povećavajući učinkovitost 5-FU-a.

Rezultati kombiniranog učinka oleanolične kiseline i 5-FU pokazala je izražen sinergistički učinak, dovodeći do značajnog smanjenja vijabilnosti HCT116 stanica. Ovaj rezultat sugerira da oleanolična kiselina može imati ulogu kemosenzibilizatora, pojačavajući učinke 5-FU-a na stanice raka debelog crijeva. Slično tome, rezultati sa betulinskom kiselinom jasno pokazuju da tretman povećava osjetljivost HCT116 stanica na citotoksične učinke 5-FU, što ukazuje na njegov potencijal kao kemosenzibilizatora.

Usporedba oba tretmana ukazuje na to da bi primjena ovih spojeva mogla biti potencijalna strategija za poboljšanje učinkovitosti standardne kemoterapije temeljene na 5-FU-u. Budući da je otpornost na 5-FU veliki klinički izazov u liječenju raka debelog crijeva [185,186], sinergistički učinak ovih spojeva mogao bi omogućiti smanjenje doze 5-FU-a, čime bi se potencijalno smanjile nuspojave, a istovremeno održala ili čak povećala terapijska učinkovitost.

Ovi rezultati otvaraju mogućnosti za daljnja istraživanja mehanizama djelovanja oleanolične kiseline i betulinske kiseline u kombinaciji s 5-FU-om, kao i za *in vivo* studije kako bi se procijenila njihova klinička primjenjivost. Također, buduća istraživanja trebala bi istražiti specifične molekularne puteve koje ovi spojevi ciljaju, kako bi se identificirali biomarkeri koji bi mogli poslužiti za selekciju pacijenata koji bi najviše imali koristi od ovakvih kombiniranih terapija.

6. ZAKLJUČAK

Fitokemikalije predstavljaju važan terapijski alat u modulaciji signalnih puteva raka debelog crijeva. Njihovo djelovanje nije ograničeno na inhibiciju tumorskog rasta, već uključuje kompleksne mehanizme koji utječu na ključne molekularne procese, poput apoptoze, upale i metabolizma. Kombinacija ovih spojeva s postojećim terapijama može unaprijediti terapijske ishode smanjenjem otpornosti tumorskih stanica i povećanjem učinkovitosti liječenja. Buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na razjašnjavanje specifičnih mehanizama djelovanja ovih spojeva te na ispitivanje njihovih kombiniranih učinaka na signalne puteve, s ciljem optimizacije terapijskih strategija za pacijente s rakom debelog crijeva.

ZAKLJUČCI:

1. Utjecaj fitokemikalija na vijabilnost stanica raka debelog crijeva i sposobnost formiranja kolonija pokazao je da rutin ima visoku IC_{50} vrijednost ($355 \mu M$) i nema značajan citotoksični učinak, zbog čega je eliminiran iz daljnjih istraživanja. S druge strane, oleanolična kiselina ($IC_{50} = 29,3 \mu M$) i betulinska kiselina ($IC_{50} = 4,26 \mu M$) pokazuju značajan citotoksični učinak na HCT116 stanice, smanjujući njihovu vijabilnost i sposobnost formiranja kolonija.
2. Uloga oksidacijskog stresa, apoptoze i autofagije/mitofagije u mehanizmu citotoksičnosti oleanolične kiseline očituje se u induciranju oksidacijskog stresa povećanjem ekspresije HO-1, dok istovremeno potiče apoptozu povećanjem ekspresije p21 i smanjenjem ciklina D1. Aktivira kaspazu-3 i cijepanje PARP1, čime se potvrđuje apoptotski učinak. Također inhibira PI3K/Akt i ERK/JNK signalizaciju te aktivira p38 MAPK signalizaciju što doprinosi apoptotskom odgovoru te potiče autofagiju aktivacijom AMPK i inhibicijom mTOR-a. Nadalje, inducira mitofagiju putem PINK1/Parkin signalnog puta. Za razliku od oleanolične kiseline, betulinska kiselina također inducira oksidacijski stres povećanjem ekspresije HO-1 i GPX-1, ali ne uzrokuje apoptozu. Potiče autofagiju, no bez modulacije mitofagije te aktivira Akt signalni put, što može pridonijeti preživljavanju stanica.
3. Uloga SIRT6 u aktivaciji FOXO3a nakon tretmana fitokemikalijama pokazuje da oleanolična i betulinska kiselina povećavaju ekspresiju FOXO3a i SIRT6, sugerirajući njihovu ulogu u regulaciji autofagije i apoptoze. Oleanolična kiselina povećava nakupljanje u jezgri FOXO3a, dok betulinska kiselina koristi alternativne mehanizme aktivacije FOXO3a.

4. Molekularni mehanizam terapijskog djelovanja fitokemikalija u raku debelog crijeva temelji se na modulaciji signalnih puteva. Oleanolična kiselina modulira više signalnih puteva uključujući apoptozu, autofagiju i mitofagiju, dok betulinska kiselina inducira autofagiju bez poticanja apoptoze. Dodatno, oleanolična kiselina inhibira Akt signalizaciju, dok je betulinska kiselina aktivira, što može pridonijeti različitim učincima na preživljavanje stanica.
5. Kemosenzitivizacija stanica raka debelog crijeva na 5-FU pomoću fitokemikalija pokazala je da oleanolična i betulinska kiselina povećavaju osjetljivost HCT116 stanica na 5-FU. Kombinacija ovih spojeva s 5-FU smanjuje vijabilnost stanica i može omogućiti smanjenje doze 5-FU-a, čime se smanjuju nuspojave kemoterapije. Ovi spojevi mogu djelovati kao kemosenzibilizatori, poboljšavajući učinkovitost standardne terapije u liječenju raka debelog crijeva.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da čak i male promjene na molekularnoj razini mogu dovesti do značajnih razlika u mehanizmu djelovanja protutumorskih lijekova. Autofagija i apoptoza identificirani su kao ključni procesi kroz koje fitokemikalije mogu modulirati stanični odgovor u raku debelog crijeva. U tom kontekstu, oleanolična i betulinska kiselina pokazale su značajan potencijal u modulaciji signalnih puteva povezanih s oksidacijskim stresom, staničnom smrću i autofagijom, što ih čini obećavajućim kandidatima za poboljšanje terapijskih pristupa u liječenju raka debelog crijeva.

Unatoč ovim nalazima, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se detaljno razjasnili specifični molekularni putevi koji posreduju učinke ovih spojeva. Identifikacija takvih puteva mogla bi omogućiti razvoj biomarkera za personalizirane terapijske strategije, čime bi se povećala učinkovitost i selektivnost tretmana, smanjujući pritom nuspojave i otpornost na terapiju.

7. LITERATURA

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H i sur. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2024;74:229–63.
- [2] Wong MCS, Huang J, Lok V i sur. Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2021;19:955-966.e61.
- [3] Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut* 2006;55:285–91.
- [4] Bailey CE, Hu C-Y, You YN i sur. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg* 2015;150:17–22.
- [5] Shivappa N, Godos J, Hébert J i sur. Dietary Inflammatory Index and Colorectal Cancer Risk—A Meta-Analysis. *Nutrients* 2017;9:1043.
- [6] Gausman V, Dornblaser D, Anand S i sur. Risk Factors Associated With Early-Onset Colorectal Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2020;18:2752-2759.
- [7] Lu L, Mullins CS, Schafmayer C i sur. A global assessment of recent trends in gastrointestinal cancer and lifestyle-associated risk factors. *Cancer Commun* 2021;41:1137–51.
- [8] Lawler T, Walts ZL, Steinwandel M i sur. Type 2 Diabetes and Colorectal Cancer Risk. *JAMA Netw Open* 2023;6:e2343333.
- [9] Jess T, Rungoe C, Peyrin–Biroulet L. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2012;10:639–45.
- [10] Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z i sur. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: Results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:205–11.
- [11] Wilkinson AN, Lieberman D, Leontiadis GI i sur. Colorectal cancer screening for patients with a family history of colorectal cancer or adenomas. *Can Fam Physician* 2019;65:784–9.

- [12] Lichtenstein P, Holm N V, Verkasalo PK i sur. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine* 2000;343:78–85.
- [13] Hampel H, Kalady MF, Pearlman R i sur. Hereditary Colorectal Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2022;36:429–47.
- [14] Aelvoet AS, Buttitta F, Ricciardiello L i sur. Management of familial adenomatous polyposis and MUTYH-associated polyposis; new insights. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2022;58–59:101793.
- [15] Kidambi TD, Kohli DR, Samadder NJ i sur. Hereditary Polyposis Syndromes. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2019;17:650–65.
- [16] La Vecchia S, Sebastián C. Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. *Semin Cell Dev Biol* 2020;98:63–70.
- [17] Barker N, van Es JH, Kuipers J i sur. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007;449:1003–7.
- [18] Zeki SS, Graham TA, Wright NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:90–100.
- [19] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA i sur. Colorectal cancer. *The Lancet* 2019;394:1467–80.
- [20] Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006;25:7531–7.
- [21] Davies H, Bignell GR, Cox C i sur. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
- [22] Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 2020;158:291–302.
- [23] Pinto D, Gregorieff A, Begthel H i sur. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003;17:1709–13.
- [24] Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D i sur. KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992–5.

- [25] Russo A, Bazan V, Iacopetta B i sur. The TP53 Colorectal Cancer International Collaborative Study on the Prognostic and Predictive Significance of *p53* Mutation: Influence of Tumor Site, Type of Mutation, and Adjuvant Treatment. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:7518–28.
- [26] Davies H, Bignell GR, Cox C i sur. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
- [27] Borowsky J, Dumenil T, Bettington M i sur. The role of APC in WNT pathway activation in serrated neoplasia. *Modern Pathology* 2018;31:495–504.
- [28] Baidoun F, Elshiwly K, Elkeraie Y i sur. Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Curr Drug Targets* 2021;22:998–1009.
- [29] Afrin S, Giampieri F, Gasparrini M i sur. Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnol Adv* 2020;38:107322.
- [30] Bendardaf R, El-Serafi A, Syrjänen K i sur. The effect of vascular endothelial growth factor-1 expression on survival of advanced colorectal cancer patients. *Libyan J Med* 2017;12:1290741.
- [31] Fritz CDL, Otegbeye EE, Zong X i sur. Red-flag signs and symptoms for earlier diagnosis of early-onset colorectal cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2023;115:909–16.
- [32] Holtedahl K, Borgquist L, Donker GA i sur. Symptoms and signs of colorectal cancer, with differences between proximal and distal colon cancer: a prospective cohort study of diagnostic accuracy in primary care. *BMC Fam Pract* 2021;22:148.
- [33] Maida M, Dahiya DS, Shah YR i sur. Screening and Surveillance of Colorectal Cancer: A Review of the Literature. *Cancers (Basel)* 2024;16:2746.
- [34] Schreuders EH, Ruco A, Rabeneck L i sur. Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut* 2015;64:1637–49.
- [35] Ladabaum U, Dominitz JA, Kahi C i sur. Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology* 2020;158:418–32.

- [36] Leerhoff S, Raem A, Kolbe E-W i sur. Methylated Septin9 identified patients with colorectal carcinoma and showed higher sensitivity than conventional biomarkers in detecting tumor. *Cancer Treat Res Commun* 2023;36:100748.
- [37] Mach J-P, Pusztaszeri G. Carcinoembryonic antigen (CEA): Demonstration of a partial identify between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochemistry* 1972;9:1031–4.
- [38] Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999;9:67–81.
- [39] Jelski W, Mroczko B. Biochemical Markers of Colorectal Cancer – Present and Future. *Cancer Manag Res* 2020;Volume 12:4789–97.
- [40] Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M i sur. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol* 2016;22:1745–55.
- [41] Taieb J, Le Malicot K, Shi Q i sur. Prognostic Value of *BRAF* and *KRAS* Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2017;109:djw272.
- [42] Shinji S, Yamada T, Matsuda A i sur. Recent Advances in the Treatment of Colorectal Cancer: A Review. *Journal of Nippon Medical School* 2022;89:89-310.
- [43] Mahmoud NN. Colorectal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2022;31:127–41.
- [44] Shi J, Sun Z, Gao Z i sur. Radioimmunotherapy in colorectal cancer treatment: present and future. *Front Immunol* 2023;14:1105180.
- [45] Cho JR, Lee K-W, Oh H-K i sur. Effectiveness of oral fluoropyrimidine monotherapy as adjuvant chemotherapy for high-risk stage II colon cancer. *Ann Surg Treat Res* 2022;102:271.
- [46] Yu I, Dakwar A, Takabe K. Immunotherapy: Recent Advances and Its Future as a Neoadjuvant, Adjuvant, and Primary Treatment in Colorectal Cancer. *Cells* 2023;12:258.
- [47] Johdi NA, Sukor NF. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Front Immunol* 2020;11.
- [48] Shi J, Sun Z, Gao Z i sur. Radioimmunotherapy in colorectal cancer treatment: present and future. *Front Immunol* 2023;14.

- [49] Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A i sur. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18:197.
- [50] Lim CG, Shin S-H, Han Y i sur. Unraveling therapeutic potentials of mRNA-based cancer vaccine concurrently targeting heterogeneous KRAS mutant cancer. *Cancer Res* 2024;84:352.
- [51] Mao X, Xu J, Wang W i sur. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer* 2021;20:131.
- [52] Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2021;16:223–49.
- [53] Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol* 2020;17:807–21.
- [54] Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 2017;36:1461–73.
- [55] Kotecha R, Takami A, Espinoza JL. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget* 2016;7:52517–29..
- [56] Zubair H, Azim S, Ahmad A i sur. Cancer Chemoprevention by Phytochemicals: Nature’s Healing Touch. *Molecules* 2017;22:395.
- [57] Jiang J, Ou H, Chen R i sur. The Ethnopharmacological, Phytochemical, and Pharmacological Review of *Euryale ferox* Salisb.: A Chinese Medicine Food Homology. *Molecules* 2023;28:4399.
- [58] Behl T, Kumar K, Brisc C i sur. Exploring the multifocal role of phytochemicals as immunomodulators. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021;133:110959.
- [59] Zubair H, Azim S, Ahmad A i sur. Cancer Chemoprevention by Phytochemicals: Nature’s Healing Touch. *Molecules* 2017;22:395.
- [60] Zhao Y, Hu X, Zuo X i sur. Chemopreventive effects of some popular phytochemicals on human colon cancer: a review. *Food Funct* 2018;9:4548–68.

- [61] Rana P, Shrama A, Mandal CC. Molecular insights into phytochemicals-driven break function in tumor microenvironment. *J Food Biochem* 2021;45.
- [62] Weng W, Goel A. Curcumin and colorectal cancer: An update and current perspective on this natural medicine. *Semin Cancer Biol* 2022;80:73–86.
- [63] Calibasi-Kocal G, Pakdemirli A, Bayrak S i sur. Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. *J BUON* 2019;24:1482–7.
- [64] Pricci M, Girardi B, Giorgio F i sur. Curcumin and Colorectal Cancer: From Basic to Clinical Evidences. *Int J Mol Sci* 2020;21:2364.
- [65] Vernousfaderani EK, Akhtari N, Rezaei S i sur. Resveratrol and Colorectal Cancer: A Molecular Approach to Clinical Researches. *Curr Top Med Chem* 2021;21:2634–46.
- [66] Honari M, Shafabakhsh R, Reiter RJ i sur. Resveratrol is a promising agent for colorectal cancer prevention and treatment: focus on molecular mechanisms. *Cancer Cell Int* 2019;19:180.
- [67] Chen Y, Wang X-Q, Zhang Q i sur. (–)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits Colorectal Cancer Stem Cells by Suppressing Wnt/ β -Catenin Pathway. *Nutrients* 2017;9:572.
- [68] Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H i sur. (–)-Epigallocatechin gallate inhibits growth and activation of the VEGF/VEGFR axis in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* 2010;185:247–52.
- [69] Pintova S, Planutis K, Planutiene M i sur. ME-143 Is Superior to Genistein in Suppression of WNT Signaling in Colon Cancer Cells. *Anticancer Res* 2017;37:1647–53.
- [70] Hou S. Genistein: Therapeutic and Preventive Effects, Mechanisms, and Clinical Application in Digestive Tract Tumor. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2022;2022:1–10.
- [71] Gallego-Jara J, Lozano-Terol G, Sola-Martínez RA i sur. A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules* 2020;25:5986.
- [72] Cech NB, Oberlies NH. From plant to cancer drug: lessons learned from the discovery of taxol. *Nat Prod Rep* 2023;40:1153–7.
- [73] Bailly C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacol Res* 2019;148:104398.

- [74] Kciuk M, Marciniak B, Kontek R. Irinotecan—Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci* 2020;21:4919.
- [75] de Lima RMT, dos Reis AC, de Menezes APM i sur. Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* 2018;32:1885–907.
- [76] AL-Ishaq RK, Overy AJ, Büsselberg D. Phytochemicals and Gastrointestinal Cancer: Cellular Mechanisms and Effects to Change Cancer Progression. *Biomolecules* 2020;10:105.
- [77] Pons DG. Roles of Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2024;25:5450.
- [78] Lee D-Y, Song M-Y, Kim E-H. Role of Oxidative Stress and Nrf2/KEAP1 Signaling in Colorectal Cancer: Mechanisms and Therapeutic Perspectives with Phytochemicals. *Antioxidants* 2021;10:743.
- [79] Chirumbolo S, Bjørklund G. PERM Hypothesis: The Fundamental Machinery Able to Elucidate the Role of Xenobiotics and Hormesis in Cell Survival and Homeostasis. *Int J Mol Sci* 2017;18:165.
- [80] Chen M, Tan A, Li J. Curcumin Represses Colorectal Cancer Cell Proliferation by Triggering Ferroptosis *via* PI3K/Akt/mTOR Signaling. *Nutr Cancer* 2023;75:726–33.
- [81] Fasano C, Disciglio V, Bertora S i sur. FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells* 2019;8.
- [82] Liu Y, Ao X, Ding W i sur. Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Mol Cancer* 2018;17:104.
- [83] Hu J, Deng F, Hu X i sur. Histone deacetylase SIRT6 regulates chemosensitivity in liver cancer cells via modulation of FOXO3 activity. *Oncol Rep* 2018.
- [84] Zhang Y, Nie L, Xu K i sur. SIRT6, a novel direct transcriptional target of FoxO3a, mediates colon cancer therapy. *Theranostics* 2019;9:2380–94.
- [85] Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2023;24:560–75.

- [86] Brockmueller A, Ruiz de Porras V, Shakibaei M. Curcumin and its anti-colorectal cancer potential: From mechanisms of action to autophagy. *Phytotherapy Research* 2024;38:3525–51.
- [87] Yin K, Lee J, Liu Z i sur. Mitophagy protein PINK1 suppresses colon tumor growth by metabolic reprogramming via p53 activation and reducing acetyl-CoA production. *Cell Death Differ* 2021;28:2421–35.
- [88] D’Onofrio N, Martino E, Mele L i sur. Colorectal Cancer Apoptosis Induced by Dietary δ -Valerobetaine Involves PINK1/Parkin Dependent-Mitophagy and SIRT3. *Int J Mol Sci* 2021;22:8117.
- [89] Pérez-Camino MC, Cert A. Quantitative Determination of Hydroxy Pentacyclic Triterpene Acids in Vegetable Oils. *J Agric Food Chem* 1999;47:1558–62.
- [90] Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 1995;49:57–68.
- [91] Sheng H, Sun H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Nat Prod Rep* 2011;28:543.
- [92] Castellano JM, Ramos-Romero S, Perona JS. Oleanolic Acid: Extraction, Characterization and Biological Activity. *Nutrients* 2022;14:623.
- [93] Xin C, Liu S, Qu H, Wang Z. The novel nanocomplexes containing deoxycholic acid-grafted chitosan and oleanolic acid displays the hepatoprotective effect against CC14-induced liver injury in vivo. *Int J Biol Macromol* 2021;185:338–49.
- [94] Feng A, Yang S, Sun Y i sur. Development and Evaluation of Oleanolic Acid Dosage Forms and Its Derivatives. *Biomed Res Int* 2020;2020.
- [95] Su L, Yang, Huang i sur. Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of oleanolic acid: design and evaluation. *Int J Nanomedicine* 2013:2917.
- [96] Shi Y, Song Q, Hu D i sur. Oleanolic acid induced autophagic cell death in hepatocellular carcinoma cells via PI3K/Akt/mTOR and ROS-dependent pathway. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 2016;20:237.

- [97] Wu J, Yang C, Guo C i sur. SZC015, a synthetic oleanolic acid derivative, induces both apoptosis and autophagy in MCF-7 breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2016;244:94–104.
- [98] Lúcio KA, Rocha G da G, Monção-Ribeiro LC i sur. Oleanolic Acid Initiates Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Reduces Metastasis of a B16F10 Melanoma Model In Vivo. *PLoS One* 2011;6:e28596.
- [99] Li X, Song Y, Zhang P i sur. Oleanolic acid inhibits cell survival and proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo through the PI3K/Akt pathway. *Tumor Biology* 2016;37:7599–613.
- [100] Wei J, Liu H, Liu M i sur. Oleanolic acid potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 2012;28:1339–45.
- [101] Gao L, Xu Z, Wang Y i sur. Anticancer effect of SZC017, a novel derivative of oleanolic acid, on human gastric cancer cells. *Oncol Rep* 2016;35:1101–8.
- [102] Li H, Wang X, Xiang S i sur. Oleanolic acid induces mitochondrial-dependent apoptosis and G0/G1 phase arrest in gallbladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther* 2015:3017.
- [103] Zhang P, Li H, Chen D i sur. Oleanolic Acid Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Caspase Activation and Poly(ADP-ribose) Polymerase Cleavage. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007;39:803–9.
- [104] Janakiram NB, Indranie C, Malisetty S V i sur. Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by Oleanolic Acid and Its Analog in Male F344 Rats and Modulation of COX-2 and Apoptosis in Human Colon HT-29 Cancer Cells. *Pharm Res* 2008;25:2151.
- [105] Hu C, Cao Y, Li P i sur. Oleanolic Acid Induces Autophagy and Apoptosis via the AMPK-mTOR Signaling Pathway in Colon Cancer. *J Oncol* 2021;2021:1–17.
- [106] Li L, Wei L, Shen A i sur. Oleanolic acid modulates multiple intracellular targets to inhibit colorectal cancer growth. *Int J Oncol* 2015;47:2247–54.
- [107] Zhang X, Hu J, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression. *Mol Med Rep* 2016;14:4489–95.

- [108] Lin C, Tseng C, Chen K i sur. Betulinic acid exerts anti-hepatitis C virus activity via the suppression of NF- κ B and MAPK-ERK1/2-mediated COX-2 expression. *Br J Pharmacol* 2015;172:4481–92.
- [109] Lingaraju MC, Pathak NN, Begum J i sur. Betulinic acid attenuates lung injury by modulation of inflammatory cytokine response in experimentally-induced polymicrobial sepsis in mice. *Cytokine* 2015;71:101–8.
- [110] Ghiulai R, Mioc A, Racoviceanu R i sur. The Anti-Melanoma Effect of Betulinic Acid Functionalized Gold Nanoparticles: A Mechanistic In Vitro Approach. *Pharmaceuticals* 2022;15:1362.
- [111] Shankar E, Zhang A, Franco D i sur. Betulinic Acid-Mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells Involves p53 and Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) Pathways. *Molecules* 2017;22:264.
- [112] Zheng Y, Liu P, Wang N i sur. Betulinic Acid Suppresses Breast Cancer Metastasis by Targeting GRP78-Mediated Glycolysis and ER Stress Apoptotic Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:1–15.
- [113] Wang S, Wang K, Zhang C i sur. Overaccumulation of p53-mediated autophagy protects against betulinic acid-induced apoptotic cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis* 2017;8:e3087–e3087.
- [114] Hsu T-I, Wang M-C, Chen S-Y i sur. Betulinic Acid Decreases Specificity Protein 1 (Sp1) Level via Increasing the Sumoylation of Sp1 to Inhibit Lung Cancer Growth. *Mol Pharmacol* 2012;82:1115–28.
- [115] Pisha E, Chai H, Lee I-S i sur. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* 1995;1:1046–51.
- [116] Luo R, Fang D, Chu P i sur. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016;84:1321–30.
- [117] Shankar E, Zhang A, Franco D i sur. Betulinic Acid-Mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells Involves p53 and Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) Pathways. *Molecules* 2017;22:264.

- [118] Pandey P, Khan F, Qari HA i sur. Rutin (Bioflavonoid) as Cell Signaling Pathway Modulator: Prospects in Treatment and Chemoprevention. *Pharmaceuticals* 2021;14:1069.
- [119] Iriti M, Kubina R, Cochis A i sur. Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. *Phytotherapy Research* 2017;31:1529–38.
- [120] Karakurt S. Modulatory effects of rutin on the expression of cytochrome P450s and antioxidant enzymes in human hepatoma cells. *Acta Pharmaceutica* 2016;66:491–502.
- [121] Paudel KR, Wadhwa R, Tew XN i sur. Rutin loaded liquid crystalline nanoparticles inhibit non-small cell lung cancer proliferation and migration in vitro. *Life Sci* 2021;276:119436.
- [122] Modanwal S, Mishra A, Mishra N. Exploration of rutin derivatives as potential inhibitors of prostate cancer signaling pathways: A comprehensive in-silico study. *Biochem Biophys Res Commun* 2025;746:151279.
- [123] Pinzaru I, Chioibas R, Marcovici I i sur. Rutin Exerts Cytotoxic and Senescence-Inducing Properties in Human Melanoma Cells. *Toxics* 2021;9:226.
- [124] Khan F, Pandey P, Jha NK i sur. Rutin Mediated Apoptotic Cell Death in Caski Cervical Cancer Cells via Notch-1 and Hes-1 Downregulation. *Life* 2021;11:761.
- [125] Zhao B, Xiong Y, Zhang Y i sur. Rutin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the GPR30-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Exp Biol Med* 2020;245:552–61.
- [126] Maher P, Hanneken A. Flavonoids Protect Retinal Ganglion Cells from Oxidative Stress–Induced Death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005;46:4796.
- [127] Şöhretoğlu D, Sari S. Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling. *Phytochemistry Reviews* 2020;19:1081–92.
- [128] Rajput A, Dominguez San Martin I, Rose R i sur. Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. *Journal of Surgical Research* 2008;147:276–81.

- [129] Huber HJ, Mistry HB. Explaining in-vitro to in-vivo efficacy correlations in oncology pre-clinical development via a semi-mechanistic mathematical model. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2024;51:169–85.
- [130] Arfin S, Jha NK, Jha SK i sur. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants* 2021;10:642.
- [131] Yuan L, Wang Y, Li N i sur. Mechanism of Action and Therapeutic Implications of Nrf2/HO-1 in Inflammatory Bowel Disease. *Antioxidants* 2024;13:1012.
- [132] Laurindo LF, de Maio MC, Minniti G i sur. Effects of Medicinal Plants and Phytochemicals in Nrf2 Pathways during Inflammatory Bowel Diseases and Related Colorectal Cancer: A Comprehensive Review. *Metabolites* 2023;13:243.
- [133] Lee D-Y, Song M-Y, Kim E-H. Role of Oxidative Stress and Nrf2/KEAP1 Signaling in Colorectal Cancer: Mechanisms and Therapeutic Perspectives with Phytochemicals. *Antioxidants* 2021;10:743.
- [134] Patra S, Pradhan B, Nayak R i sur. Apoptosis and autophagy modulating dietary phytochemicals in cancer therapeutics: Current evidences and future perspectives. *Phytotherapy Research* 2021;35:4194–214.
- [135] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009;9:400–14.
- [136] Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J i sur. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:558–72.
- [137] Zhang X, Min K-W, Wimalasena J i sur. Cyclin D1 degradation and p21 induction contribute to growth inhibition of colorectal cancer cells induced by epigallocatechin-3-gallate. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:2051–60.
- [138] Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:99–104.
- [139] Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1–AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2009;9:563–75.
- [140] Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a011189–a011189.

- [141] Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 2012;149:274–93.
- [142] Dhillon AS, Hagan S, Rath O i sur. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007;26:3279–90.
- [143] Li L, Wei L, Shen A i sur. Oleanolic acid modulates multiple intracellular targets to inhibit colorectal cancer growth. *Int J Oncol* 2015;47:2247–54.
- [144] Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer* 2017;8:682–94.
- [145] Choi J-B, Kim J-H, Lee H i sur. Reactive Oxygen Species and p53 Mediated Activation of p38 and Caspases is Critically Involved in Kaempferol Induced Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *J Agric Food Chem* 2018;66:9960–7.
- [146] Ho KK, McGuire VA, Koo CY i sur. Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287.
- [147] Cheng Z. The FoxO–Autophagy Axis in Health and Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2019;30.
- [148] Yao F, Zhang M, Chen L. 5'-Monophosphate-activated protein kinase (AMPK) improves autophagic activity in diabetes and diabetic complications. *Acta Pharm Sin B* 2016;6.
- [149] Greer EL, Oskoui PR, Banko MR i sur. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282.
- [150] Zhang X, Tang N, Hadden TJ i sur. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2011;1813.
- [151] Gómez-Puerto MC, Verhagen LP, Braat AK i sur. Activation of autophagy by FOXO3 regulates redox homeostasis during osteogenic differentiation. *Autophagy* 2016;12:1804–16.
- [152] Wang X, Hu S, Liu L. Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically? *Oncol Lett* 2017;13:2867–72.

- [153] Zhang Y, Nie L, Xu K i sur. SIRT6, a novel direct transcriptional target of FoxO3a, mediates colon cancer therapy. *Theranostics* 2019;9:2380–94.
- [154] Chang H, Zou Z. Targeting autophagy to overcome drug resistance: further developments. *J Hematol Oncol* 2020;13.
- [155] Folkerts H, Hilgendorf S, Vellenga E i sur. The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment. *Med Res Rev* 2019;39.
- [156] Li S, Zhang J, Liu C i sur. The Role of Mitophagy in Regulating Cell Death. *Oxid Med Cell Longev* 2021;2021.
- [157] Paglin S, Hollister T, Delohery T i sur. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001;61.
- [158] Xu Z, Han X, Ou D i sur. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104.
- [159] Kinsey CG, Camolotto SA, Boespflug AM i sur. Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nat Med* 2019;25.
- [160] Shen T, Miao Y, Ding C i sur. Activation of the p38/MAPK pathway regulates autophagy in response to the CYPOR-dependent oxidative stress induced by zearalenone in porcine intestinal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology* 2019;131.
- [161] Mammucari C, Milan G, Romanello V i sur. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metab* 2007;6.
- [162] Su CJ, Shen Z, Cui RX i sur. Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) Regulates Parkin/PINK1-mediated Mitophagy in Dopaminergic Neurons Under High-glucose Conditions: Implications for Molecular Links Between Parkinson's Disease and Diabetes. *Neurosci Bull* 2020;36.
- [163] Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol* 2018;20.
- [164] Geisler S, Holmström KM, Skujat D i sur. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010;12.

- [165] Ding WX, Yin XM. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* 2012;393.
- [166] Lu Y, Fujioka H, Joshi D i sur. Mitophagy is required for brown adipose tissue mitochondrial homeostasis during cold challenge. *Sci Rep* 2018;8.
- [167] Qiao H, Ren H, Du H i sur. Liraglutide repairs the infarcted heart: The role of the SIRT1/Parkin/mitophagy pathway. *Mol Med Rep* 2018;17.
- [168] Hou Y, Tang Y, Wang X i sur. *Rhodiola Crenulata* ameliorates exhaustive exercise-induced fatigue in mice by suppressing mitophagy in skeletal muscle. *Exp Ther Med* 2020.
- [169] Thein W, Po WW, Choi WS i sur. Autophagy and digestive disorders: Advances in understanding and therapeutic approaches. *Biomol Ther (Seoul)* 2021;29.
- [170] Castrejón-Jiménez NS, Leyva-Paredes K, Baltierra-Uribe SL i sur. Ursolic and oleanolic acids induce mitophagy in a549 human lung cancer cells. *Molecules* 2019;24.
- [171] Warr MR, Binnewies M, Flach J i sur. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* 2013;494.
- [172] Salcher S, Hermann M, Kiechl-Kohlendorfer U i sur. C10ORF10/DEPP-mediated ROS accumulation is a critical modulator of FOXO3-induced autophagy. *Mol Cancer* 2017;16.
- [173] Oda E, Ohki R, Murasawa H i sur. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (1979)* 2000;288.
- [174] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9.
- [175] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A i sur. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8.
- [176] Yurasakpong L, Nantasenamat C, Nobsathian S i sur. Betulinic acid modulates the expression of hspa and activates apoptosis in two cell lines of human colorectal cancer. *Molecules* 2021;26.
- [177] Fulda S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *Int J Mol Sci* 2008;9.

- [178] Zeng A, Hua H, Liu L, Zhao J. Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Bioorg Med Chem* 2019;27:2546–52.
- [179] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 2007;129:1261–74.
- [180] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489–501.
- [181] Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal* 2010;429.
- [182] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H i sur. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012;8.
- [183] Fiorentino F, Carafa V, Favale G i sur. The Two-Faced Role of SIRT6 in Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13:1156.
- [184] White E. The role for autophagy in cancer. *Journal of Clinical Investigation* 2015;125:42–6.
- [185] Blondy S, David V, Verdier M i sur. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Sci* 2020;111.
- [186] Kurasaka C, Ogino Y, Sato A. Molecular mechanisms and tumor biological aspects of 5-fluorouracil resistance in hct116 human colorectal cancer cells. *Int J Mol Sci* 2021;22.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Stadiji razvoja raka debelog i završnog crijeva	4
Slika 2. Terapija u liječenju raka debelog i završnog crijeva	14
Slika 3. Klasifikacija fitokemikalija.....	17
Slika 4. Kemijska struktura oleanolične kiseline	25
Slika 5. Kemijska struktura betulinske kiseline	26
Slika 6. Kemijska struktura rutina.....	28
Slika 7. Učinak oleanolične kiseline na vijabilnost HCT116 stanica u ovisnosti o dozi nakon 72 sata. Za XTT test vijabilnosti, stanice su uzgajane u mediju s 10% FBS i tretirane oleanoličnom kiselinom tijekom 72 sata.....	40
Slika 8. Ekspresija antioksidacijskih te pro- i anti-apoptotskih proteina u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana oleanoličnom kiselinom (OA).....	41
Slika 9. Reprezentativne mikrofotografije s akridin narančastim/propidij jodidom za detekciju smrti HCT116 stanica nakon 72 sata tretmana oleanoličnom kiselinom (OA).....	42
Slika 10. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije proteina LC3B, biljega uključenog u formiranje autofagosoma i autolizosoma	43
Slika 11. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije proteina ATG5, biljega uključenog u formiranje autofagosoma i autolizosoma.. ..	43
Slika 12. Ekspresija autofagičnih i mitofagičnih proteina u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana oleanoličnom kiselinom (OA).	44
Slika 13. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije LC3B i TOMM20.	45
Slika 14. Reprezentativne mikrofotografije akridin narančastog za detekciju autofagije u kontrolnim stanicama i stanicama tretiranim oleanoličnom kiselinom (OA) tijekom 72 sata..	45
Slika 15. Učinak 3-metiladenina (3-MA) na održivost HCT116 stanica tretiranih oleanoličnom kiselinom (OA).....	46
Slika 16. Ekspresija ključnih signalnih molekula u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana oleanoličnom kiselinom (OA).	48
Slika 17. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije FOXO3a. tretiranih oleanoličnom kiselinom (OA) nakon 72 sata.	49
Slika 18. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije fosforiliranog FOXO3a	50
Slika 19. Reprezentativni imunoblotovi ekspresije FOXO3a i Sirt6 (A).....	51

Slika 20. Učinak oleanolične kiseline (OA) na vijabilnost HCT116 stanica tretiranih 5-fluorouracilom (5-FU).....	52
Slika 21. Učinak betulinske kiseline na vijabilnost HCT116 stanica u ovisnosti o dozi nakon 72 sata.....	53
Slika 22. Ekspresija antioksidativnih te pro- i anti-apoptotskih proteina u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana betulinskom kiselinom (BA).	54
Slika 23. Reprezentativne mikrofotografije za detekciju apoptotske stanične smrti pomoću imunofluorescentnog TUNEL testa.....	55
Slika 24. Ekspresija autofagičnih i mitofagičnih proteina u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana betulinskom kiselinom (BA).	56
Slika 25. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije proteina LC3B, biljega uključenog u formiranje autofagosoma i autolizosoma	57
Slika 26. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije LC3B i TOMM20..	58
Slika 27. Učinak 3-metiladenina (3-MA) na održivost HCT116 stanica tretiranih betulinskom kiselinom (BA).	59
Slika 28. Ekspresija ključnih signalnih molekula u lizatima HCT116 stanica 72 sata nakon tretmana betulinskom kiselinom (BA).	60
Slika 29. Reprezentativne mikrofotografije ekspresije i stanične lokalizacije FOXO3a.	61
Slika 30. Učinak betulinske kiseline (BA) na održivost HCT116 stanica tretiranih 5-fluorouracilom (5-FU).....	62
Slika 31. Učinak rutina na vijabilnost HCT116 stanica u ovisnosti o dozi nakon 72 sata.....	63

ŽIVOTOPIS

EUROPEAN CURRICULUM VITAE FORMAT



OSOBNOSTI

Ime	Lidija Šimić Ševerdija
Adresa	Maršala Tita 107, Raša
OIB	74925849441
Mobilni telefon	+385919479396
E-pošta	simiclidija23@gmail.com lidija.simic@uniri.hr
Nacionalnost	Hrvatica
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	20.02.1991.

RADNO ISKUSTVO

Datum (od – do)	Od 26.04.2021.
Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja	Objedinjeni hitni bolnički prijem Šušak Klinički Bolnički Centar Rijeka
Vrsta posla ili područje	Stručni suradnik u laboratoriju za brzu molekularnu dijagnostiku
Zanimanje i položaj koji obnaša	Stručni suradnik u laboratoriju
Osnovne aktivnosti i odgovornosti	Provođenje molekularnih metoda, organizacija radnih zadataka, planiranje i izvedba projekata

Datum (od – do)	Od 10.04.2018 do 19.03.2021.
Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja	Zavod za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, Rijeka
Vrsta posla ili područje	Suradnik (zamjena za porodiljni), znanstveno područje biomedicina i zdravstvo, znanstveno polje temeljne medicinske znanosti, znanstvena grana medicinska biokemija
Zanimanje i položaj koji obnaša	Asistent (zamjena za porodiljni)
Osnovne aktivnosti i odgovornosti	Organizacija i izvođenje nastave (seminari, vježbe, ispiti) te znanstveni rad

Datum (od – do)	Od 06.12.2017 do 31.01.2018.
Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja	Tvrtka „Dermostetik d.o.o.“, Umag, Hrvatska
Vrsta posla ili područje	Inženjer u proizvodnji
Zanimanje i položaj koji obnaša	Sanitarni inženjer
Osnovne aktivnosti i odgovornosti	Obavljala poslove vezane za prijavu proizvoda u sustav CPNP-a, kontrola deklaracija, sudjelovanje u organizaciji proizvodnje i provedbe sustava GMP-a, te slični administrativni poslovi

Datum (od – do)	Od 28.11.2016. do 28.11.2017.
Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja	Zavod za javno zdravstvo Istarske županije (Pula, Hrvatska)
Vrsta posla ili područje	Pripravnik na stručnom osposobljavanju bez zasnivanja radnog odnosa
Zanimanje i položaj koji obnaša	Sanitarni inženjer

Datum (od – do)	Od siječnja 2010. do rujna 2010.
Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja	Dom za starije i nemoćne, Raša, Hrvatska
Vrsta posla ili područje	njevodatelj
Zanimanje i položaj koji obnaša	njevodatelj
Osnovne aktivnosti i odgovornosti	Obavljala poslove njege i brige o starijim i nemoćnim osobama nakon završene srednje medicinske škole

OBRAZOVANJE

Datum (od – do)	Svibanj, 2020. – do 2025.
Naziv i vrsta obrazovne ustanove	Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Osnovni predmet /zanimanje	Doktorska škola – smjer Biomedicina
Tema:	„Savladavanje rezistencije antitumorskih lijekova u stanicama kolorektalnog karcinoma prirodnim antitumorskim spojevima“

Datum (od – do)	Listopad, 2014. – Srpanj, 2016.
Naziv i vrsta obrazovne ustanove	Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Osnovni predmet /zanimanje	Diplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo
Naslov postignut obrazovanjem	Magistra sanitarnog inženjerstva, <i>mag. sanit. ing.</i>

Datum (od – do)	Listopad, 2010. – Rujan, 2014.
Naziv i vrsta obrazovne ustanove	Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Osnovni predmet /zanimanje	Prediplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo
Naslov postignut obrazovanjem	Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) sanitarnog inženjerstva, <i>univ. bacc. sanit. ing</i>

Datum (od – do)	Rujan, 2005. – Lipanj, 2009.
Naziv i vrsta obrazovne ustanove	Srednja medicinska škola, Pula
Osnovni predmet /zanimanje	Opći smjer medicinska sestra/medicinski tehničar
Naslov postignut obrazovanjem	Medicinska sestra/Medicinski tehničar

Ostalo	Položen stručni ispit nakon uspješno završenog pripravničkog staža propisanog za magistre sanitarnog inženjerstva u Zagrebu, Ministarstvo zdravstva, dana 18.prosinca 2018. čime sam stekla Odobrenje za samostalan rad (licenca)
--------	---

HRVATSKI

• sposobnost čitanja	Izvršno
• sposobnost pisanja	Izvršno
• sposobnost usmenog izražavanja	Izvršno

ENGLESKI

• sposobnost čitanja	Izvršno
• sposobnost pisanja	Izvršno
• sposobnost usmenog izražavanja	Izvršno

SOCIJALNE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Komunikativna sam osoba, sposobna za timski rad te sam voljna učiti i stjecati nova iskustva.

Nastavna djelatnost

Vježbe, seminari, ispiti, obvezni kolegij "Biokemija II", Studij Medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci;
 Vježbe, obavezni kolegij „Biochemistry II“, Studij Medicine na engleskom jeziku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
 Vježbe, obavezni kolegij „Medicinska kemija i biokemija I“; Studij Medicine, Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci
 Vježbe, seminari, ispiti, obvezni kolegij "Biokemija", Preddiplomski studij Sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.
 Vježbe, obvezni kolegij "Biokemija", Studij Dentalne medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.
 Vježbe, ispiti, obvezni kolegij "Laboratorijska dijagnostika", Studij Radiološka tehnologija, Fakultet zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci.
 Vježbe, ispiti, obavezni kolegij „Napredna primjena računala u ekosustavima“, Diplomski studij Sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Članstva u komorama i društvima

Član Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju od 2020. godine

Član Hrvatske komore zdravstvenih radnika: Strukovni razred za djelatnost sanitarnog inženjerstva

ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Sposobna sam za organizaciju i raspodjelu zadataka između više osoba u određenom poslu.

TEHNIČKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Vrlo dobro poznavanje osnovnog rada na računalu (Windows, Linux) te Microsoft office paketa (Word, Excell, PowerPoint), Photoshopa, Statistica, ImageJ te programa za pristup internetu.

Iskustvo rada u imunohistokemijskim analizama, imunofluorescenciji te western blot analizama.

Rad sa staničnim kulturama, uzgoj stanica, bojanja, ostale analize staničnih kultura.

Iskustvo rada na kromatografskim analizama tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti

DODATNE OBAVIJESTI

Sudjelovanje na projektu: Interakcija lijekova i fitokemikalija *in vitro* i *in vivo*: uloga FOXO signalnog puta (uniri-biomed-18-30), voditelj projekta: Prof.dr.sc. Robert Domitrović

Popis objavljenih radova:

“Impact of Point-of-Care Laboratory Diagnostics on Emergency Department Processing Times During the COVID-19 Pandemic“ Dunja Kureljak, Lidija Šimić Ševerdija, Mia Krapić, Iva Marinović, Mate Lerga, Vanda Juranić Lisnić, Martina Pavletić, Medicina fluminensis (2024)

„The interplay of mitophagy, autophagy, and apoptosis in cisplatin-induced kidney injury: involvement of ERK signaling pathway.“ Iva Suman, Lidija Šimić, Gordana Čanadi Jurešić, Sunčica Buljević, Damir Klepac, Robert Domitrović. Cell Death Discov. (2024) I.F.=6,1

„Sinomenine mitigates cisplatin-induced kidney injury by targeting multiple signaling pathways.“; Iva Potočnjak, Lidija Šimić, Lara Batičić,, Hrvoje Križan, Robert Domitrović, Food and Chemical Toxicology (2023) I.F.= 5.572

„Oleanolic acid induces HCT116 colon cancer cell death through the p38/FOXO3a/Sirt6 pathway“; Iva Potočnjak, Lidija Šimić, Iva Vukelić, Lara Batičić, Robert Domitrović, Chemico Biological Interactions (2022) I.F.=5.168

“Oleanolic acid attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice and chemosensitizes human cervical cancer cells to cisplatin cytotoxicity” Iva Potočnjak, Lidija Šimić, Iva Vukelić, Robert Domitrović, Food and Chemical toxicology (2019) I.F. = 3,775

„Aucubin administered by either oral or parental route protects against cisplatin-induced acute kidney injury in mice“ Iva Potočnja, Jelena Marinić, Lara Batičić, Lidija Šimić, Dalibor Broznić, Robert Domitrović, Food and Chemical toxicology (2020) I.F. = 3,390

„Antitumor activity of luteolin in human colon cancer SW620 cells is mediated by the ERK/FOXO3a signaling pathway“ Iva Potočnjak, Lidija Šimić, Ivana Gobin, Iva Vukelić, Robert Domitrović, Toxicology in Vitro (2020) I.F. = 3,170

Sudjelovanja na kongresima:

FEBS3+ Meeting: Exploring Molecular Frontiers sa međunarodnim sudjelovanjem, 2024, Pula, Hrvatska Lidija „Anticancer effects of betulinic acid on hct116 colorectal cancer cells: role of oxidative stress, autophagy, and signaling pathways“ Lidija Šimić Ševerdija, Iva Suman, Lara Batičić, Robert Domitrović, poster prezentacija

IUBMB–FEBS–PABMB congress “The Biochemistry Global Summit” sa međunarodnim sudjelovanjem, 2022, Lisbon, Portugal, „Oleanolic acid induces cytoprotective mitophagy in HCT116 human colon carcinoma cells“, Lidija Šimić, Iva Potočnjak, Iva Vukelić, Lara Batičić, Robert Domitrović, poster prezentacija

IUBMB–FEBS–PABMB Young Scientists' Forum sa međunarodnim sudjelovanjem, 2022, Vimeiro, Portugal, „Oleanolic acid induces cytoprotective mitophagy in HCT116 human colon carcinoma cells“, Lidija Šimić, Iva Potočnjak, Iva Vukelić, Lara Batičić, Robert Domitrović, poster prezentacija

6th Croatian Congress of Toxicology sa međunarodnim sudjelovanjem, 2021, Rabac, Croatia, “Antitumour activity of luteolin in human colon cancer SW620 cells is mediated by the ERK/FOXO3a signaling pathway”, Lidija Šimić, Iva Potočnjak, Ivana Gobin, Iva Vukelić, Robert Domitrović, poster prezentacija

AARC DOCTORAL CONFERENCE Innovative Technologies in Biomedicine, 2019., Rijeka, Croatia, „Luteolin exhibits cytotoxicity in human colorectal carcinoma SW620 cells through activation of MAPK and FOXO3a pathways“, Lidija Šimić, Iva Potočnjak, Iva Vukelić, Ivana Gobin, Robert Domitrović*, poster i usmena prezentacija

1. Studenski kongres zaštite zdravlja – Sanitas 2018 s međunarodnim sudjelovanjem, Rijeka, 13. i 14. travnja 2018., Hrvatska; „Utjecaj karaktera humusa na sorpcijsko ponašanje dimetoata u tlima istarskih maslinika“, Lidija Šimić, Dalibor Broznić, usmena prezentacija