

# Značaj polifenola u prevenciji raka

---

Ivanović, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:223383>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju  
Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Jelena Ivanović

**ZNAČAJ POLIFENOLA U  
PREVENCIJI RAKA**

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Ana Amić

Osijek, 2024.

Naziv sveučilišta: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Naziv studija: Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Biokemija i medicinska kemija

## ZNAČAJ POLIFENOLA U PREVENCIJI RAKA

JELENA IVANOVIĆ

Rad je izrađen na: Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

Mentor: Doc. dr. sc. Ana Amić

**Sažetak:** Polifenoli su izuzetno velika i raznovrsna skupina bioaktivnih spojeva prisutnih u biljkama, poznati po antioksidacijskim svojstvima. Nalaze se u voću, povrću, čaju, crnom vinu i drugim prehrambenim proizvodima. Značaj polifenola u prevenciji raka proizlazi iz njihove sposobnosti da neutraliziraju slobodne radikale, štiteći organizam od oksidacijskog stresa koji može dovesti do nastanka raka. Dokazana je njihova učinkovitost u inhibiranju proliferacije stanica raka, aktiviranja apoptoze i sprječavanju metastaza. Neki polifenoli su se posebno istaknuli po svojim antikancerogenim svojstvima, poput resveratrola iz grožđa i epigalokatehin-3-galata iz zelenog čaja. Međutim, još uvijek se provode istraživanja koja će u potpunosti objasniti mehanizme djelovanja polifenola na stanice raka te time omogućiti učinkovitu primjenu polifenola u samom liječenju raka.

**Ključne riječi:** polifenoli, bioaktivnost, biorasplošivost, signalni putevi, antikancerogeno djelovanje.

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Završni rad obuhvaća:** 57 stranica, 14 slika, 115 literaturnih navoda i 1 prilog

**Rad prihvaćen:** 17. 9. 2024.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:**

- izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić, predsjednica
- doc. dr. sc. Ana Amić, mentorica i članica
- doc. dr. sc. Mateja Budetić, članica
- prof. dr. sc. Igor Đerđ, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek

Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

---

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Undergraduate study programme in Chemistry**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific branch:** Biochemistry and medicinal chemistry

## **SIGNIFICANCE OF POLYPHENOLS FOR CANCER PREVENTION**

**JELENA IVANOVIĆ**

**The paper was created on:** Department of Chemistry

**Supervisor:** Assist. Prof. Ana Amić, PhD

**Abstract:** Polyphenols are a group of natural bioactive compounds, known for their antioxidative properties. They are present in fruits, vegetables, tea, red wine and other foods. The significance of polyphenols in cancer prevention stems from their ability to neutralize free radicals, protecting organisms from oxidative stress that can lead to cancer. Their function in inhibition of cancer cell proliferation, apoptosis activation and metastasis prevention has been proven. Some polyphenols have better anticarcinogenic properties than other, such as resveratrol from grapes and epigallocatechin-3-gallate from green tea. However, studies underlying mechanisms of polyphenol activity towards cancer cells are still being conducted and will hopefully enable efficient implementation of polyphenols in cancer treatment.

**Keyword:** *polyphenols, bioactivity, bioavailability, signaling pathways, anticarcinogenic properties.*

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 57 pages, 14 figures, 115 references and 1 attachment

**Thesis accepted:** 17. 9. 2024.

**Reviewers:**

1. Assoc. Prof. Mirela Samardžić, PhD, chair
2. Assist. Prof. Ana Amić, PhD, supervisor and member
3. Assist. Prof. Mateja Budetić, PhD, member
4. Full Prof. Igor Đerđ, PhD, substitute member

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	2
2.1. Kratki pregled podjele, biosinteze i izvora polifenola .....	2
2.2. Biološka aktivnost polifenola .....	8
2.2.1. Antioksidacijska aktivnost polifenola .....	8
2.2.1.1. Kratki pregled odabranih mehanizama antioksidacijske aktivnosti .....	11
2.2.2. Protuupalna aktivnost polifenola .....	13
2.3. Rak .....	16
2.4. Antikancerogeni učinak polifenola .....	17
2.4.1. Antikancerogeni učinak kvercetina .....	18
2.4.2. Antikancerogeni učinak epigalokatehin-3-galata .....	22
2.4.3. Antikancerogeni učinak kurkumina .....	25
2.4.4. Antikancerogeni učinak ružmarinske kiseline .....	29
2.5. Učinci polifenola na odabrane signalne puteve .....	31
2.5.1. Učinak polifenola na signalni put p53 .....	31
2.5.2. Učinak polifenola na protein-kinazu aktiviranu mitogenom .....	34
2.5.3. Učinak polifenola na NF- $\kappa$ B signalni put .....	37
2.5.4. Učinak polifenola na PI3K/Akt/mTOR signalni put .....	39
2.6. Nedostatci primjene polifenola u prevenciji raka .....	41
3. ZAKLJUČAK .....	43
4. POPIS LITERATURE .....	44
5. PRILOG .....	54
5.1. Popis kratica .....	54

# 1. UVOD

Rak ostaje jedan od glavnih uzroka smrti u svijetu, unatoč brojnim ulaganjima u istraživanja koja se bave ovom tematikom i pripremom novih lijekova. Dio ovih istraživanja ima za cilj razvoj preventivnih metoda koje bi mogle ukloniti ili smanjiti nastanak raka. Jedna od često istraživanih skupina prirodnih spojeva u ovakvim istraživanjima su polifenoli, koji su pokazali značajnu antikancerogenu aktivnost [1].

Polifenoli su najpoznatija te izuzetno brojna i raznolika skupina bioaktivnih spojeva prisutnih u biljkama, koja se u organizam unosi putem hrane. Značajni su po širokom spektru bioloških aktivnosti i učinaka. Do danas je identificirano oko 8000 polifenolnih spojeva, a ugrubo se mogu podijeliti u dvije skupine: flavonoidi i neflavonoidi. Flavonoidni spojevi su građeni od 3 aromatska prstena i razlikuju se prema broju i položaju hidroksilne skupine na njima, stoga postoji i nekoliko podskupina flavonoida. Neflavonoidi su građeni od jednog aromatskog prstena te se dijele na stilbene, lignane i fenolne kiseline [2].

Jedna od najviše istraživanih i možda najznačajnijih aktivnosti polifenola, zbog koje mogu imati važnu ulogu u organizmu, je antioksidacijska aktivnost. Budući da su snažni antioksidansi, polifenoli mogu smanjiti količinu i ublažiti štetan učinak slobodnih radikala, poput reaktivnih kisikovih vrsta, ROS (engl. *reactive oxygen species*), čime ublažavaju oksidacijski stres koji je povezan s nastankom raznih bolesti, primjerice raka [3].

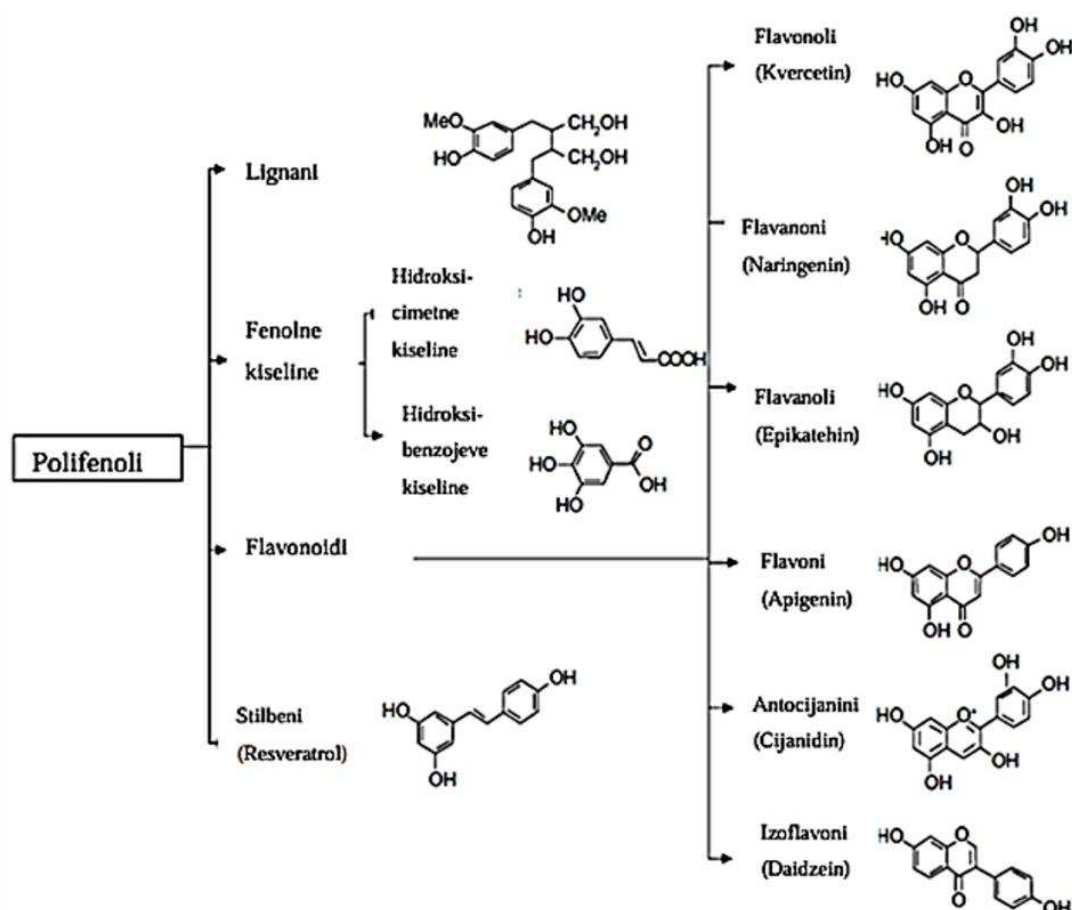
Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja utvrdila su utjecaj polifenola na signalne puteve odgovorne za rast i razvoj stanica raka, primjerice p53 signalni put, protein-kinaza aktivirana mitogenom, MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*), nuklearni faktor kappa B, NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa B*), put i PI3K/Akt/mTOR (engl. *phosphatidylinositide 3-kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin*) kaskadu puteva. Nadalje, utvrđeno je da pojedini polifenoli mogu poboljšati učinkovitosti konvencionalne kemoterapije uz istovremeno smanjenjivanje nuspojava. Međutim, polifenoli imaju i određene nedostatke koji značajno smanjuju njihovu mogućnost primjene, kao što je njihova slaba bioraspoloživost [4].

Cilj ovog rada je istražiti važnost polifenola u prevenciji nastanka raka, a naglasak je na ispitivanju molekularnih mehanizama koji čine osnovu njihovog antikancerogenog učinka. Ovaj rad daje pregled osnovnih informacija o podjeli, izvorima i ulozi polifenola u reguliranju glavnih staničnih procesa uključenih u kancerogenezu. Dan je kratak prikaz glavnih podataka o raku i liječenju raka, a fokus je stavljen na antioksidacijski, protuupalni i antikancerogeni učinak odabranih polifenola.

## 2. LITERATURNI PREGLED

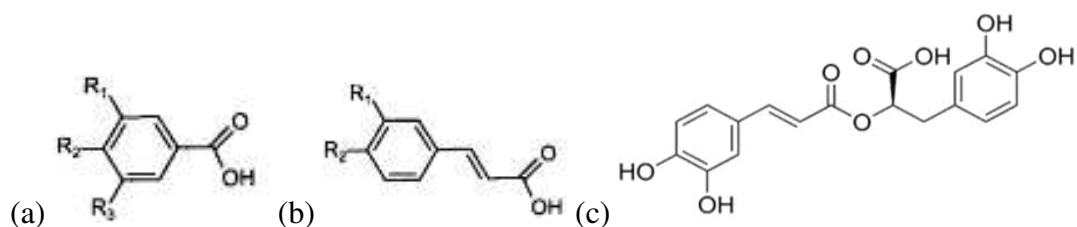
### 2.1. Kratki pregled podjele, biosinteze i izvora polifenola

Polifenoli su skupina bioaktivnih spojeva koji se sintetiziraju isključivo u biljkama. Većina biljaka sadrži barem neki polifenolni spoj, što jasno ukazuje na veliki broj vrsta i podvrsta polifenolnih spojeva. Građeni su od najmanje dva ili više fenilnih prstenova s najmanje jednom hidroksilnom skupinom, a mogu se jednostavno podijeliti na flavonoide i neflavonoide te još na manje podgrupe (ovisno o broju fenilolnih jedinica, funkcionalnim skupinama i tipu veze između tih skupina) (Slika 1.). Strukturna raznolikost flavonoidnih spojeva rezultira velikom brojnošću polifenola. U flavonoide se ubrajaju flavoni, flavonoili, izoflavoni, flavanoni, antocijanini i flavanoli. U neflavonoidne spojeve se ubrajaju fenolne kiseline, stilbeni i lignani, a oni se razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina [2].



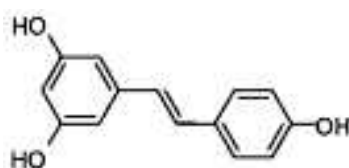
Slika 1. Jedna od klasifikacija polifenolnih spojeva [5]

Fenolne kiseline se dijele na derivate hidroksibenzojeve kiseline (Slika 2. (a)) i derivate cimetne kiseline (Slika 2. (b)). Najznačajniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su galna i elaginska kiselina, a fenolnim kiselinama pripada i ružmarinska kiselina (Slika 2. (c)) [6]. Koncentracija hidroksibenzojeve kiseline u hrani je jako niska, osim u nekim vrstama crvenog voća, luku i rotkvi, u kojima koncentracija ovog spoja može iznositi nekoliko desetaka miligrama po kilogramu. Hidroksicimetne kiseline mogu se naći u svim dijelovima voća, a najveće koncentracije nalaze se u vanjskim dijelovima zrelog ploda. Kako plod raste, tako se povećava sadržaj ovih spojeva, s tim da se koncentracije tijekom samog zrenja (nakon što je plod dosegao finalnu veličinu) smanjuju. Kavena kiselina, bilo u slobodnom ili esterificiranom obliku, količinski je najzastupljenija fenolna kiselina i čini oko 75-100 % ukupnih hidroksicimetnih kiselina većine voća [7].



**Slika 2.** *Kemijska struktura: (a) hidroksibenzojeve [7], (b) cimetne [7] i (c) ružmarinske kiseline [8]*

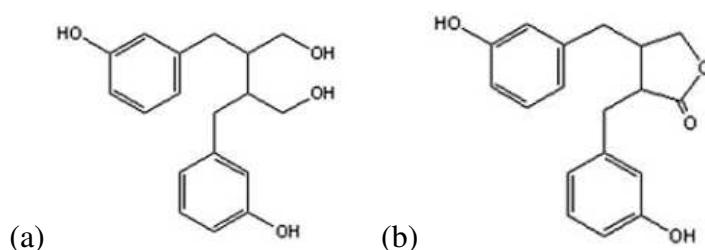
Stilbeni sadrže dva fenilna dijela povezana s dvije metilenske skupine [2], a u organizam se unose hranom, samo u jako malim količinama. Resveratrol, jedan od najpoznatijih stilbena, posjeduje antikancerogena svojstva zbog čega je predmet brojnih istraživanja (Slika 3.). U crnom vinu je detektiran u jako malim količinama, 0,3-7 mg aglikona/L i 15 mg glikozida/L. Zbog male količine koja se unosi u organizam putem hrane, smatra se da ne posjeduje veliki zaštitni učinak pri normalnoj prehrani (bez dodatne suplementacije) [7].



**Slika 3.** *Kemijska struktura resveratrola [7]*

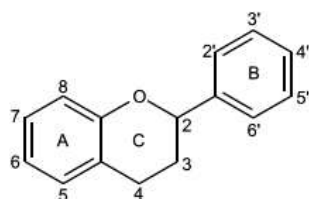


Lignani su spojevi koji su građeni od dvije propilbenzenske jedinice povezane tako da čine dimernu strukturu, a nalaze se u žitaricama, lanenom sjemenu, sezamu i kupusu. Laneno sjeme je najbogatiji izvor lignana, on sadrži sekoizolariciresinol i male količine matairezina. I žitarice, sezam i kupus sadrže iste lignane, ali koncentracije u lanenom sjemenu su 1000 puta veće od koncentracija u drugoj hrani [7]. Lignani se metabolički transformiraju u enterodiole (Slika 4. (a)) i enterolaktone (Slika 4. (b)), koji djeluju slično estrogenu te se klasificiraju kao fitoestrogeni [7].



**Slika 4.** Kemijska struktura: (a) enterodiola i (b) enterolaktona [9]

Flavonoidi su glavna skupina sekundarnih biljnih metabolita, građeni su od tri aromatska prstena, od kojih su dva benzenska (A i B) i jedan piranski prsten (C) (Slika 5.). Najčešći supstituenti su hidroksilne skupine, osim kojih na prsten mogu biti vezane i druge funkcionalne skupine. Dije se na razne podgrupe ovisno o funkcionalnim skupinama, stupnju nezićenosti, oksidaciji C prstena i dr. [6].

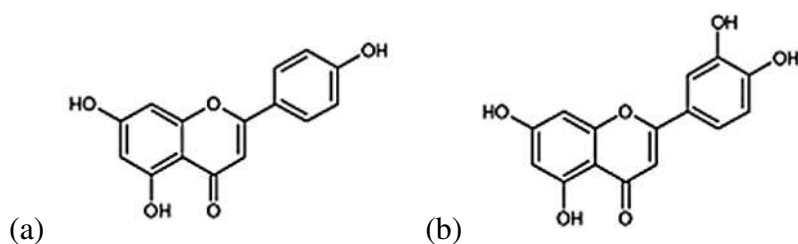


**Slika 5.** Osnovna struktura flavonoida [10]

Flavoni se sastoje od dva benzenska prstena povezana heterocikličkim piranskim prstenom. Glavni flavoni u hrani su luteolin (Slika 6. (a)) i apigenin (Slika 6. (b)). Adriouch i sur. (2018) pokušali su odrediti vezu između unosa polifenola, a time i flavona, i promjena u antropometrijskim mjerama (masa, indeks tjelesne mase (BMI, engl. *Body Mass Index*), opseg struka) u populaciji srednje dobi. Istraživanje se provodilo 7,5 godina i u njemu je sudjelovalo

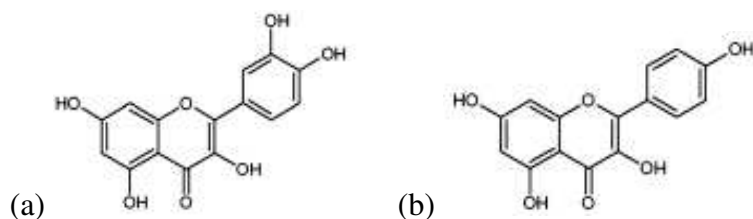
ukupno 13 017 ispitanika, od toga 7876 žena starosti 35-60 godina i 5141 muškarac, 45-60 godina. Pratili su unos 264 spoja (mg/dan, ukupni polifenoli i pojedine skupine), BMI i omjer struka. Sudionici su ispunjavali upitnike, a antropometrijska mjerenja odrađena su na početku i na kraju istraživanja. Utvrdili su da unos polifenola doprinosi smanjenu rizika od dijabetesa i pretilosti (smanjenje svih parametara), odnosno pokazali su se dobrim antiobesogenima. Ispitanici s najvećim unosom flavona imali su bolje rezultate: manji rast BMI i smanjeno povećanje omjera struka, u usporedbi s ispitanicima koji su unosili najniže količine ovih spojeva. Povećan unos i ostalih polifenola povoljno je djelovao na promatrane antropometrijske mjere te su i kod žena i kod muškaraca utvrđeni slični rezultati (smanjenje mase tijela pri uzimanju najveće koncentracije ispitanih spojeva) [11].

Flavoni su slabo zastupljeni u bilju te se mogu pronaći u malo većim količinama u peršinu i celeru. Najčešće se nalaze u biljkama jakog okusa, a također se mogu pronaći u čaju od rooibosa i kamilice. Najveće količine flavona se unesu putem sušenog i svježeg peršina, celera, feferona i zelene salate [6].



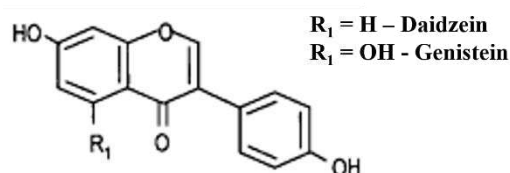
**Slika 6.** Kemijska struktura: (a) apigenina i (b) luteolina [12]

Flavonoli se smatraju najzastupljenijim flavonoidima zbog velike rasprostranjenosti i zastupljenosti u raznom voću i povrću [6]. Flavonole se može opisati kao flavonoide s ketonskom skupinom [12]. Najvažniji spojevi koji se ubrajaju u flavonole su kvercetin (Slika 7. (a)), kamferol (Slika 7. (b)) i miricetin. Mogu se pronaći u bijelom i crvenom luku, rajčicama, jabukama, bobičastom voću i čaju. Najveći unos flavonola u organizam omogućavaju čaj i luk [6].



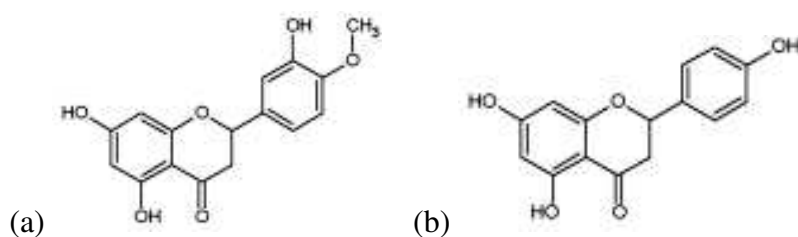
**Slika 7.** Kemijska struktura: (a) kvercetina i (b) kamferola [12]

Izoflavoni (Slika 8.), poput flavona, su slabo zastupljeni u biljkama, a najčešće se mogu naći u voću, soji i sojinim proizvodima. Međutim, sojine prerađevine, poput sojinog mlijeka, sadrže manje količine izoflavona od same soje [6]. Glavni predstavnici ove skupine spojeva su genistein i daidzein koji imaju učinak sličan estrogenu, zbog čega se smatraju fitoestrogenima [13].



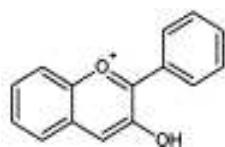
**Slika 8.** Kemijska struktura daidzeina i genisteina [7]

Flavanoni se nalaze u citrusnom voću, npr. hesperetin (Slika 9. (a)) u naranči i naringenin (Slika 9. (b)) u grejpfrutu, te su dijelom odgovorni za specifičan okus pojedinih vrsta citrusa. Najveće količine ove skupine polifenola unose se putem ovog voća i voćnih sokova, uglavnom putem unosa soka od naranče, limunovog soka ili samih citrusnih voćki. Osim u citrusima, mogu se pronaći i u rajčici, krumpiru te začinima poput ružmarina i mente [6]. Naringenin, aglikon naringina, jedan je od najproučavanijih flavonona i pokazuje protuupalna svojstva, smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti i oksidacijskog stresa [12].



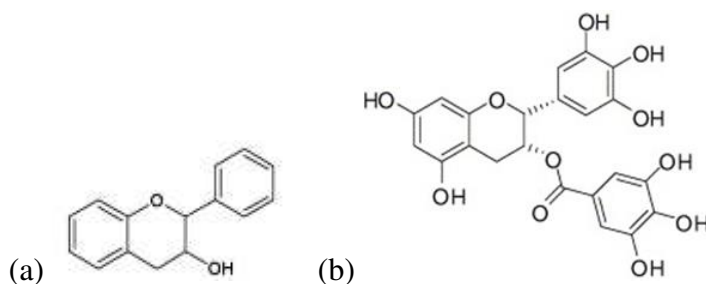
**Slika 9.** Kemijska struktura: (a) hesperetina i (b) naringenina [12]

Antocijanini (Slika 10.) su pigmenti odgovorni za većinu boja biljnog svijeta (cvijet, list i plod), koje se kreću u rasponu od crveno-narančaste do plavo-ljubičaste [12]. Biljke koje sadrže znatne količine antocijanina su bazga, crni ribiz, borovnica, jagoda, trešnja, malina i patlidžan, pa se putem njih ovi spojevi unose u organizam [6].



**Slika 10.** Kemijska struktura antocijanina [13]

Flavanoli su spojevi složenije strukture koji mogu formirati monomere, modificirane monomere (npr. epikatehini), dimere (npr. galo- i epigalokatehini) i polimere. Velike količine flavanola nalaze se u crnom čaju, čokoladi, kakau, brusnicama, grašku i grahu, a za najveći unos flavanola u organizam odgovorni su crni čaj (Slika 11. prikazuje dva važna flavanola prisutna u čaju), pivo, sok od jabuka, svježe jabuke i breskve [6]. Flavanoli pokazuju nekoliko značajnijih zdravstvenih dobiti, djelujući kao antioksidansi, antikancerogeni i kardio-protektivni čimbenici [3].



**Slika 11.** Kemijska struktura: (a) katehina [12] i (b) epigalokatehin-3-galata [14]

Biosinteza polifenola okarakterizirana je s dva glavna metabolička puta: acetomalonatnim putem i putem šikiminke kiseline. Šikiminska kiselina je glavna preteča u biosintezi aromatskih aminokiselina poput *L*-fenilalanina i *L*-triptofana, ali i polifenola. Glavni supstrati potrebni za nastanak šikiminske kiseline su proizvodi primarnog metabolizma: fosfoenolpiruvat iz glikolize i eritroza-4-fosfat iz puta pentoza fosfata. Njihovom kondenzacijom nastaje 3-deoksi-*D*-arabinoheksuloza-7-fosfat koji prelazi u šikiminsku kiselinu. Tako dobivena šikiminska kiselina daljnim transformacijama daje spojeve hidroksibenzojeve kiseline: *p*-hidroksibenzojevu kiselinu, protokatehuinsku kiselinu i galnu kiselinu. Preko acetomalonatnog puta nastaju flavonoidi, a glavni supstrati ovog puta su *p*-kumaroil-CoA i tri molekule malonil-CoA, čijom kondenzacijom nastaje čalkon. Cijela reakcija je katalizirana čalkon sintazom, najvažnijim enzimom u biosintezi flavonoida. Nastali

čalkon transformira se u flavanon naringenin, a naringenin služi kao preteča za sve ostale grupe flavonoida [15].

Polifenoli su se počeli značajnije istraživati zbog njihovih antioksidacijskih svojstava, budući da se smatralo da je glavna uloga antioksidansa da štite od peroksidacije lipida. Sve veći broj istraživanja fokusirao se na bioaktivnost polifenola, čime je utvrđeno da posjeduju izuzetno velik raspon bioaktivnosti. Na primjer, utvrđeno je da mogu inhibirati proliferaciju stanica raka, utjecati na aktivnost pojedinih enzima poput telomeraze, ciklooksigenaze, COX (engl. *cyclooxygenase*), i lipooksigenaze, LOX (engl. *lipoxygenase*), te djelovati na pojedine signalne puteve [16].

## 2.2. Biološka aktivnost polifenola

U posljednjih nekoliko godina polifenoli su privukli veliku pažnju znanstvenika zbog svojih antioksidacijskih svojstava i mogućnosti primijene u liječenju raznih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom. Prema rezultatima raznih studija, polifenoli mogu kontrolirati razne enzime i stanične receptore, regulirati upalne procese, utjecati na stanične signale koji su važni za napredak bolesti i ublažiti simptome upalnih bolesti [7]. Broj studija koje ispituju djelovanje polifenola na organizam sve je veći, što ne čudi obzirom na veliku brojnost ove skupine spojeva.

Kako bi razumijeli djelovanje polifenola potrebno je razumijeti mehanizme na kojima se temelji njihova aktivnost. Pored antioksidacijskog i protuupalnog djelovanja, istraživanja ukazuju da polifenoli mogu utjecati i na smanjenje incidencije drugih bolesti (primjerice, kardiovaskularnih bolesti ili dijabetesa) budući da imaju antimikrobno, antibakterijsko, antivirusno, fungicidno, antidijabetičko, antialergijsko djelovanje i dr. [7]. U nastavku rada naglasak je stavljen na antioksidacijsko i protuupalno djelovanje polifenola.

### 2.2.1. Antioksidacijska aktivnost polifenola

Kao što je prethodno spomenuto, polifenoli se smatraju dobrim antioksidansima što je vezano za njihovu strukturu (brojne hidroksilne skupine, između ostalog). Antioksidacijsko djelovanje polifenola uključuje hvatanje slobodnih radikala, inhibiciju oksidacije i smanjivanje nastanka ROS-a. Osim toga, polifenoli mogu kelirati prijelazne metale, aktivirati antioksidacijske i inhibirati prooksidacijske enzime. Neki od polifenolnih spojeva koji pokazuju odličnu antioksidacijsku aktivnost su galagin, kamferol, kvercetin, pinocembrin [6],

ružmarinska kiselina, ferulična kiselina, kumarinska kiselina, vanilinska kiselina i klorogena kiselina [16].

Antioksidacijska svojstva polifenola ispitana su u brojnim studijama. Na primjer, Lin i sur. (2014) ispitali su vazoprotektivni učinak i učinak na umor kvercetin-3-*O*-gentibioze tako što su pratili oksidacijski stres i vaskularnu endotelijalnu disfunkciju u štakora (oba stanja izazvana iscrpljujućim plivanjem). Istraživanje je provedeno na mužjacima Sprague Dawley štakora, koje su podijeljeni u 6 grupa (n = 20): normalna kontrola, model kontrola, pozitivna kontrola (ginsenzoid Rb1, 50 mg/kg) te tri grupe koja primaju kvercetin-3-*O*-gentibiozu (25, 50 ili 75 mg/kg). Grupe (osim normalne kontrole) su tijekom 2 tjedna podvrgnute iscrpljujućem plivanju (150 minuta plivanja/dan s utezima od 10 g na repu) 1 sat nakon ingestije. Nakon 2 tjedna, grupe su podijeljene u 2 podgrupe (n = 10) – jedna grupa za test plivanja, a druga za skupljanje uzoraka (krv, jetra, mišići) za utvrđivanje biokemijskih parametara povezanih s umorom. Uočeno je da ginsenzoid Rb1 i kvercetin-3-*O*-gentibioza produžavaju vrijeme plivanja, odnosno odgađaju pojavu umora, a unos kvercetin-3-*O*-gentibioze poboljšao je i biokemijske parametre povezane s umorom, ovisno o dozi. U usporedbi s kontrolom, u grupa koje su primale kvercetin-3-*O*-gentibiozu uočen je porast koncentracije glikogena u jetri i mišićima, ovisno o dozi. Autori smatraju da bi visoke doze kvercetin-3-*O*-gentibioze mogle ograničiti metabolizam proteina, pojačati izdržljivost i unormaliti razine glikogena. Histološki nalazi ukazuju na određeni stupanj oštećenja stijenke aorte u štakora izloženih treningu (lezije, upalne stanice, pojava pjenušavih stanica i sl.), koji je u skupini tretiranoj kvercetin-3-*O*-gentibiozom bio znatno blaži. Osim toga, aktivnost glavnih antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze, SOD (engl. *superoxide dismutase*), i glutathion peroksidaze, GSH-Px (engl. *glutathione peroxidase*), u serumu štakora izloženih treningu bila je značajno smanjena, dok je koncentracija malonilaldehida (pokazatelj oksidacije membranskih lipida) u serumu bila povećana, u usporedbi s kontrolom. U štakora tretiranih kvercetin-3-*O*-gentibiozom, to nije bio slučaj te se smatra da kvercetin-3-*O*-gentibioza povećava aktivnost antioksidacijskih enzima [17].

Adeoye i sur. (2018) istraživali su utjecaj kvercetina i vitamina E na otvaranje tranzicijskih pora mitohondrijske propusnosti, MMPT (engl. *mitochondrial membrane permeability transition*) pora, jetrenih stanica u štakora s induciranim dijabetesom. Ukupno 35 štakora podijeljeno je u 7 grupa: ne-dijabetička kontrola, kontrola (dijabetes), dijabetička grupa tretirana s 30 mg/kg kvercetina, dijabetička grupa tretirana glibenklamidom (antidijabetički lijek), dijabetička grupa tretirana s 10 mg/kg vitamina E, samo tretman kvercetinom (30 mg/kg), samo tretman vitaminom E (10 mg/kg). Uočeni su porast

koncentracije glukoze u serumu, oštećenja tkiva peroksidacijom, aktivnosti alanin i aspartat aminotransferaze te koncentracije kolesterola i triglicerida u dijabetičkoj kontroli. Od svih tretmana, kvercetin je pokazao najveći kemopreventivni učinak. Kvercetin i vitamin E značajno su smanjili razinu glukoze u krvi, stupanj peroksidacije tkiva te aktivnost prethodno spomenutih aminotransferaza. U jetrenih stanica štakora, otvaranje MMPT pora znatno su inhibirali svi tretmani (kvercetin, vitamin E i glibenklamid), u odnosu na kontrolu (otvaranje MMPT pora je ključni faktor u mitohondrijskog disfunkciji koja vodi u apoptozu). Rezultati ukazuju da bi kvercetin mogao pomoći u liječenju oksidacijskih oštećenja tkiva jetre, primjerice putem inhibicije apoptotskih procesa u tim stanicama [18].

*In vitro* istraživanja su pokazala da oleuropein (polifenol lista i ploda masline) i hidroksitirozol (metabolit oleuropeina) učinkovito hvataju 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil, DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), i hidroksilne radikale [18], kao i peroksinitrit i superoksid radikal anione, ali ne i vodikov peroksid [20]. Iako se pokazalo da oleuropein i hidroksitirozol hvataju radikale na bazi kisika, njihova je reaktivnost blaga u usporedbi s Trolox-om (analog vitamina E, odnosno sintetski antioksidans). Ipak smatra se da bi oba spoja mogla igrati važnu ulogu u inhibiciji peroksidacije lipida [21].

Katehini, osobito zastupljeni u čaju, pokazuju jako dobru antioksidacijsku aktivnost. Obzirom da svaka vrsta čaja prolazi određeni način obrade, katehini u njima se razlikuju i kvalitativno i kvantitativno. U zelenom čaju, sadržaj katehina je oko 15 %, a ta se brojka fermentacijom smanjuje na 4-8 % (u oolong i crnom čaju) dok sadržaj procijanidina (oolong) i teaflavina (TF) (crni čaj) raste [22]. Zeleni čaj pokazao je najbolju sposobnost hvatanja hidroksilnih radikala, i do 86 %, dok je učinkovitost oolong i crnog čaja bila oko 50 %. Zeleni čaj najbolje hvata i superoksid radikal anion, čak i do 100 %, dok je rezultat za oolong i crni čaj oko 60 % [23].

Katehini su prisutni i u kakau (najviše katehin, procijanidin B2 i epikatehin), pa stoga ne čudi da polifenolima bogat ekstrakt kakaa ima odličnu antioksidacijsku aktivnost. Vodeni ekstrakt kakaa učinkovit je u hvatanju DPPH, OH radikala i NO radikala te time u sprečavanju peroksidacije lipida uzrokovane  $\text{NaNO}_2$  i  $\text{Fe}^{2+}$  ionima [24]. U kavi je prisutna klorogena kiselina, za koju se pokazalo da ima sposobnost hvatanja slobodnih radikala i eliminacije singletnog kisika. Na taj način ova kiselina štiti lipoprotein niske gustoće, LDL (engl. *lowdensity lipoprotein*), i nukleinske kiseline od oksidacijskih oštećenja [24-28]. Osim ovih spojeva, hesperidin, herperetin, nobiletin, sudahitin i eriocitrin (polifenoli citrusnog voća) također pokazuju antioksidacijsku aktivnost (i niz drugih – protuupalnu, antidijabetičku i dr.) [22].

Izoflavoni su povezani s nizom različitih učinaka na organizam, od koji je vjerojatno najpoznatiji učinak kao fitoestrogeni, odnosno učinak nalik učinku estrogena u organizmu sisavaca (pa i čovjeka). Ipak, pokazuju i druge aktivnosti, poput antidijabetičke. Genistein pokazuje i odličnu antioksidacijsku aktivnost, sličnu aktivnosti glutaciona, GSH (engl. *glutathione*), i učinkovito eliminira singletni kisik. Genistein-7-*O*-gentiobiozid (glikozid genisteina) pokazuje antioksidacijsku aktivnost u humanim MCF-7 stanicama raka dojke, ali ne posebno izraženu [22].

Chen i sur. (2019) istraživali su utjecaj polifenola iz kožice badema na biomarkere oksidacijskog stresa ljudi. U istraživanju su korištene blanširane kožice badema, koje su nusprodukt i otpad nastao prilikom obrade badema, a koje bi zbog polifenolnog profila mogle imati jako dobar antioksidacijski potencija. Sedam ispitanika (3 muškarca, 4 žene,  $63,3 \pm 9,1$  godina) konzumiralo je dvije doze polifenola iz kožice badema (niska – 225 mg ili visoka – 450 mg ukupnih polifenola) u obranom mlijeku ili samo mlijeko. Nakon unosa, tijekom 10 sati praćene su koncentracije flavonida u plazmi, GSH-Px, GSH, oksidiranog GSH i oksidacija LDL-a. Ovisno o dozi ingestiranih ukupnih polifenola, uočeno je povećanje koncentracije katehina i naringenina u plazmi (maksimalne koncentracije 44,3 i 19,3 ng/mL). Omjer GSH /oksidirani GSH 3 sata nakon ingestije polifenola pokazao je povećanje za 212 %, a nakon ingestije mlijeka 82 %. Aktivnost GSH-Px povećala se za 26-35 % u periodu 15, 30, 24 i 120 minuta nakon ingestije. Osim toga, unos polifenola (obje doze) odgodio je oksidaciju LDL-a za 144,7-165,2 % (ovisno o dozi), u odnosu na nepromijenjenu oksidaciju u slučaju ingestije mlijeka. Zaključno, polifenoli u kožici badema, unatoč blanširanju, ipak su biorasploživi i mogu utjecati na aktivnost i status antioksidacijskih enzima te na oksidaciju LDL-a [30].

#### 2.2.1.1. Kratki pregled odabranih mehanizama antioksidacijske aktivnosti

Slobodni radikali se u organizmu neprestano stvaraju, no postoje i vanjski izvori i utjecaji koji potiču stvaranje slobodnih radikala. Na primjer, ROS mogu nastati kao posljedica stresa, radijacije, različitih vrsta zagađenja, ali i prilikom vježbanja. Povišene količine ROS-a mogu uzrokovati štetne procese u samoj stanici, poput oksidacije lipida i proteina te oštećenja DNA. Oštećenja organizma uzrokovana ROS-om podloga su za nastanak mnogih bolesti poput bolesti jetre, kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa, tumora i upala. Stoga primjena egzogenih antioksidanasa omogućava smanjenje koncentracije slobodnih radikala i smanjuje rizik od nastanka spomenutih bolesti [6].



Antioksidacijska aktivnost se odvija putem nekoliko mehanizama, od kojih su u ovom radu prikazana četiri mehanizma u kojima se prijenosom atoma vodika neutralizira slobodni radikal(i). U prvom mehanizmu odvija se prijenos atoma vodika s antioksidansa na slobodni radikal, pri čemu se slobodni radikal neutralizira i nastaje radikal antioksidansa (jednadžba (1)):



gdje je ArOH antioksidans,  $R^{\cdot}$  slobodni radikal,  $ArO^{\cdot}$  radikal antioksidansa [31].

Mehanizam prijenosa atoma vodika u jednom koraku naziva se HAT (engl. *hydrogen atom transfer*) mehanizam [31]. Ovaj mehanizam se temelji na homolitičkom cijepanju veze između kisika i vodika hidroksilne skupine, koje omogućava istodobni prijenos elektrona i protona, odnosno atoma vodika.

Drugi mehanizam poznat pod nazivom SET-PT (engl. *single electron transfer-proton transfer*) odvija se u dva koraka. U prvom koraku, antioksidans gubi elektron pri čemu nastaje radikal kation antioksidansa (jednadžba (2)):



gdje je  $ArOH^{\cdot+}$  radikal kation antioksidansa,  $e^{-}$  elektron [32].

Drugi korak ovog mehanizma predstavlja deprotonaciju radikal kationa, gdje radikal kation otpušta proton i prelazi u radikal antioksidansa (jednadžba (3)):



gdje je  $H^{+}$  proton [32].

Zbog vrlo energetski zahtjevnog prvog koraka, ovaj je mehanizam termodinamički nepovoljniji u usporedbi s HAT mehanizmom [32].

Kao i SET-PT mehanizam i SPLET (engl. *sequential proton loss electron transfer*) mehanizam se odvija u dva koraka. U prvom koraku dolazi do deprotonacije antioksidansa pri čemu nastaje anion antioksidansa (jednadžba (4)):



gdje je  $ArO^-$  anion antioksidansa.

Drugi korak se temelji na gubitku elektrona, tj. anion antioksidansa gubi elektron te ga prenosi na radikalsku vrstu (jednadžba (5)):



Četvrti mehanizam, poznat pod nazivom RAF (engl. *radical adduct formation*), temelji se na sposobnosti antioksidansa da stvara radikalski adukt sa slobodnim radikalom (jednadžba (6)):



gdje je  $[ArOHR]^\cdot$  radikalski adukt [32].

U ovom slučaju reakcijsko središte antioksidansa trebalo bi biti lako dostupno, a slobodni radikal bi trebao biti male veličine kako bi se smanjile steričke smetnje i mehanizam odvio bez smetnji [32].

### 2.2.2. Prouupalna aktivnost polifenola

Smatra se da polifenoli mogu pomoći u sprečavanju određenih bolesti ne samo zbog antioksidacijskog nego i zbog protuupalnog učinka. Ova dva učinka usko su povezana, budući da se protuupalno djelovanje polifenola može odvijati i putem regulacije oksidacijskog stresa. Pretjerano stvaranje slobodnih radikala dovodi do sinteze proupalnih citokina (interleukini (IL), interferoni (IFN), tumor nekrotizirajući faktor alfa, TNF- $\alpha$  (engl. *Tumor Necrosis Factor Alpha*) i dr.), što dovodi do upalnog odgovora organizma i nastanka upale. Razna istraživanja (*in vivo* i *in vitro*) ukazala su na modulacijski učinak polifenola na inflamosome (proteini koji aktiviraju proupalne kaspaze, a one kataliziraju nastanak IL-a) koji potiču upalni odgovor, čime polifenoli pokazuju protuupalno djelovanje. Utvrđeno je da flavonoidi inhibiraju NF- $\kappa$ B i moduliraju čimbenike važne za razgradnju masnih stanica i glukoze, čime utječu na upalu i

inzulinsku rezistenciju te potencijalno mogu imati određenu ulogu u odgađanju ili eliminaciji upale i metaboličkih bolesti [6].

Dakle, imunomodulacijski učinak polifenola odvija se putem različitih mehanizama: neki polifenoli utječu na imunološke stanice, neki moduliraju proizvodnju citokina, a neki utječu na ekspresiju proupalnih gena. Neki polifenoli inaktiviraju NF- $\kappa$ B, a neki moduliraju MAPK signalni put i put arahidonske kiseline. Uz to, mogu inhibirati PI3K/Akt, IKK/JNK (engl. *inhibitor of kappa kinase/c-Jun amino-terminal kinases*), mTORC1 (engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*) i JAK/STAT (engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription protein*). Mogu blokirati TL-receptore (ili TLR, engl. *toll-like receptor*) i ekspresiju proupalnih gena. Njihova antioksidacijska aktivnost i sposobnost inhibicije enzima uključenih u proizvodnju eikozanoida pridonose njihovom ukupnom antioksidacijskom učinku. Mogu inhibirati određene enzime uključene u proizvodnju ROS-a (ksantin oksidaza i NADPH oksidaza), a *up*-reguliraju (regulacija naviše) druge endogene antioksidacijske enzime (SOD, katalaza, GSH i GSH-Px). Nadalje, inhibiraju PLA2 (engl. *phospholipase A2*), COX i LOX, zbog čega dolazi do smanjene proizvodnje prostaglandina i leukotriena. Na te i druge načine, polifenoli su pokazali pozitivan utjecaj na brojne kronične upalne bolesti, kao što je prevencija i ublažavanje napredovanja dijabetesa, gojaznosti, neurodegeneracije, raka i kardio-vaskularnih bolesti [33].

Tako se na primjer, kardioprotektivni učinak resveratrola pripisuje njegovim protuupalnim svojstvima. Utvrđeno je da može učinkovito inhibirati COX, inaktivirati PPAR $\gamma$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) i potaknuti eNOS (engl. *endothelial nitric oxide synthase*) u makrofazima miša i štakora [34-36]. Kurkumin smanjuje ekspresiju upalnih citokina (TNF i IL-1) i adhezijskih molekula (ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*) i VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*)), prostaglandina i leukotriena te inhibira aktivnost enzima uključenih u upalne procese poput COX, LOX, MAPK i IKK (engl. *inhibitor of kappa nase*). No to su samo neke od imunomodulacijskih aktivnosti kurkumina, a pojedine studije ispitale su učinak kavene kiseline i kvecetina za koje je također utvrđen protuupalni učinak: feniletil ester kavene kiseline blokira aktivaciju TLR4 i NF- $\kappa$ B u makrofazima, dok kvercetin inhibira biosintezu leukotriena u leukocitima [37,38]. Kvercetin i gingerol potiču stvaranje adiponektina, a epigalokatehin-3-galat, EGCG (engl. *epigallocatechin-3-gallate*), blokira aktivaciju NF- $\kappa$ B i *down*-regulira (suprimira, regulacija naniže) ekspresiju iNOS (engl. *inducible nitric oxide synthase*) te NO proizvodnju u makrofazima [39-41]. Oleanolična kiselina, kurkumin, kamferol-3-*O*-soforozid, EGCG i likopen inhibiraju HMCB1 (engl. *high mobility group box1*) protein, važan kromatinski

protein koji stupa u interakciju s nukleosomima, transkripcijskim faktorima i histonima, čime regulira transkripciju i igra važnu ulogu u upalnim procesima [42].

Prethodno spomenuto istraživanje Lin i sur. (2014) o učinku kvercetin-3-*O*-gentibioze uključivalo je i ispitivanje učinka kvercetin-3-*O*-gentibioze na razinu citokina u serumu (MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*), TNF- $\alpha$  i IL6) i razinu proupalnih proteina. Utvrđeno je da su razine ispitivanih citokina u serumu kontrolne grupe bili povećani, dok je tretman s kvercetin-3-*O*-gentibiozom doveo do smanjenja koncentracije svih ispitivanih citokina, ovisno o dozi. Vazoprotektivni učinak kvercetin-3-*O*-gentibiozom u štakora mogao bi biti rezultat njegovog protuupalnog djelovanja, koje se odvija putem smanjenja koncentracije citokina (MCP-1, TNF- $\alpha$  i IL6). Osim toga, ispitana je ekspresija gena upalnih signalnih puteva (LOX-1/NF- $\kappa$ B) u tkivu aorte. Ekspresija LOX-1 mRNA i ICAM-1 mRNA bila je slabo izražena u normalnoj kontroli, a znatno povišena u modelnoj kontroli. Tretman kvercetin-3-*O*-gentibiozom doveo je do smanjenja ekspresije svih promatranih gena, u ovisnosti o dozi. Ovakav učinak kvercetin-3-*O*-gentibioze bio je i u slučaju razine proupalnih proteina. Autori su zaključili da kvercetin-3-*O*-gentibioza ne pokazuje samo antioksidacijsku aktivnost, nego i značajnu protuupalnu aktivnost tako što smanjuje razine proupalnih citokina [17].

Polifenoli utječu na broj i diferencijaciju imunoliških stanica. Unos polifenola ekstrahiranih iz datulje doveo je do povećanja Th1 stanica (Th, engl. *T helper*), NK stanica (engl. *natural killer*) i DC stanica (engl. *dendritic cells*) u mužjaka C3H/HeN miša [43]. U ljudi, broj regulatornih T stanica (Trg), uključenih u imunotoleranciju i autoimunu kontrolu, može se povećati unosom polifenola [44-46]. *In vivo*, EGCG povećava broj funkcionalnih Trg u slezeni, gušterači i limfnim čvorovima (BALB)/c miševa [47], a osim toga smanjuje diferencijaciju Th1 i brojnost Th17 i Th9 stanica u ženki C57/BL6 miša [48]. Polifenoli djeluju i na same makrofage. Potiskuju ih tako što inhibiraju COX-2 i iNOS, smanjuju proizvodnju TNF- $\alpha$  te ekspresiju IL-1- $\beta$  i IL-6 [49].

Osim toga, utvrđeno je da polifenoli imaju i proupalno djelovanje. Naime, polifenoli se ponašaju kao regulatorne molekule u signalnim putevima kojima se aktivira upalno stanje (inhibicija puta arahidonske kiseline, aktivnosti proupalnih enzima, NF- $\kappa$ B signalnog puta i dr.). Polifenoli mogu na razne načine djelovati i na posrednike upale, npr. flavonoidi mogu reducirati histamin i IL. Na taj način polifenoli pomažu u zaštiti stanica od oštećenja nastalih kao posljedica upalnih procesa, pa bi mogli pomoći u tretmanu određenih bolesti [6].

### 2.3. Rak

Skupina bolesti koje nastaju zbog abnormalnog rasta stanica naziva se rak. Često se kao sinonimi za rak koriste termini *tumor* i *karcinom*, no oni nisu nužno sinonimi. Tumor ili neoplazma je svaka abnormalna masa tkiva koju karakterizira poremećen rast stanica zbog pretjerane i abnormalne proliferacije stanica. Tumori se dijele na benigne tumore i maligne tumore ili rak. Benignim tumorom se nazivaju sve tvorevine čije stanice nisu kancerogene, on se neće proširiti na druga tkiva, tj. ne metastazira. Smatra se bezopasnim osim ako se ne nalazi u blizini vitalnih organa te se može odstraniti kirurškim putem. Maligni tumori su građeni od stanica raka, koje se mogu širiti na druga tkiva (metastaza) [50].

Rak se može pojaviti u gotovo svim dijelovima tijela (poznato > 100 vrsta raka) te zahvaća ljude svih dobi i rasa [51]. Može se klasificirati prema žarišnom (ishodišnom) organu (npr. rak pluća i rak mokraćnog mjehura) ili prema tipu stanica koje su zahvaćene (npr. karcinom, leukemija i limfom) [50]. Karcinom se sastoji od epitelnih stanica i može se podijeliti na nekoliko vrsta obzirom na tip epitelnih stanica koje je zahvatio (adenokarcinom, karcinom pločastih stanica i dr.) [52].

Leukemija nastaje kada se abnormalni leukociti nakupljaju u krvi i koštanoj srži. Zbog brzog širenja abnormalnih leukocita dolazi do smanjenja produktivnosti normalnih leukocita, pa organizam nije dovoljno opskrbljen kisikom i podložan je infekcijama. Limfom predstavlja nakupljanje abnormalnih limfocita u limfnim čvorovima i krvnim žilama, a mogu se pronaći i u drugim organima. U slučaju abnormalnih B-limfocita radi se o Hodgkinovu limfomu, dok ne-Hodgkinov limfom može nastati od abnormalnih B- i T-limfocita [52].

Predviđa se da će do 2025. godine broj oboljelih od raka porasti na 420 milijuna. Godine 2018. broj slučajeva raka iznosio je oko 18 milijuna i to 9,5 milijuna muškaraca, a 8,5 žena. Neke vrste raka imaju veću incidenciju, a to su rak dojke, prostate, debelog crijeva i želuca [51].

Proces nastanka raka traje godinama, a započinje promjenama unutar stanica. Ljudsko tijelo regulira nastanak novih stanica, u čemu sudjeluju određeni signalni putevi. Ukoliko jedan od signalnih puteva ne funkcionira i nastupi izostanak određenih signala, stanice se počnu nekontrolirano umnožavati čime nastaje tumor. Prilikom replikacije genetskog materijala mogu nastupiti mutacije koje također mogu dovesti do nastanka tumora, ali uzročnik može biti i neki okolišni spoj (npr. duhanski dim). Manji tumori lako rastu za što su im neophodni kisik i nutrijenti koje dobivaju pomoću okolnih krvnih žila. Kako tumor raste, opskrba kisikom i nutrijentima može postati problem te često dolazi do odvajanja pojedinih

stanica tumora koje se putem limfe ili krvi prenose u druge dijelove tijela. Ove stanice služe za nastanak novi tumora, na drugim lokacijama u organizmu, a proces koji dovodi do toga zove se metastaza [51].

Do danas, provedena su mnoga istraživanja i primijenjene mnoge metode u pokušaju liječenja raka, a najčešće su to kombinacije metoda poput kirurškog odstranjivanja poslije kojeg slijedi kemoterapija. Radioterapija se odnosi na metodu liječenja primjenom radijacije, koja bi trebala pomoći u smanjivanju tumora, ubijanju stanica raka i oštećivanju njihove DNA kako bi se usporio rast stanica raka. Za tretiranje raka štitne žlijezde se koristi radioaktivni jod, dok se za tretiranje raka dojke i vrata primjenjuje brahiterapija. Radijacija se uvijek daje u kombinaciji s nekim drugim metodama, može se primijeniti prije kirurškog odstranjivanja kako bi se smanjila veličina tumora ili u kombinaciji s imunoterapijom. Nedostatci radioterapije su brojni, a najznačajniji je oštećenje zdravih stanica [51].

Kemoterapija se temelji na primjeni kemijskih sredstava za usporavanje rasta stanica raka ili njihovu eliminaciju. Može se primjenjivati kao samostalna terapija ili u kombinaciji s drugim metodama. Glavni nedostatak ove terapije je taj što ubija, pored stanica raka, i zdrave stanice što je popraćeno značajnim nuspojavama (gubitak kose, mučnina ili nesvjestica) [51].

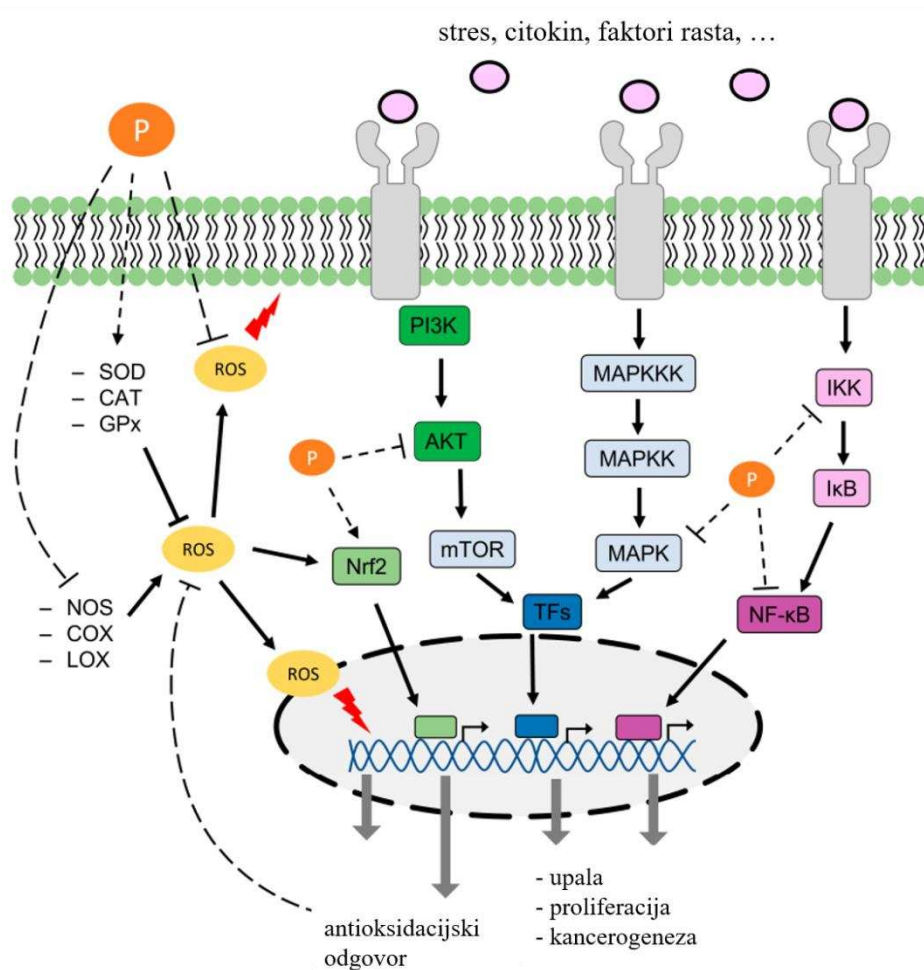
Imunoterapija je metoda pojačavanja imunološkog sustava primjenom raznih lijekova i tretmana. Još uvijek nema široku primjenu te je u fazi razvoja i istraživanja. Njezina je uloga ojačati imunološki sustav toliko da ima mogućnost identificiranja stanica raka, označavanja i uništenja tih stanica. Nuspojave koje se javljaju su bol, crvenilo i osip [51].

Ciljana terapija je jedna od najbitnijih u pokušaju suzbijanja raka. Temelji se na primjeni lijeka koji će prepoznati stanice raka i samo na njih djelovati, bez oštećenja ili uništenja zdravih stanica. Može djelovati na više načina, poput jačanja imunološkog sustava koji će onda lako uočiti stanice raka i uništiti ih, može zaustaviti rast stanica raka ometajući rad signalnih molekula koje govore stanicama da se razmnožavaju te može zaustaviti signalne molekule za nastanak novih krvnih žila (angiogenezu) zbog čega se još zove inhibitorom angiogeneze. Iako je izuzetno dobra, ova metoda ima i neke nedostatke – stanice raka mogu razviti rezistenciju, a sami lijekovi su teško dostupni i skupi [51].

#### 2.4. Antikancerogeni učinak polifenola

U prethodnim poglavljima je spomenuto kako polifenoli posjeduju veliki broj bioloških aktivnosti, gdje su spomenuta protuupalna i antioksidacijska aktivnost kao najvažnije od njih. Još jedno svojstvo polifenola koje je od velike važnosti za ljudsko zdravlje je njihova

sposobnost u borbi protiv raka. Gotovo 47 % lijekova koji se trenutno koriste protiv raka su derivati prirodnih proizvoda, a kao najučinkovitiji među njima pokazali su se upravo fenolni spojevi, npr. flavonoidi. Polifenoli pokazuju antikancerogena svojstva kroz širok raspon mehanizama, putem kojih uzrokuju promjene signalnih putova, inhibiraju stanični ciklus i induciraju apoptozu (Slika 12.) [33].



**Slika 12.** Antikancerogeni učinci polifenola (*P* – polifenol, *TFs* – transkripcijski faktori)  
(preuzeto i prilagođeno iz: [53])

#### 2.4.1. Antikancerogeni učinak kvercetina

Polifenoli su pokazali učinkovito *in vitro* anti-proliferativno djelovanje protiv raka jajnika, dojke, limfnih čvorova i debelog crijeva [54,55]. Utvrđeno je da dovode do kondenzacije kromatina i apoptoze u stanicama nekih vrsta raka (narušavanjem signalnih puteva, npr. raznih tirozin kinaza) [56]. Kvercetin (Slika 7. (a)) je jedan od najzastupljenijih

polifenola u prehrani, a posjeduje proapoptoska i antiproliferativna svojstva bitna u borbi protiv raka [57].

Kvercetin ima dvojak učinak, ovisno o dozi: pri niskim koncentracijama ponaša se kao antioksidans i ima kemoprotektivan učinak, a pri visokim koncentracijama kao prooksidans i pokazuje kemoterapeutske učinke. Antikancerogeni učinak kvercetina temelji se na redukciji proliferacije, poticanju apoptoze, izazivanju zastoja staničnog ciklusa i inhibiciji mitoze te modulaciji raznih signalnih puteva (npr. PI3K/Akt/mTOR, Wnt/ $\beta$ -catenin i MAPK/ERK1/2 put). Kvercetin na te načine smanjuje preživljavanje stanica, potiče apoptozu i autofagiju [58].

Kvercetin se pokazao odličnim inhibitorom tirozin kinaza [59,60]. Uz to, zaustavlja stanični ciklus u G2 i G1 fazi, a apoptoza potaknuta kvercetinom može biti povezana i s proteinima stresa, narušavanjem mikrotubula, citokromom c i aktivacijom kaspaza [61]. Zanimljivo je da se kvercetin povezuje sa selektivnim antiproliferativnim učincima i izazivanjem apoptoze u stanicama raka dojke i dugih vrsta raka, ali ne u zdravim stanicama [62].

Kvercetin je jak antioksidans te može spriječiti pojavu raka izazvanog oksidacijskim stresom [63], a u kombinaciji s lijekovima (npr. doksorubicin) pojačava imunološki odgovor organizma u borbi protiv raka dojke [64]. Oksidacijska oštećenja DNA također dovode do nastanka raka, pa je i ovdje antioksidacijski potencijal kvercetina od velike pomoći (eliminacija slobodnih radikala, npr. ROS-a i reaktivnih dušikovih vrsta, RNS (engl. *reactive nitrogen species*)) [63].

Kvercetin se pokazao učinkovitim u inhibiciji stanične proliferacije i poticanju apoptoze u stanica humanog adenokarcinoma, a djeluje tako što inhibira survivin mRNA te ekspresiju i aktivaciju kaspaze 3. Slični rezultati dobiveni su i za stanice raka bubrega [65]. Razne studije su ukazale na važnu ulogu kvercetina u prevenciji raka i supresiji tumora [66], a koncentracije kvercetina koje su se pokazale učinkovitim bile su u rasponu 3-50  $\mu$ M [67].

Učinkovitost kvercetina ispitana je i putem brojnih *in vivo* studija, kojima je potvrđena učinkovitost u slučaju raka debelog crijeva, prostate (ali ne u PC-3 stanične linije raka prostate) i melanoma [68,69]. Kao što je prethodno spomenuto, jedan od mehanizama antikancerogene aktivnosti kvercetina vezan je za njegov antioksidacijski potencijal i zaštitu stanica od oksidacijskog stresa, upale i DNA oštećenja, koji svi vode do nastanka raka. U tome pomaže i interakcija kvercetina sa staničnim kompartmentima, poput enzima i transkripcijskih faktora [70].

Smatra se da kvercetin može pojačati učinkovitost kemoterapije, odnosno bioraspoloživost ovih lijekova, tako što inhibira BCRP (engl. *breast cancer resistance*



*protein*), MRP1 (engl. *multidrug resistance protein 1*) i P-gp (engl. *permeability glycoprotein*). Kvercetin stupa i u interakciju s TGF- $\beta$ 1 (engl. *transforming growth factor  $\beta$ 1*), koji može potaknuti ili inhibirati rast nekancerogenih mijeloidnih prekursora čime kvercetin inhibira rast stanica raka jajnika [71].

Kvercetin je pokazao *in vivo* i *in vitro* antiproliferativno djelovanje i u slučaju stanične linije leukemije L1210 i P-388, stanica raka dojke, stanica raka debelog crijeva COLO 20DM, stanica raka jajnika OVCA 433, stanica raka jetre HepG2 i dr. Smatra se da interakcija kvercetina s pojedinim signalnim putevima (P13K/Akt, HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) i dr.) moguće dovodi do inhibicije rasta kancerogenih stanica [72].

Metastaze su povezane s proizvodnjom metaloproteinaza matriksa, MMPs (engl. *matrix metalloproteinases*), enzima koji razgrađuju ekstracelularne proteine matriksa u raznim stanicama i tkivima, a neophodni su za razvoj invazivnosti/metastaza stanica raka. Stoga, blokiranje sinteze MMPs u stanicama raka smanjuje šansu za nastanak metastaze i pomaže u liječenju raka. Ovakav učinak kvercetin je pokazao u slučaju MCF-7 stanica raka dojke, gdje je kvercetin inhibirao aktivaciju i migraciju MMP-9 [73].

Utjecaj kvercetina na metabolizam stanica raka, njegova povezanost s metabolizmom glukoze i funkcioniranjem mitohondrija predmet su brojnih istraživanja. Naime, stanice raka preferiraju glikolizu kao izvor energije, pa bi inhibicija glikolize mogla biti jedna od strategija borbe protiv i/ili u liječenju raka. Dokazano je da kvercetin ciljano djeluje na glikolizu (npr. smanjuje proizvodnju glukoze i laktata u stanicama nekih vrsta raka, čime inhibira glikolizu u tim stanicama) i na funkcioniranje mitohondrija (ometanje proizvodnje ATP-a u mitohondrijima također može biti jedna od strategija eliminacije raka). Potvrđeno je da u stanicama raka dojke miša, kvercetin smanjuje koncentraciju PKM2 (engl. *pyruvate kinase isoenzyme type M2*), što sugerira da kvercetin može inhibirati glikolizu tako da ciljano djeluje na enzime uključene u ove procese. Pokazalo se da kombinacija kvercetina i inhibitora glikolize (npr. 2-deoksi-D-glukoza) rezultira pojačanim učinkom, ali taj učinak nije jednako izražen u svim vrstama raka. Upotreba 2-deoksi-D-glukoze je ograničena jer ovaj spoj stimulira signalne puteve koji potiču preživljavanje staničnih linija tumora (kvercetin može blokirati ovaj učinak tako što blokira fosforilaciju Akt). Kvercetin smanjuje transmembranski potencijal mitohondrija i povećava propusnost membrane, čime se aktivira intrinzična apoptoza. Utvrđeno je da kvecetin izaziva disfunkcioniranje mitohondrija, smanjuje respiraciju i proizvodnju ATP-a [58].

Rivera Rivera i sur. (2016) ispitivali su antikancerogeni potencijal kvercetina u slučaju raka dojke, s naglaskom na Akt/AMPK/mTor (engl. *Akt/adenosine monophosphate protein kinase/mammalian target of rapamycin*) signalni put. Naime, ovaj put se pokazao važnim za regulaciju staničnog metabolizma, energetske homeostaze i staničnog rasta. Stoga, narušavanje puta može dovesti do nastanka metaboličkih poremećaja poput gojaznosti, dijabetes melitusa tip 2 i raka. Istraživanje je trajalo nekoliko mjeseci, a uključivalo je nekoliko faza istraživanja poput *in vitro* istraživanja i molekularne analize. Cilj istraživanja bio je utvrditi doprinos polifenola (resveratrol, kvercetin i katehin) na mTOR signalizaciju te su u tu svrhu metastatske stanice raka dojke tretirane ovim polifenolima (pojedinačno i u kombinaciji), nakon čega je praćena aktivnost AMPK, Akt, ostalih mTOR efektor, p70s6 kinaze (p70s6K) i 4E vezujućeg proteina 1 (4EBP1, engl. *4E-binding protein 1*). Metode korištene za *in vitro* istraživanje su bile MTT (engl. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*) analiza, pomoću koje je praćena stanična stabilnost nakon djelovanja kvercetinom; Western blott analiza, kojom su se pratile razine ključnih proteina u Akt/MAPK/mTOR signalnom putu te protočna citometrija, pomoću koje su se analizirale progresija staničnog ciklusa i apoptoze. Prema rezultatima, kvercetin se pokazao kao najučinkovitiji od ispitanih u Akt/mTOR inhibiciji, budući da je tretman s 15  $\mu$ M kvercetina dao sličan učinak kao i kombinacija polifenola u inhibiciji proliferacije stanica raka, apoptozi i migraciji. Ispitivanja odvijanja staničnog ciklusa su pokazala da kombinirani polifenoli djeluju na G1 fazu, a kvercetin na G2 fazu. Rezultati *in vivo* ispitivanja na SCID miševima s implantiranim tumorima pokazali su da je doza od 15 mg/kg dovela do redukcije rasta tumora od gotovo 70 %. Prema tome, kvercetin bi mogao poslužiti u daljnjim istraživanjima kao lijek protiv raka dojke [74].

Yang i sur. (2016) ispitivali su *in vitro* i *in vivo* doprinos kvercetina angiogenezi u slučaju humanih PC-3 stanica raka prostate (naglasak je bio na ulozi trombospondina-1, TSP-1 (engl. *thrombospondin-1*). Naime, TSP-1 je jedan od endogenih anti-angiogenetskih faktora koji može inhibirati angiogenezu i tumorogenezu. U istraživanju su korištene brojne metode poput MTT analize, Western blott analize, kvantitativne RT-PCR (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) analize te histološke analize. BALB/c mužjaci miša inokulirani su subkutano s PC-3 stanicama, a kada je tumor postao dovoljno velik, podijeljeni su u 4 grupe (n = 8): kontrolna i grupe koje su primale kvercetin (25, 50 i 75 mg/kg) tijekom 4 tjedna. Rezultati su pokazali da je kvercetin znatno inhibirao proliferaciju, migraciju i invaziju PC-3, što je ovisilo o dozi. Rast samog tumora smanjen je za 29,6-37,5 % (ovisno o dozi), a miševi su dobro podnijeli tretman i nisu uočene nuspojave. Kvercetin je značajno reducirao

angiogenezu i pojačao ekspresiju TSP-1 (opet ovisno o dozi). Budući da se kvercetin pokazao potencijalno učinkovitim inhibitorom angiogeneze i rasta tumora, trebalo bi razjasniti konkretan mehanizam aktivnosti kvercetina ali i primijeniti kvercetin u kliničkim studijama [75].

Zhao i sur. (2016) također su ispitali utjecaj kvercetina na angiogenezu u raka dojke, ali je naglasak bio na kalcineurinu (sudjeluje u glavnom signalnom putu angiogeneze humanog raka dojke). Prethodna *in vitro* istraživanja utvrdila su potencijal kvercetina u inhibiciji kalcineurina, a u ovom istraživanju ispitan je taj učinak *in vivo*. Ženke BALB/c miša inokulirane su s humanim MCF-7 stanicama raka dojke. Kada je tkivo postalo dovoljno veliko, podijeljene su u 4 grupe: kontrolnu, grupu koja je primala tamoksifen (5,6 mg/kg), grupu koja je primala takrolimus (3 mg/kg) i grupu koja je primala kvercetin (34 mg/kg) tijekom 21 dana. U istraživanju su korištene metode poput mjerenja veličine tumora nakon djelovanja kvercetina, histološke analize kojom se pregledavalo tumorsko tkivo kako bi se procijenila gustoća krvnih žila, kao ključni indikator angiogeneze, te su koristili i metodu imunohistokemije kojom su pratili ekspresiju kalcineurinskih i angiogenetskih markera unutar tumorskog tkiva. Histološke analize i mjerenja veličine tumora pokazale su da kvercetin ima učinak sličan ovdje korištenim lijekovima, odnosno smanjio je rast tumora, ograničio proliferaciju stanica raka i potaknuo nekrozu tumora. Uz to, pokazao je i anti-angiogenetski učinak, inhibirao aktivnost tumorskog kalcineurina za 62,73 %. Učinak na kalcineurinski signalni put potvrdile su smanjena koncentracija faktora rasta vaskularnog endotela, VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), VEGF2 i nuklearnog faktora aktiviranih T-stanica, NFATc3 (engl. *Nuclear factor of activated T-cells*) te smanjena ekspresija gena za ove proteine. Stoga su autori zaključili da kvercetin inhibira angiogenezu u miševa tako da ometa aktivnost kalcineurina i puta u kojem on sudjeluje [76].

#### 2.4.2. Antikancerogeni učinak epigalokatehin-3-galata

Epigalokatehin-3-galat (EGCG) jedan od glavnih katehina pronađenih u zelenom čaju i najproučavaniji katehin zbog svojih antikancerogenih svojstava. Utvrđeno je da modulira rast stanica raka, metastaze i angiogenezu putem interakcija s različitim mehanizmima. Iako posjeduje velik stupanj antikancerogenog djelovanja, dva manja katehina, epikatehin galat, ECG (engl. *epicatehin gallate*), i epigalokatehin, EGC (engl. *epigallocatechin*), su pokazala jače antiproliferativno i protuupalno djelovanje u stanicama adenokarcinoma gušterače. EGCG ne posjeduje veliku bioraspodivnost, ali se u kombinaciji s drugim polifenolnim

spojevima može povećati njegova metabolička učinkovitost. Bioraspoloživost EGCG-a može se povećati ako se konzumira s lukom koji je bogat kvercetinom. Ali kako se u kombinaciji s nekim proizvodima njegova bioraspoloživost može povećati tako se u kombinaciji s drugim proizvodima može i smanjiti. Na primjer, u kombinaciji sa žitaricama i mlijekom njegova bioraspoloživost još će se više smanjiti [14].

EGCG pokazuje *in vitro* antikancerogeno djelovanje na razne vrste raka, a pokazalo se da učinkovita koncentracija ovisi o vrsti raka. Iako su u pitanju bile male doze, zbog niske bioraspoloživosti EGCG-a smatra se da su za njegov antikancerogeni učinak dijelom odgovorni njegovi metaboliti. Raznoliki učinci EGCG-a na stanice raka povezuju se s utjecajem EGCG-a na različite signalne puteve. Učinak EGCG-a potvrđen je *in vivo*, u slučaju raka dojke, debelog crijeva, jednjaka, želuca, pluća, prostate i dr., pri čemu je EGCG smanjio invazivnost, veličinu i volumen stanica, spriječio angiogenezu i potaknuo apoptozu. Utvrđeno je da EGCG sinergistički inhibira stanice raka u kombinaciji s prirodnim malim molekulama (npr. askorbinska kiselina, kurkumin, 6-gingerol, kvercetin, proantocijandini i dr.) tako što sinergistički inhibira proliferaciju i migraciju stanica raka, potiče apoptozu, sprječava angiogenezu i rast stanica raka [77].

EGCG povećava osjetljivost na zračenje i kemoterapiju, a dovodi do zastoja staničnog ciklusa (u G1 i G2 fazama) djelujući na odgovarajuće regulatorne proteine. Ovaj polifenol izaziva apoptozu aktivacijom kaspaze-9, kaspaze-3, citokroma c i dr., što sugerira da se aktivira mitohondrijski apoptotski put. No utvrđeno je da EGCG može simultano izazvati apoptozu putem mitohondrijskog puta, receptora za apoptozu i puta specifičnog za endoplazmatski retikulum, pa je moguće da tip apoptoze izazvane EGCG-om ovisi o vrsti raka. U svakom slučaju, EGCG *down*-regulira ekspresiju antiapoptotskih proteina (Bcl-2 (engl. *B-cell leukemia/lymphoma 2 protein*), Bcl-xl (engl. *B-cell lymphoma-extra large*), survivin i dr.) i *up*-regulira proapoptotske proteine (Apaf-1 (engl. *Apoptotic protease activating factor 1*), Bad (engl. *Bcl-2-associated death protein*), Bak (engl. *Bcl-2 homologous antagonist killer*), Bax (engl. *Bcl-2-associated X protein*), Bcl-xs (engl. *B-cell lymphoma-extra small*) i dr.) [77].

EGCG djeluje na transkripcijske faktore te na taj način može modificirati ekspresiju gena važnih za patogenezu raka i tako dovesti do inhibicije raka. Osim toga, EGCG može utjecati na aktivnost intracelularnih enzima, npr. kinaza – inhibira kinaze povezane s rastom stanica a aktivira kinaze povezane s apoptozom. EGCG regulira ekspresiju nekih proteinaza (npr. MMPs), čime EGCG doprinosi inhibiciji migracije, invazivnosti i metastaziranja stanica raka. Utvrđeno je i da djeluje na ekspresiju raznih upalnih faktora u stanica raka (inhibira

ekspresiju upalnih citokina, faktora rasta, kemokina i enzima), što također doprinosi do inhibicije raka. Interakcija EGCG-a s membranskim receptorima (inhibicija hormonskih receptora, epidermalnog faktora rasta i dr.) dovodi do inhibicije proliferacije i metastaza stanica raka [77].

Luo i sur. (2014) ispitali su utjecaj EGCG-a na ekspresiju HIF-1 $\alpha$  (engl. *Hypoxia inducible factor 1 alpha*), VEGF i stanični rast u slučaju MCF-7 stanica raka dojke. Stanice su predtretirali EGCG-om (25, 50, 100 mg/L) tijekom 48 sati, nakon čega je praćen rast i proliferacija stanica te mRNA ekspresija HIF-1 $\alpha$  i VEGF-a. Istraživanje je uključivalo razne metode poput Western blott analize, MTT analize i RT-PCR metode. Utvrđen je izražen pad rasta MCF-7 stanica u slučaju tretmana s EGCG, zatim pad ekspresije HIF-1 $\alpha$  i VEGF-a, ovisno o dozi primijenjenog EGCG-a. Rezultati ukazuju na antitumorski mehanizam EGCG-a te upućuju ciljeve budućih istraživanja kako bi se poboljšale prevencija i liječenje raka [78].

Eom i sur. (2015) ispitali su sinergistički učinak kurkumina na EGCG-om induciranu antikancerogenu aktivnost u slučaju PC3 stanica raka prostate. Stanice humanog karcinoma tretirane su 24 sata ili EGCG-om ili kurkuminom ili smjesom od 100  $\mu$ M EGCG-a i 50  $\mu$ M kurkumina. Korištene su razne metode praćenja utjecaja kurkumina i EGCG-a na stanice raka prostate (MTT analiza, protočna citometrija i Western blott). Utvrđeno je da je preživljavanje stanica raka značajno smanjeno, ovisno o dozi, a uspoređena je i učinkovitost među raznim staničnim linijama raka prostate. EGCG je pokazao slabiji inhibični učinak u slučaju PC3 proliferacije nego u drugim staničnim linijama raka prostate. Kotretman s kurkuminom poboljšao je učinak EGCG-a na PC3 stanice i ekspresija p21 značajno je povećana, što nije bio slučaj u tretmanu samo s EGCG-om ili samo s kurkuminom. Analiza odvijanja staničnog ciklusa pokazala je da kod tretmana s EGCG-om i kurkuminom nastupa prekid u S i G2 fazi staničnog ciklusa. Zaključno, kotretmana PC3 stanica s EGCG-om i kurkuminom dovodi do pojačane inhibicije proliferacije stanica, regulacije p21 inducirano rasta i zaustavljanja staničnog rasta u određenim fazama staničnog ciklusa [79].

Lu i sur. (2015) ispitali su metaboličke posljedice inhibicije laktat dehidrogenaze A (LDHA) putem EGCG-a i oksamata u MIA PaCa-2 stanicama raka gušterače. Naime, nekoliko humanih staničnih linija raka (uključujući rak gušterače) pokazuje povišenu koncentraciju LDHA, zbog čega se LDHA smatra ciljnom molekulom (metom) u liječenju raka. Učinak EGCG-a uspoređen je s oksamatom (inhibitor LDHA). U istraživanju je korišteno nekoliko metoda, poput MTT analize, analize produkcije laktata, Western blott-a. Utvrđeno je da EGCG značajno smanjuje proizvodnju LDHA u MIA PaCa-2 stanica, zatim anaerobnu glikolizu, potrošnju glukoze i stopu glikolize (rezultati su usporedni s rezultatima

tretmana oksamatom). U oba slučaja, utjecaj na razne metaboličke puteve značajno je modificirao metabolizam stanica raka [80].

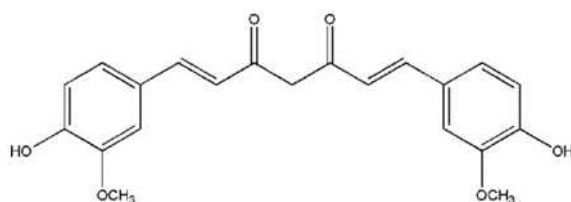
Sur i sur. (2016) ispitali su kemopreventivnu i terapijsku učinkovitost polifenola iz čaja (EGCG i TF) u slučaju raka jetre miša, a naglasak je bio na modulacijskom učinku ovih spojeva na određene puteve: Wnt-signalni put (engl. *wingless-related integration site*) i Hh-signalni put (engl. *Hedgehog*). Učinak ovih spojeva ispitan je u ženki Swiss albino miša podijeljenih nekoliko grupa (n = 12): kontrola, karcinogena kontrola, predtretman (miševi primali EGCG i TF samo 15 dana prije inokulacije rakom), kontinuirani tretman (predtretman i kontinuirani tretman do kraja ispitivanja), posttretman (inokulacija rakom nakon koje slijedi tretman do kraja ispitivanja). Tijekom istraživanja koristili su razne metode praćenja utjecaja EGCG-a i TF-a na stanice raka jetre poput histopatologije, imunohistokemije i Western blott-a. Povećanje tjelesne mase utvrđeno je u slučaju tretmana EGCG i TF, u usporedbi s kontrolom. Međutim, EGCG i TF mogu ograničiti razvoj stanica raka jetre u 30-om tjednu (od inokulacije raka), čime pokazuju potencijalan kemopreventivni učinak u grupi s kontinuiranim tretmanom, predtretmanom i posttretmanom. Ovaj učinak povezan je sa smanjenom proliferacijom i pojačanom apoptozom. U slučaju Wnt-puta smatra se da EGCG i TF smanjuju ekspresiju  $\beta$ -katenina i fosfo- $\beta$ -katenina-Y-654 te *up*-regulira ekspresiju sFRP1 (engl. *secreted frizzled-related protein 1*), a u slučaju Hh-puta EGCG i TF smanjuju ekspresiju Gli1 (engl. *glioma-associated oncogene homolog 1*) i SMO (engl. *smoothed homolog*) te *up*-reguliraju PTCH1 (engl. *patched homolog 1*). Autori smatraju da je restrikcija karcinogeneze jetre pomoću EGCG i TF posljedica redukcije pojedinih tipova stanica (jetrene progenitorske stanice i matične stanice) i modulacije raznih regulatornih puteva [81].

#### 2.4.3. Antikancerogeni učinak kurkumina

Kurkumin (Slika 13.), glavni aktivni sastojak kurkume, najpoznatiji je po antioksidacijskom učinku, ali pokazuje i druge učinke, poput antikancerogenog i protuupalnog te pomaže u terapiji artritisa, metaboličkog sindroma, bolesti jetre, gojaznosti, neuro-degenerativnih bolesti i nekih vrsta raka.

Kurkumin stupa u interakciju s nekoliko imunomedijatora što (između ostalog) dovodi do antitumorskog učinka. Na primjer, kurkumin blokira aktivnost NF- $\kappa$ B i *down*-regulira transkripcijski faktor AP-1 (engl. *Activator Protein-1*). Utvrđeno je da inhibicijom IL-6, kurkumin utječe na transkripcijski faktor STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*), a blokiranjem transkripcije TNF- $\alpha$  blokira i ekspresiju upalnih gena.

Inhibicijom protein kinaza, kurkumin inducira apoptozu. Osim na ovaj način, imunomodulacijski učinak kurkumina usmjeren je i na makrofage, T- i B-limfocite i DC [82].



**Slika 13.** Kemijska struktura kurkumina [1]

Kurkumin se pokazao učinkovitim u inhibiciji proliferacije i invazivnosti stanica raka dojke putem *down*-regulacije NF- $\kappa$ B gena, inhibicije HER2-TK (engl. *human epidermal growth factor receptor 2-tyrosine kinase*). Uz to, u stanicama raka dojke kurkumin *down*-regulira Akt protein te izaziva autofagiju i blokiranje puta ubikvitin-proteosoma, a pretpostavlja se da blokiranjem PI3K-Akt signalnog puta kurkumin dodatno potiče apoptozu i autofagiju. U kombinaciji s nekim molekulama, kurkumin je pokazao sinergistički učinak, kao npr. u kombinaciji s PI3K inhibitorom. Kurkumin ometa funkcioniranje signalnog puta EGFR (smanjuje razinu EGFR i Akt), što dovodi do inhibicije rasta i proliferacije stanica. Osim toga, modulira i aktivnost transkripcijskog faktora Nrf2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), što rezultira kemopreventivnim i antiproliferativnim učinkom. U raka dojke, antiproliferativni učinak kurkumina pokazao se ovisnim o estrogenu. Ali je *in vitro* kurkumin pokazao antiinvazivni učinak koji nije ovisio o estrogenu. U ovom slučaju radilo se o *down*-regulaciji MMP-2 i *up*-regulaciji TIMP-1 (engl. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1*) [82].

Kurkumin može izazvati apoptozu u većine, ali ne u svih, staničnih linija raka dojke tako što mijenja membranski potencijal ovih stanica. U ovom slučaju, nakon otpuštanja citokroma c i *up*-regulacije ekspresije kaspaza 9 i 3, PRAP (engl. *prolactin receptor associated protein*) izaziva fragmentaciju DNA i apoptozu. U apoptozu još može sudjelovati *up*-regulacija ekspresije Bad i Bax te *down*-regulacija Bcl-2 i Bcl-xl [83].

Kurkumin ima određenu terapijsku učinkovitost u liječenju raka pluća, koja se očituje putem *down*-regulacije NF- $\kappa$ B i inhibicije aktivnosti JAK2 (engl. *Janus kinase 2*), što onda utječe na JAK2/STAT3 signalni put. Supresijom signalnog puta PI3K/Akt, kurkumin u stanicama raka pluća inhibira proliferaciju i izaziva apoptozu. Kurkumin ima i određeni potencijal izazivanja zastoja staničnog ciklusa (G0/G1 faza), a apoptozu i smanjeno

preživljavanje stanica adenokarcinoma pluća može izazvati i suzbijanjem ekspresije COX-2, EGFR, ERK 1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*) [82].

Kurkumin je pokazao određenu učinkovitost u slučaju limfoma, leukemije i multiplog mijeloma. Na primjer, pokazalo se da kurkumin izaziva apoptozu u B-stanica kronične limfocitne leukemije putem *down*-regulacije STAT3, Akt, NF- $\kappa$ B i XIAP (engl. *x-linked inhibitor of apoptosis protein*) i *up*-regulacije proapoptotskog proteina BIM (engl. *B-cell lymphoma 2-like protein*). Kurkumin inhibira proliferaciju i klonogenost u staničnoj liniji K562 (stanična linija koja pojačano eksprimira WT1 (engl. *Wilms tumor 1*) gen (mRNA i protein)) putem inhibicije WT1 proteina. Izaziva zastoj u G2 fazi staničnog ciklusa, a apoptozu izaziva i aktivacijom JNK/ERK/AP1 signalnog puta. U stanicama Burkittova limfoma, kurkumin može inhibirati ekspresiju PI3K/Akt puta i NF- $\kappa$ B, što rezultira apoptozom u 3 stanične linije ovog limfoma. Uz to, u stanicama Burkittova limfoma kurkumin *down*-regulira onkogen c-Myc (engl. *cellular myelocytomatosis oncogene*) i *up*-regulira apoptotske proteine. U stanicama limfoma uočeno je da kurkumin utječe na proupalni citokin IL-1, tako što ga *down*-regulira putem modulacije AP-1 i NF-IL6 (engl. *nuclear factor interleukin-6*). U slučaju multiplog mijeloma, kurkumin pokazuje antikancerogeni učinak tako što ometa NF- $\kappa$ B i STAT3 signalne puteve, suprimira I $\kappa$ B kinazu (IKK) i NF- $\kappa$ B [82].

U stanicama raka želuca, kurkumin inhibira antiapoptotske proteine (Bcl-2) i potiče ekspresiju p53, Bax te prokaspaza 3, 8 i 9. Snažna antioksidacijska aktivnost kurkumina (inhibicija ROS-a) pridonosi kemopreventivnom i antikancerogenom učinku kurkumina. Kurkumin *down*-regulira razinu pSTAT3, ekspresiju survivina i preživljavanje stanica raka želuca, a u kombinaciji s 5-fluorouracilom pokazuje sinergistički učinak na STAT3 i survivin, što povećava smrtnost stanica raka želuca. U slučaju kolorektalnog raka, kurkumin utječe na nekoliko signalnih puteva (npr. PPAR $\gamma$ ), suzbija ekspresiju COX-2, p53 i Prp4B (engl. *pre-mRNA processing factor 4B*), zaustavlja stanični ciklus, potiče apoptozu i dr. U slučaju raka gušterače, kurkumin utječe na preživljavanje stanica raka tako što inhibira NF- $\kappa$ B, COX-2, CD-31 (engl. *cluster of differentiation 31*), VEGF i IL-8 te inhibira aktivaciju STAT3. I ovdje kurkumin može dovesti do zastoja staničnog ciklusa i izazvati apoptozu (inhibiranjem PI3K/Akt i *up*-regulacijom PTEN (engl. *phosphatase tensin homolog deleted on chromosome 10*)). U humanim G2 stanicama hepatoma, kurkumin izaziva oštećenja mitohondijske i jezgrine DNA. Niska doza kurkuimina ponaša se kao antioksidans, ali visoka doza kurkumina djeluje kao prooksidans, nastaje oksidacijski stres zbog povećanog stvaranja ROS-a i lipidne peroksidacije, što dovodi do oštećenja DNA [82].



Epelbaum i sur. (2010) ispitali su učinkovitost tretiranja naprednog (lokalnog ili metastatskog) raka gušterače kombinacijom kurkumina (8 g/dan) i gemcitabina (1000 mg/m<sup>2</sup>, jednom tjedno) tijekom 3 od 4 tjedna ciklusa kemoterapije. 8 od 17 pacijenata nisu dobro podnosili kurkumin zbog izražene abdominalne boli, od koji je 5 prekinulo tretman a 3 primilo prilagođene doze kurkumina u nastavku istraživanja (4 g/dan). Jedan pacijent je razvio neutropeniju, a jedan pacijent trombocitopeniju. Vrijeme do progresije tumora bilo je između 1 i 12 mjeseci, a preživljavanje između 1 i 24 mjeseca. Autori smatraju da kombinirana terapija kurkumina i gemcitabilna može pomoći u liječenju raka gušterače, no doza kurkumina treba biti manja od 8 g/dan [84].

U stanica raka prostate, kurkumin inhibira proliferaciju stanica i izaziva apoptozu tako što ometa razne signalne puteve (MAPK, EGFR, NFκB) [37]. Hejazi i sur. (2016) ispitali su učinak kurkumina na oksidacijski status pacijenata s rakom prostate tijekom radioterapije. 40 pacijenata je nasumično podijeljeno da primaju ili kurkuminoide (3 g/dan) ili placebo, prije i tijekom terapije zračenjem. Praćeni su TAC (engl. *total antioxidant capacity*) i aktivnost SOD, katalaze i GSH-Px, tri mjeseca nakon zračenja. Koncentracija specifičnog antigena prostate, PSA (engl. *prostate specific antigen*) poslužila je kao mjera za učinkovitost tretmana. Nakon zračenja, uočeno je povećanje TAC i smanjenje aktivnosti SOD, što upućuje na aktioksidacijski učinak kurkumina, ali nisu uočene značajne promjene u aktivnosti katalaze i GSH-Px. Razina PSA bila je znatno smanjena u obje grupe, što ukazuje da su oba tretmana učinkovita. Nije uočena značajna razlika između ove dvije grupe, što znači da kurkumin nije poboljšao učinkovitost radioterapije [85].

Unatoč korisnim učincima kurkumina, sama primjena kurkumina ograničena je zbog njegove slabe topljivosti u vodi, koja dovodi do niske bioraspoloživosti i smanjene stabilnosti spoja, kao i zbog niskog staničnog unosa kurkumina. Naime, budući da je izraženo hidrofoban, kurkumin se veže za masne kiseline stanične membrane, što dovodi do niske raspoloživosti kurkumina u citoplazmi [86].

Cruz-Correa i sur. (2018) ispitali su sigurnost i učinkovitost primjene kurkumina u liječenju obiteljske adenomatozne polipoze. U ispitivanju su sudjelovala 44 pacijenta s dijagnozom ove bolesti i barem 5 crijevnih adenomatoznih polipa, koji su podijeljeni u dvije grupe: placebo i tretman 3 g/dan kurkumina tijekom 12 mjeseci. Mjereni su broj i veličina polipa u donjem dijelu probavnog sustava (svaka 4 mjeseca). Na kraju ispitivanja, nije uočena značajna razlika u središnjem broju i veličini polipa, a nuspojave su bile rijetke i nisu bile značajno drugačije u usporedbi s placebom. Ispitivanje je pokazalo nisku učinkovitost i

visoku sigurnost kurkumina korištenog u oralnom tretmanu pacijenata s obiteljskom adenomatoznom polipozom [87].

#### 2.4.4. Antikancerogeni učinak ružmarinske kiseline

Ružmarinska kiselina je ester kavene i 3,4-dihidroksifenil mliječne kiseline te je uobičajena u biljnom svijetu kao sekundarni biljni metabolit. Pokazuje niz bioaktivnosti, npr. antivirusnu, antibakterijsku, protuupalnu, antioksidacijsku i antikancerogenu aktivnost. Stoga ne čudi što je ružmarinska kiselina predmet raznih studija, pa tako i istraživanja fokusiranih na antikancerogeni učinak i medicinski značaj, kao i na mehanizme na kojima se ovaj učinak temelji. Scheckel i sur. (2008) utvrdili su da tretman (5, 10 i 20  $\mu\text{M}$ ) ružmarinskom kiselinom u stanica HT-29 raka debelog crijeva smanjuje COX-2 aktivnost izazvanu djelovanjem TPA (engl. *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*), transkripciju AP-1 koja je isto potaknuta TPA, suzbija vezanje AP-1 faktora, c-Jun (engl. *Jun-proto-oncogene*) i c-Fos (protoonkogen) za COX-2 promotorske oligonukleotide s CRE (engl. *c-AMP-response element*) te ometa aktivaciju ERK 1/2. Prema tome, antikancerogeni učinak ružmarinske kiseline mogao bi biti rezultat inhibicije COX-2 aktivacije (izazvana AP-1 inducirajućim čimbenicima) [88].

Ružmarinska kiselina može inducirati apoptozu u stanicama raka debelog crijeva putem modulacije ERK signalnog puta, a može potisnuti aktivnost i ekspresiju MMP-2,9 u tim stanicama. Enclada i sur. (2011) ispitali su antiproliferativni učinak biljke *Melissa officinalis* L. na humane stanice raka debelog crijeva. Utvrdili su da 50 %-tni etanolski ekstrakt biljke smanjuje preživljavanje stanica, a iz ekstrakta je izolirana ružmarinska kiselina, za koju se utvrdilo da je doza od 1000  $\mu\text{g/mL}$  citotoksična za stanice raka i nakon 24 sata [89].

Mehanizmi djelovanja ružmarinske kiseline protiv raka debelog crijeva nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se smatra da ružmarinska kiselina ima dva glavna puta djelovanja u kontaktu s ovim stanicama. S jedne strane, ova kiselina antagonizira aktivnost ERK tako što inhibira ERK fosforilaciju, što dovodi do inhibicije raka debelog crijeva. Drugi put uključuje ometanje vezanja AP-1, c-Jun i c-Fos, čime se smanjuje aktivnost COX-2, što posljedično također dovodi do inhibicije raka debelog crijeva. U slučaju raka kože, ružmarinska kiselina ili pojačava protuupalnu i antioksidacijsku aktivnost ili inhibira PKA/CREB/MITF (engl. *protein kinase A/cAMP response element binding protein/microphthalmia-associated transcription factor*) signalne puteve, a oba učinka na kraju dovode do inhibicije raka [90]. Na primjer, Osakabe i sur. (2004) ispitali su kako ružmarinska kiselina inhibira kožni upalni odgovor i koji je antikancerogeni učinak ekstrakta biljke *Perilla frutescens* (L.) Britton na

modelu miša. Rak u stanicama miša izazvan je primjenom 7,12-dimetilbenz[a]antracena i potaknut dodatkom TPA, čime je potaknuta MMP aktivnost, povećana ekspresija mRNA ICAM-1 i VCAM-1, povećana sinteza kemokina KC (engl. *keratinocyte chemoattractant*) i upalnog proteina-2, pojačana ekspresija COX-2 mRNA te pojačana proizvodnja ROS-a i 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina. Topikalna primjena ružmarinske kiseline obrnula je sve te učinke, što sugerira da je antitumorski učinak ove kiseline u slučaju tumora kože kombinacija protuupalnog i aktioksidacijskog učinka [91].

Primjena ružmarinske kiseline se pokazala učinkovitom u tretmanu drugih vrsta raka. U slučaju raka pluća, smatra se da ružmarinska kiselina inhibira proliferaciju stanica tako što inhibira COX-2, a stanicama oralnog karcinoma ružmarinska kiselina poboljšava antioksidacijski status, *down*-regulira ekspresiju p53 i Bcl-2. Uočeno je da u stanicama leukemije ružmarinska kiselina izaziva apoptozu putem inhibiranja aktivacije NF- $\kappa$ B (inhibiraju se fosforilacija i degradacija I $\kappa$ B, nuklearna translokacija p50 i p65 te aktivnost antiapoptotskih proteina IAP-1, IAP-2 i XIAP) i stvaranja ROS-a. U slučaju raka dojke, odvija se modulacija RANKL/RANK/OPG (engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand/receptor activator of NF- $\kappa$ B/osteoprotegerin*) puteva i inhibicija DNA metiltransferaze, što dovodi do inhibicije stanica raka dojke [90].

Han i sur. (2019) ispitali su učinak ružmarinske kiseline na napredovanje raka gušterače i pokušali utvrditi molekularne mehanizme tog učinka. Ružmarinska kiselina znatno ograničava preživljavanje stanica, stanični rast, staničnu invazivnost i migraciju, kao i epitelno-mezenhimalni prijelaz stanica raka gušterače te izaziva apoptozu stanica gušterače. Osim toga, ružmarinska kiselina značajno *up*-regulira ekspresiju miR-506 (tumor supresorska miRNA) u stanica raka gušterače (redukcija miR-506 umanjuje inhibirajuće učinke ružmarinske kiseline na stanični rast, invazivnost i migraciju te blokira pojačani učinak ove kiseline na apoptozu stanica raka gušterače). Utvrđeno je da pretjerana ekspresija miR-506 i tretman ružmarinskom kiselinom ometa ekspresiju MMP2/16 u stanica raka gušterače (pretjerana ekspresija MMP2/16 ometa inhibitorni učinak ružmarinske kiseline na invazivnost i migraciju stanica raka gušterače). Ružmarinska kiselina i u *in vivo* ispitivanju ometa rast tumora (što se pokazalo ovisno o dozi), pojačava ekspresiju miR-506, a smanjuje ekspresiju MMP2/16 u mužjaka miša. Ovim istraživanjem potvrđen je antitumorski učinak ružmarinske kiseline na stanice raka gušterače te je utvrđena osnova na kojoj se ovaj učinak temelji (regulacija miR-506 i MMP2/16) [8].

Mahmoud i sur. (2021) ispitali su kemoprotektivni učinak ružmarinske kiseline i procijenili njezinu antitumorsku učinkovitost kada se primjenjuje sama ili u kombinaciji s

lijekom Paclitaxelom u slučaju miševa s rakom dojke. Miševi su tretirani oralno s ružmarinskom kiselinom i intraperitonealno s Paclitaxelom, a ispitivane su pojava upale, angiogeneza i apoptoza (neke od korištenih metoda bile su ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*), qPCR (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*) i razne imunohistokemijske metode). Utvrđeno je da je ružmarinska kiselina, ako se primijeni prije izazivanja tumora, smanjila koncentracije NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  i VEGF u krvi, a uspostavljanjem normalnih koncentracija p53, Bcl-2, Bax i kaspaze-3 potakla je apoptozu. U tumorskom tkivu, ružmarinska kiselina sama ili u kombinaciji s Paclitaxelom značajno je ograničila rast tumora, povećala koncentraciju p53 i kaspaze-3 te smanjila Bcl2/Bax omjer. Istraživanje je potvrdilo kemoprotektivan i terapijski potencijal ružmarinske kiseline u slučaju raka dojke [92].

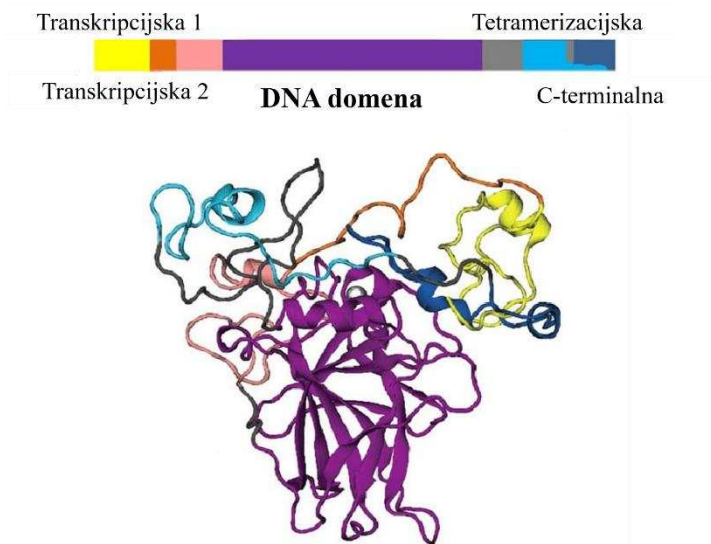
## 2.5. Učinci polifenola na odabrane signalne puteve

Antikancerogena svojstva polifenoli pokazuju regulacijom raznih signalnih puteva koji omogućavaju nastanak i razvoj stanica raka. Polifenoli mogu regulirati proces apoptoze, proliferacije stanica, angiogenezu te stanični ciklus, što je rezultat interakcije s određenim signalnim putovima organizma [93].

### 2.5.1. Učinak polifenola na signalni put p53

Protein 53 ili p53 transkripcijski je faktor koji je ime dobio po molekularnoj masi (53 kDa). Prvi put je identificiran 1979. godine primjenom natrij dodecil sulfat i poliakrilamid gel elektroforeze, SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis*), a nalazi se na kraku kromosoma 17. Glavna biološka funkcija p53 je zaštita DNA stanica, a povezan je sa starenjem stanica i staničnom diobom [94].

Građen je kao tetramer (Slika 14.) te sadrži 393 aminokiselinska ostatka, a posjeduje domenu za transkripcijsku aktivaciju, TAD (engl. *transcriptional activation domain*), domenu za vezanje DNA, DBD (engl. *DNA-binding domain*), domenu za tetramerizaciju, TET (engl. *tetramerization domain*) i C-terminalnu regulacijsku domenu, CTD (engl. *C-terminal regulatory domain*) [95].



*Slika 14. Strukturni prikaz domena p53  
(preuzeto i prilagođeno iz: [95])*

Transkripcijska domena aktivira RNA polimerazu čime se započinje sinteza DNA lanca, domena za vezivanje DNA je najpodložnija mutacijama i bogata je argininom i lizinom, a domena za tetramerizaciju stvara oligomerne lance spajanjem drugih monomernih jedinica p53. Glavni regulatorni enzim p53 je onkoprotein MDM<sub>2</sub> (engl. *mouse double minute 2 homolog*), koji je poznat kao i ubikvitin-protein ligaza, čija je uloga regulacija i stabilizacija aktivnosti p53 [94].

Kada se radi o stanicama raka postoje dva tipa p53, mutirani i divlji tip. Mutirani tip se nalazi u skoro svim malignim stanicama, učinkovitiji je u aktiviranju razvoja stanica raka od divljeg tipa. Mutacije p53 najčešće se događaju u DBD-u, što onemogućava učinkovito reguliranje gena uključenih u zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptoze. Mutacije p53 nastavljaju progresiju tumora, invaziju i metastazu, pa čak ometaju funkcije divljeg tipa p53 i drugih puteva koji onemogućavaju širenje tumora. Istraživanja se još uvijek provode kako bi se odredila najbolja strategija obnavljanja mutiranog p53 u divlji tip te se ispituje primjena lijekova koji bi selektivno razgradili mutirani p53 [94].

Divlji tip p53 ima važnu ulogu u održavanju genomske stabilnosti inducirajući zaustavljanje staničnog ciklusa, apoptoze, popravka DNA kao odgovora na stanični stres. Važan je za zaustavljanje razvoja raka eliminirajući i popravljajući oštećene stanice. U zdravim stanicama divlji tip p53 je reguliran s MDM<sub>2</sub> koji zadržava razine ovog tipa niskim

pri normalnim uvjetima, a u slučaju stresa p53 se stabilizira i aktivira te odrađuje svoje funkcije u suzbijanju tumora [94].

Signalni put p53 predstavlja mrežu molekularnih interakcija koje reguliraju protutumorsku aktivnost p53. Ovaj put osigurava aktivnost p53 kao odgovor na razne vrste stresa, poput oštećenja DNA, onkogene aktivnosti ili hipoksije. Kada se aktivira, p53 započinje niz staničnih procesa koji održavaju genomski identitet i zaustavlja razvoj raka. Signalni put p53 predstavlja sustav putem kojeg se kontrolira način na koji se p53 stabilizira, aktivira i kako utječe na sudbinu stanica [94].

Kada je u pitanju regulacija signalnog puta p53 uz pomoć polifenola, brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja (Tomeh i sur. (2019) [86], Mahmoud i sur. (2021) [92] i dr.) dokazala su da polifenoli mogu regulirati razne stanične putove pa tako i p53 put. Na primjer, Hernandez-Valencia i sur. (2018) ispitali su *in vitro* učinak resveratrola u cisplatin-rezistentnoj MCF-7 staničnoj liniji (rezistencija na cisplatin značajno doprinosi neučinkovitosti lijekova za rak). Ispitali su utjecaj resveratrola na fosforilaciju p53 te njegovu ulogu u obnavljanju apoptoze u stanicama raka dojke. Za praćenje fosforilacije p53 na serinu 20 koristili su Western blott analizu, qPCR za procjenu specifičnih gena p53, a protočnu citometriju za ispitivanje apoptoze. Utvrdili su da resveratrol povećava osjetljivost na cisplatin u regularnih MCF-7 stanica i onih koje su rezistentne. *Down*-regulacija ekspresije p53 proteina i inhibicija aktivnosti p53 povećava rezistenciju na cisplatin u obje stanične linije. Utvrđeno je da resveratrol inducira fosforilaciju serina 20 čime se aktiviraju p53 ciljni geni i obnavlja apoptoza. Uz to, mijenja Bcl2/Bax omjer tako da se ekspresija Bcl-2 proteina smanjuje a Bax proteina povećava. Resveratrol smanjuje fosforilaciju p53 na serinu 15 i serinu 46 (vjerojatno putem defosforilacije i deaktivacije kinaze ATM (engl. *ataxia-telangiectasia mutated*)) te aktivira razne kinaze (kako bi pojačao fosforilaciju p53 na serinu 20) [96].

Srivastava i sur. (2016) procijenili su i usporedili antitumorsku učinkovitost kvercetina i elagične kiseline u životinjskom modelu (pilot studija: 15 miševa – 5 kontrola, 5 tumorska kontrola, 5 tretman s 1 mg/kg kvercetina i 3 mg/kg elagične kiseline tijekom 12 dana, 6 doza svaka tri dana, ponovljeno s tri skupine miševa; studija: 1, 3 i 10 mg/kg kvercetina i elagične kiseline) i u raznim staničnim linijama (K562, CEM, HEK 293T, T47D, EAC, MEF-1). Utvrdili su da kvercetin izaziva citotoksičnost u stanicama leukemije i stanicama raka dojke (učinak u zdravim stanicama je bio slab ili nikakav), dok elagična kiselina pokazuje manju toksičnost. Osim toga, utvrđeno je da u stanicama raka, kvercetin uzrokuje zaustavljanje S faze staničnog ciklusa. Regresija rasta tumora nastaje djelovanjem i kvercetina i elagične kiseline, samo što je koncentracija kvercetina potrebna za ovaj učinak tri puta manja od

koncentracije elagične kiseline. Primjena kvercetina rezultirala je povećanjem životnog vijeka miševa za 5 puta, u usporedbi s kontrolom. U slučaju p53, uočeno je povećanje p53 i fosforiliranog p53 u Ki-67 stanica tretiranih kvercetinom, u usporedbi s kontrolom. Pretpostavlja se da kvercetin aktivira intrinzične puteve apoptoze. Naime, apoptoza uključuje *down*-regulaciju antiapoptotskih proteina i *up*-regulaciju proapoptotskih proteina, a ovdje je uočena *up*-regulacija p53 (ali i *down*-regulacija antiapoptotskih proteina). Istraživanje je otkrilo da kvercetin stupa u izravnu interakciju s DNA, što bi mogla biti osnova apoptotskog mehanizma u tumorskom tkivu i u stanicama raka (jer time dolazi do aktivacije intrinzičnih puteva apoptoze) [97].

Moos i sur. (2004) ispitali su značaj kurkumina kao kemopreventivnog agensa u ljudi (koristili su RKO stanice raka debelog crijeva). Kurkumin inhibira transkripciju NF- $\kappa$ B, aktivnost LOX i COX, koji imaju ulogu u napredovanju raka. U tumorskim stanicama debelog crijeva, kurkumin štiti od napretka kancerogeneze. Kurkumin sadrži  $\alpha,\beta$ -nezasićene ketone za koje se smatra da dovode do potiskivanja NF- $\kappa$ B, a ista strukturna jedinica prisutna u kurkuminu prisutna je i udrugim spojevima koji inhibiraju supresore tumora (npr. p53). Autori su potvrdili da se kurkumin ponaša analogno ovim spojevima – narušava konformaciju p53 nužnu za fosforilaciju serina, njegovo vezanje za DNA, aktivaciju gena i zaustavljanje staničnog ciklusa posredovano putem p53. Kurkumin je čest prehrambeni sastojak, pogotovo u nekim vrstama prehrane te ga se povezuje s kemoprotektivnim učinkom. Međutim, pozitivan učinak koji se pripisuje prehrani teško se može ostvariti unosom doze pojedine komponente te prehrane. Na primjer, prehrana bogata  $\beta$ -karotenom smanjuje rizik razvoja raka uzrokovanog duhanom, ali unos kapsule s  $\beta$ -karotenom neće imati taj učinak. Osim toga, kemopreventivni spojevi mogu smanjiti rizik od raka u jednom organskom sustavu, a u drugom ga povećati [98].

### 2.5.2. Učinak polifenola na signalni put protein-kinaze aktivirane mitogenom

Protein-kinaza aktivirana mitogenom (MAPK) širok je pojam koji se odnosi na obitelj serin-treoninskih proteinskih kinaza, a glavnu ulogu imaju u kontroli stanične smrti te kontroli preživljavanja, rasta i diobe stanica. Aktiviraju se raznim izvanstaničnim signalima i imaju ulogu u prenošenju tih signala s površine stanica do jezgre [99]. MAPK signalni put odnosi se na specifične unutarstanične signalne puteve koji imaju specifičan aktivacijski mehanizam i biološku funkciju. Glavne sastavnice MAPK puta su p38, c-Jun N-terminalna kinaza, JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) i ERK1/2. Aktivacijom sastavnica MAPK-a, dolazi do

njihovog djelovanja na upale, aktivaciju apoptoze i proliferacije, što je bitno u borbi protiv raka. Narušavanje MAPK signalnog puta rezultira pojavom raznih stadija kancerogeneze, kao što su metastaze, angiogeneza, apoptoza, invazivnost, proliferacija i stanična diferencijacija. Na taj način, narušavanje ovog signalnog puta značajno doprinosi kancerogenezi [100].

ERK put se aktivira faktorima rasta i stimulacijom receptora tirozin kinaze, a on aktivira niz kaskada kojima se aktiviraju drugi signali potrebni za reguliranje stanične proliferacije, diferencijacije i razvoja. Aktivirani ERK 1/2 dolaze do jezgre, aktiviraju transkripcijske faktore, mijenjaju ekspresiju gena, tako da se potiče rast, diferencijacija ili mitozu [99].

JNK put aktiviraju stres, citokini, faktori rasta i dr., a sudjeluje u raznim fiziološkim procesima (u proliferaciji i diferencijaciji stanica, apoptozi). ERK 1/2 mogu aktivirati različite JNK kinaze, što je važno za stimulaciju stanične proliferacije. Aktivacija ovog puta povezana je s transformacijama onkogeni i puteva posredovanih faktorima rasta, prijenosom signala za diferencijaciju hematopoetskog sustava, a možda ima i određenu ulogu u embrionskom razvoju [99].

p38 put aktivira se putem stresa (npr. UV zračenje, visoki osmotski tlak, i dr.), citokina, mitogena, faktora rasta i dr., a sudjeluje u proliferaciji, diferencijaciji, razvoju stanica, upalnim procesima, apoptozi te odgovoru na stres. Važna komponenta IFN signalizacije je usmjerenje fosforilacije i aktivacije citosolne fosfolipaze; osim čega, p38 fosforilira razne transkripcijske faktore. Aktivirani p38 može uzrokovati zastoj mitoze u kontrolnoj točki formiranja diobenog vretena [99].

Kurkumin pokazuje određeni antikancerogeni učinak u raznim vrstama tumora, npr. u slučaju raka prostate ili karcinoma endometrija. U nastavku su prikazani rezultati odabranih studija, s naglaskom na utjecaj kurkumina na pojedine komponente MAPK signalnog puta. Zhang i sur. (2019) ispitali su inhibitorni učinak kurkumina na karcinom endometrija (Ishikawa cells) i ERK/c-Jun signalni put. Ishikawa stanice, poznate po svojem brzom rastu i otpornosti na terapiju, predstavljale su savršen model za testiranje učinka kurkumina. Utvrdili su da kurkumin može smanjiti preživljavanje stanica karcinoma, inhibirati migraciju i proliferaciju, izazvati apoptozu i zastoj staničnog ciklusa u S fazi. Razrađen je molekularni mehanizam koji čini temelj ovakvog učinka kurkumina, a prema tom mehanizmu kurkumin ometa ekspresiju ERK2 i Jun gena te inhibira fosforilaciju ERK i c-Jun. Prema tome, kurkumin inhibira proliferaciju karcinoma endometrija tako što *down-regulira* ERK/c-Jun signalni put i ometa njegovu aktivnost [101].

Zhao i sur. (2018) ispitali su *in vivo* i *in vitro* utjecaj kurkumina na rak prostate miša (koristili su humane epitelne stanice LNCaP dobivene iz karcinoma prostate), a ispitali su i



koncentraciju fosfo-c-Jun. Miševima je subkutano injektiran rak, a nakon što je dovoljno narastao, miševi su primili 30 mg/kg kurkumina ili dimetil sulfoksida (DMSO). Rast tumora je praćen 10 dana. Rezultati su pokazali da kurkumin inhibira rast stanica raka prostate i potiče apoptozu, inhibira JNK put i suzbija H3K4me3 (epigenetska modifikacija histona H3 koja igra važnu ulogu u razvoju malignih i normalnih stanica, budući da se ponaša kao represor „nepodobnih“ gena i održava genomsku stabilnost [102]) u LNCaP stanicama. Učinkovita inhibicija raka prostate postignuta je i kombiniranom primjenom kurkumina i JQ-1 (BET inhibitor). Autori su zaključili da kurkumin inhibira JNK put i igra ulogu u epigenetskoj regulaciji raka prostate tako što suzbija H3K4me3 [103].

Yang i sur. (2019) ispitali su antiproliferativni učinak kvercetina na stanice kolorektalnog raka, odnosno učinak kvercetina na preživljavanje stanica raka i apoptozu te ekspresiju važnih proteina. Istraživanje je provedeno na staničnim linijama humanog raka debelog crijeva koje sadrže KRAS (engl. *Kirsten rat sarcoma*) mutaciju. Ova mutacija uočena je u gotovo 40 % slučajeva te se povezuje s rezistencijom na kemoterapiju i lošom prognozom bolesti. Utvrđeno je da kvercetin smanjuje preživljavanje KRAS-mutiranih stanica. Osim toga, pokazalo se da su KRAS-mutirane stanice osjetljivije na kvercetinom uzrokovanu apoptozu u odnosu na divlji tip stanica raka te da aktivacija kaspaza (osobito kaspaza-3) sudjeluje u nastanku ove apoptoze. Kako bi se potvrdila uloga kaspaza, korišteni su inhibitori kaspaze-3, -8 i -9, a utvrđeno je smanjenje broja apoptotskih stanica u slučaju primjene svih inhibitora. Kvercetin selektivno aktivira JNK put u KRAS-mutiranih stanica, a inhibicija fosforilacije JNK (korišten inhibitor JNK, konkretno SP600125) blokira kvercetinom izazvanu apoptozu. Ispitani su i drugi signalni putevi (Akt, ERK), ali primjena kvercetina na njih nije pokazala značajan učinak [104].

Riahi-Chebbi i sur. (2019) ispitali su antitumorski učinak 13 fenolnih spojeva (izolirani iz *Cydonia oblonga* Miller), sami i u kombinaciji s 5-fluorouracilom, na stanice LS174-R raka debelog crijeva koje su rezistentne na 5-fluorouracil. Prema rezultatima, samo je kamferol pokazao pozitivan učinak te je pokazao sinergistički učinak s 5-fluorouracilom (u tom je slučaju smanjeno preživljavanje stanica, pojačana apoptoza i uzrokovan zastoj staničnog ciklusa i u kemo-rezistentnih i senzibiliziranih stanica). Kamferol je značajno smanjio proizvodnju ROS-a u rezistentnim i senzibiliziranim stanicama, koja je u kombinaciji s 5-fluorouracilom bila još jače izražena. Utvrđeno je da kamferol blokira signalne puteve u stanicama raka debelog crijeva, uočena je modulacija MAPK, Akt, NF- $\kappa$ B i dr. signalnih puteva. Kamferol (sam ili u kombinaciji) je uzrokovao smanjenu proizvodnju VEGF i IL-8 (važni regulatori angiogeneze). Molekularno sidrenje pokazalo je da je antitumorski učinak

kamferola (u usporedbi s 3-*O*-glukozidom i 3-*O*-rutinozidom) posljedica odsutnosti glikozilnih skupina [105].

### 2.5.3. Učinak polifenola na NF- $\kappa$ B signalni put

Nuklearni transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B pripada obitelji Rel transkripcijskih faktora, koje aktiviraju različiti podražaji, poput infekcija, proupanih citokina i dr. Sudjeluje u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima, kao što su napredovanje tumora, invazivnost, metastaze, angiogeneza, rezistencija na kemoterapiju te upalni procesi. NF- $\kappa$ B obitelj sastoji se od 5 članova: p65, RelB, c-rel, p105/p50 i p100/p52, koji dijele zajedničke strukturne karakteristike. Svaki od tih proteina građen je od homologne Rel domene, RHD (engl. *Rel homology domain*), koja im omogućava ulazak u jezgru i vezanje na specifična mjesta na DNA te aktivaciju ili transkripciju ciljanih gena [106].

U stanicama kontrolira upalne procese i senzor je za oksidacijski stres. Naime, upalni procesi su povezani s izazivanjem raznih vrsta unutarstaničnog stresa, kao što je oksidacijski stres (primjerice u mitohondriju, ako se radi o metaboličkom upalnom procesu). Kada se naruši homeostaza ROS-a, dolazi do nakupljanja ROS-a u mitohondrijima i citoplazmi, što može dovesti do staničnih oštećenja. NF- $\kappa$ B često funkcionira kao transkripcijski faktor u odgovoru na oksidacijski stres. Međutim, aktivacija NF- $\kappa$ B može potaknuti proizvodnju ROS-a, što dovodi do staničnih oštećenja, što opet potiče aktivaciju NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B potiče i proliferaciju tumorskih stanica tako što stimulira pro-angiogenetske faktore (HIF-1, VEGE i dr.), a s druge strane, NF- $\kappa$ B smanjuje oštećenja DNA i staničnu smrt tako što aktivira razne puteve popravka DNA (npr. homolognom rekombinacijom) [106].

Općenito, NF- $\kappa$ B ima razne uloge u odgovorima na upalu i stres, pa svako narušavanje NF- $\kappa$ B aktivnosti doprinosi nastanku upalnih bolesti i raka. Pri tome, NF- $\kappa$ B uzrokuje ekspresiju gena koji potiču napredovanje staničnog ciklusa, reguliraju apoptozu, potiču staničnu adheziju, angiogenezu i metastaziranje. U pojedinim vrstama raka uočena je abnormalna aktivacija NF- $\kappa$ B, pa ne čudi da NF- $\kappa$ B ima važnu ulogu u formiranju metastaza, angiogeneze i izbjegavanju apoptoze u tumorskim stanicama. Međutim, utvrđeno je da brojni polifenoli reguliraju NF- $\kappa$ B ekspresiju tako što aktiviraju ili inhibiraju epigenetski značajne enzime, a kao prooksidansi generiraju ROS i *down*-reguliraju NF- $\kappa$ B. To su samo neki od učinaka polifenola na NF- $\kappa$ B. Različiti polifenoli (kurkumin, resveratrol, EGCG, klorogena kiselina i dr.) na različite načine moduliraju NF- $\kappa$ B, a posljedica te modulacije je da polifenoli

putem reguliranja NF- $\kappa$ B ispoljavaju antitumorski učinak, inhibiraju kancerogenezu, angiogenezu, metastaze i smanjuju nuspojave lijekova [106].

Mnogi polifenoli mogu regulirati (potisnuti) ekspresiju NF- $\kappa$ B putem aktivacije ili inhibicije enzima povezanih s epigenetikom, kao što su HDACs (engl. *histone deacetylases*), HATs (engl. *histone acetyltransferases*) i DNMTs (engl. *DNA methyl transferases*). Genistein, kurkumin, resveratrol i još neki polifenoli djeluju tako da inhibiraju deacetilaciju histona, dok EGCG, genistein, kurkumin i dr. djeluju tako da inhibiraju acetyliranje histona tijekom epigenetskih modifikacija. Osim toga, EGCG, genistein, likopen, kurkumin i resveratrol inhibiraju DNA metilaciju tako što ometaju aktivnost DNA metiltransferaze. Kurkumin moguće regulira acetylaciju i deacetilaciju putem modulacije oksidacijskog stresa, a sam oksidacijski stres može potaknuti NF- $\kappa$ B put tako što aktivira HATs, potiče ekspresiju proupalnih medijatora i inhibira HDACs. Jedna od podgrupa HDACs su sirutini koji modificiraju metabolizam, upalu, starenje, apoptozu u brojnim patološkim procesima, a mogu i deacetilirati mnoge transkripcijske faktore, npr. NF- $\kappa$ B. Utvrđeno je da polifenoli mogu modulirati sirutin 1 i time potisnuti njihov učinak [107].

Pretpostavlja se da klorogena kiselina, kurkumin, EGCG i resveratrol imaju sličan mehanizam djelovanja, koji je posljedica njihovog anti- i prooksidacijskog djelovanja. Ovi spojevi mogu aktivirati AMPK i *down*-regulirati NF- $\kappa$ B putem modulacije ROS-a. Osim toga, mogu *down*-regulirati IL-8, koji *down*-regulira PTEN. Budući da ovi spojevi mogu aktivirati PTEN, smatra se da je put na kojem se temelji antikancerogeni učinak ovih spojeva NF- $\kappa$ B/IL-8/PTEN/PI3K/Akt. Kada se ponašaju kao antioksidansi i antikancerogeni učinak ostvaruju putem *down*-regulacije stvaranja ROS-a, tada NF- $\kappa$ B signalni put *down*-regulira TNF- $\alpha$ , IL-8, MMP9 i COX-2 (čija bi aktivacija vodila prema nastanku upalnih procesa ili kancerogenezi) te *up*-regulira p53 (koji vodi u apoptozu) i p21 (koji dovodi do zastoja staničnog ciklusa). U slučaju kada se ovi spojevi ponašaju kao prooksidansi i antikancerogeni učinak postižu stvaranjem ROS-a, tada NF- $\kappa$ B *up*-regulira p53 i p21, koji onda rezultiraju apoptozom odnosno zastojem staničnog ciklusa. Trenutno nije jasno koji čimbenici usmjeravaju polifenole da se ponašaju kao anti- ili prooksidansi. Jedan od čimbenika je njihova koncentracija, a drugi koncentracija metalnih kationa, ali se smatra da ovih čimbenika ima još [108].

#### 2.5.4. Učinak polifenola na PI3K/Akt/mTOR signalni put

Fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)/protein kinaze B (Akt) i mTOR su signalni putevi koje aktivira nekoliko staničnih stimulansa, a kontroliraju važne stanične procese (proliferacija, transkripcija, translacija, preživljavanje i rast). mTOR regulira nekoliko staničnih procesa (rast stanica, preživljavanje, metabolizam), a formira dva kompleksa – mTORC1 (inhibira ga rapamicin, kontrolira rast i proliferaciju stanica tako što potiče transkripciju, translaciju, sintezu ribosoma i autofagiju) i mTORC2 (nije osjetljiv na rapamicin, regulira proliferaciju i preživljavanje putem fosforiliranja protein kinaza). Akt inhibira TSC (engl. *tuberous sclerosis complex*), koji ograničava mTORC1 signalizaciju [4].

PI3K/Akt/mTOR putevi su jedni od glavnih puteva preživljavanja koji se aktiviraju u stanicama raka ljudi. U stanica raka dolazi do narušavanja njihove regulacije, kada dolazi do pretjerane ekspresije ili hiperaktiviranja efektorskih proteina, kao i izmjena gena koji kodiraju ove proteine. Zbog česte hiperaktivacije u stanica raka, put PI3K/Akt/mTOR je predmet brojnih istraživanja. Neki polifenoli ciljaju i ovaj put kako bi inhibirali tumore i pokazali antiproliferativne učinke. Hiperaktivacija Akt signalnog puta česta je u nekoliko vrsta raka, a pridonosi izraženoj oksidaciji u mikrookolišu tumora koja je neophodna za prilagodbu tumora. Smatra se da antioksidansi svoju antikancerogenu aktivnost baziraju na mijenjanju mikrookoliša tumora. Neki antioksidansi pokazuju pojačani učinak (sinergizam) kada se kombiniraju. Na primjer, za EGCG i TF utvrđeno je da sinergistički inhibiraju rast HeLa stanica putem inhibicije PI3K/Akt, tako što smanjuju ekspresiju p58 i fosforiliranog Akt. Učinak je jači u slučaju kombinacije ova dva spoja, što bi moglo biti posljedica jače depolimerizacije mikrotubula (pri simultanom vezanju EGCE i TF na tubulin) koja dovodi do jače izraženog zastoja u G2 fazi, većih oštećenja mitohondrija i apoptoze [4].

Li i sur. (2020) ispitali su antitumorski učinak (mehanizam) resveratrola na staničnoj liniji H446 raka pluća. Stanice su tretirane s 40 µg/mL resveratrola (s predtretmanom antioksidansom ili bez njega). Preživljavanje stanica i apoptoza procijenjeni su pomoću MTT-a i protočne citometrije, a ekspresija citokroma c, PI3K/Akt/c-Myc put i nuklearna translokacija faktora koji inducira apoptozu, AIF (engl. *apoptosis inducing factor*), primjenom Western blotta. Promatrane su promjene u sastavu ROS-a i potencijalu mitohondrijske membrane. Utvrđeno je da resveratrol smanjuje preživljavanje H446 stanica, izaziva apoptozu, pojačava ekspresiju citokroma c, inhibira ekspresiju komponenti PI3K/Akt/c-Myc signalnog puta i potiče translokaciju AIF iz citoplazme u jezgru. Predtretman antioksidansom doveo je do obrnutih rezultata, u određenoj mjeri. Autori su

zaključili da resveratrol može smanjiti preživljavanje i potaknuti apoptozu H446 stanica putem PI3K/Akt/c-Myc puta, u čemu sudjeluju oksidacijski stres i depolarizacijski potencijal mitohondrijske membrane [109].

Jiao i sur. (2015) ispitali su *in vivo* i *in vitro* inhibitorni učinak resveratrola na invaziju humanih GICs (engl. *Glioblastoma-Initiating Cells*) putem *down*-regulacije PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signalnog puta. Korištene su brojne metode – imunoflorescencija (da se ispituju osobine GICs *in vitro*, za ispitivanje translokacije f NF- $\kappa$ B p65), MTT (za praćenje rasta stanica), različiti eseji za utvrđivanje invazivnosti tumora i aktivnosti enzima, Western blott. GICs su tretirani resveratrolom (0, 5, 10 ili 20  $\mu$ M) i inkubirani 48 h. U *in vivo* dijelu istraživanja korišteni su 6-tjedana stari NOD/SCID (engl. *non-obese diabetic severe combined immunodeficient*) miševi, u čiji corpus striatum su injektirali GICs. Nakon 7 dana, miševi su podijeljeni u dvije grupe (n = 6): jedna grupa je primala propilen glikol, a druga resveratrol (otopljen u propilen glikolu) jednom na dan tijekom 28 dana. Utvrdili su da resveratrol smanjuje adheziju, invaziju i migraciju GICs, inhibira aktivnost i ekspresiju matriks metaloproteinaza, inhibira aktivaciju PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signalnog puta. Resveratrol je smanjio translokaciju NF- $\kappa$ B tako da se nuklearna koncentracija smanjila a koncentracija u citoplazmi povećala te je inhibirana NF- $\kappa$ B aktivacija. Resveratrol je smanjio fosforilaciju Akt i mTOR, ali nije imao poseban učinak na MAPK signalni put (stoga se fosforilacija ERK 1/2, p38 i JNK puteva nije promijenila). Histološka analiza je pokazala da resveratrol smanjuje i invazivnost GICs *in vivo*, u slučaju tretmana s resveratrolom tumori su bili manje invazivni i imali ovalan oblik. Zaključno, studija ukazuje da resveratrol inhibira invazivnost GICs-a tako što inhibira PI3K/Akt put [110].

Maurya i Vinayak (2017) ispitali su utjecaj kvercetina na miševima s Daltonovim limfomom. Zdravim AKR miševima injektirane su stanice limfoma te je nakon 12 dana od toga krenuo tretman kvercetinom. Miševi su podijeljeni u 4 grupe (n = 6): kontrola (primala je DMSO) i grupe koje su primale kvercetin (25, 50 ili 75 mg/kg) 12 dana, a nakon 18 dana miševi su eutanazirani. Rezultati su pokazali da kvercetin smanjuje fosforilaciju Akt, fosforilaciju PDK1 (kinaza koja je ključna za aktivaciju Akt), povećava razinu tumor supresorskog proteina PTEN (on je negativni regulator Akt signalnog puta) te smanjuje fosforilaciju BAD-a (fosforilacija BAD-a potiče preživljavanje stanica). Modulacija Akt, PDK1 i BAD na sličan način sugerira da kvercetin regulira stanično preživljavanje i apoptozu putem Akt-PDK1-BAD puta. Osim toga, kvercetin smanjuje fosforilaciju GSK-3 $\beta$  (koji modulira staničnu proliferaciju i preživljavanje), smanjuje fosforilaciju mTOR (koji potiče preživljavanje stanica i aktivaciju antiapoptotskih proteina), smanjuje fosforilaciju I $\kappa$ B (koji

aktivira NF- $\kappa$ B, koji aktivira antiapoptotske i upalne enzime), smanjuje angiogenezu, koncentraciju COX-2 (koji sudjeluje u napredovanju stanica raka, regulira upale, proliferaciju i angiogenezu) te smanjuje koncentraciju NO i iNOS. Za sve učinke se pokazalo da su ovisni o dozi te je pri većoj dozi uočen bolji učinak [111].

Castillo-Pichardo i Dharmawardhane (2012) ispitali su molekularne mehanizme primjene resveratrola, kvercetina i katehina u slučaju raka dojke (stanična linija MDA-MB-231, ženke SCID miša) te su ispitali utjecaj ovih spojeva na EGFR. Ženkama su injektirane stanice raka dojke, a tjedan nakon inokulacije životinje su podijeljene u grupe (n = 10-12): kontrolna grupa, kontrolna grupa za gefitinib, grupa koja je primala 5 mg/kg kvercetina, resveratrola i katehina ili 200 mg/kg gefitiniba te grupa koja je primala oboje (jedan dan jedno, drugi dan drugo). Terapiju su primale tijekom 83 dana, a 84-ti dan su eutanazirane. Utvrđeno je da su ovi spojevi inducirali apoptozu stanica raka regulacijom raznih proapoptotskih proteina. Ovi spojevi su smanjili aktivnost Akt, potakli aktivaciju AMPK i inhibiciju mTOR signala u stanica raka dojke. Kombinacija ovih spojeva s gefitinibom (inhibitor tirozin kinaze, primijenjuje se u liječenju nekih vrsta raka) smanjila je preživljavanje stanica raka koje su rezistentne na gefitinib u većoj mjeri nego sami spojevi ili sam lijek. I u slučaju gefitiniba, spojevi su inhibirali Akt i mTOR te aktivirali AMPK. Kombinacija spojeva i gefitiniba se pokazala i *in vivo* učinkovitijom u inhibiciji rasta tumora i metastaza, u usporedbi s individualnim tretmanima. Zaključno, ispitani spojevi usporavaju napredovanje tumora i inhibiraju Akt/mTOR signalizaciju [112].

## 2.6. Nedostatci primjene polifenola u prevenciji raka

Rezultati brojnih *in vitro* i *in vivo* studija pokazuju da polifenoli mogu pomoći u tretiranju nekih vrsta raka. Najviše su proučavani učinci kurkumina, kvercetola, EGCG i resveratrola, a većina njihovih učinaka povezuje se s njihovim antioksidacijskim i protuupalnim svojstvima. Sami mehanizmi djelovanja su brojni i uključuju moduliranje signalnih puteva vezanih za stanično preživljavanje, proliferaciju, diferencijaciju, migraciju, angiogenezu, aktivnosti hormona, anti- i prooksidacijskih enzima te imunoloških odgovora. Međutim, iako imaju obećavajuću ulogu u prevenciji i liječenju raka, primjena polifenola ima i određena ograničenja. Naime, polifenoli često imaju nisku bioraspoloživost (zbog brojnih modifikacija djelovanjem enzima i crijevnih mikroorganizama te zbog slabe topljivosti i nestabilnosti ovih spojeva [113,114]), a mogu stupiti u interakciju s drugim prirodnim spojevima u hrani što utječe na njihovu učinkovitost [115].

U nekim slučajevima ni visoke doze suplemenata u pojedinaca nisu rezultirale značajnom koncentracijom spoja u serumu [113]. Stoga, većina kliničkih istraživanja nije bila učinkovita, a u nekim slučajevima bila je čak i štetna [114]. Bioraspoloživost i učinkovitost ovih spojeva mogla bi se poboljšati kombiniranjem s drugim fitokemikalijama, antikancerogenim lijekovima ili novijim načinima dostave lijeka (npr. nanočestice i liposomi) [115].

Neki metaboliti i kataboliti imaju izraženiji učinak i bolje se apsorbiraju od roditeljske molekule, pa bi i njih trebalo uzeti u obzir. Međutim, polifenoli i metaboliti prolaze i kroz stanični metabolizam, pa „stanična bioraspoloživost“ postaje još jedan parametar koji utječe na njihovu učinkovitost [114].

Sigurnost polifenola još je jedna od ograničenja njihove primjene. Neki izoflavoni (genistein i daidzein) pokazuju nepoželjni učinak na rak, koji je povezan s hormonima (ovi spojevi mogu imitirati hormone nakon ulaska u organizam, zaposjesti hormonske receptore i ometati funkcioniranje hormona). Stoga se primjeni ovih spojeva u slučaju tretmana raka treba pristupiti oprezno [115].

Iako su istraživanja koja se bave ovom tematikom sve brojnija, rezultati ovakvih studija najčešće su nepotpuni i proturječni. Česti nedostaci velikog broja studija su neprecizna koncentracija polifenola u hrani i pićima te nepoznavanje njihove kinetike i doprinosa svake pojedine komponente sumarnom učinku polifenola [115].

### 3. ZAKLJUČAK

Polifenoli, bioaktivni spojevi prisutni u raznom voću, povrću i bilju, imaju veliki potencijal pomoći u prevenciji raka. Putem raznolike bioaktivnosti ovi spojevi doprinose regulaciji važnih staničnih procesa uključenih u kancerogenezu. Nadalje, mogu inhibirati proliferaciju stanica raka i inducirati apoptozu u tumorskim stanicama kontroliranjem ekspresije gena koji su povezani s razvojem stanica raka. Polifenoli se u organizam unose putem hrane (zeleni čaj, voće i povrće, začini), stoga prehrana bogata polifenolima ima pozitivne učinke na zdravlje ljudi.

Bioraspoloživost polifenola ima velik utjecaj na učinkovitost polifenola kao antikancerogenih čimbenika. Stoga daljnja istraživanja koja se bave povećanjem apsorpcije i stabilnosti polifenola daju nadu za njihovo buduće terapijsko primijenjivanje. S druge strane, veliki značaj imaju i njihovi crijevni kataboliti, koji imaju veću dostupnost te su potencijalno odgovorni barem za dio od bioaktivnosti koje se pripisuju polifenolima. Stoga su i ovi spojevi predmet brojnih istraživanja.

U zaključku, polifenoli predstavljaju obećavajuću pomoć u prevenciji raka, obzirom na raznolike mehanizme djelovanja koji su se (in)direktno pokazali učinkovitima. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se optimizirala njihova dostupnost i u potpunosti iskoristio njihov terapijski potencijal.



#### 4. POPIS LITERATURE

1. P. B. Bhosale, S. E. Ha, P. Vetrivel, H. H. Kim, S. M. Kim, G. S. Kim, Functions of polyphenols and its anticancer properties in biomedical research: a narrative review. *Transl Cancer Res.* **2020**, *9*, 7619-7631.
2. R. K. Singla, Ashok K. Dubey, Arun Garg, Ramesh K. Sharma, Marco Fiorino, Sara M. Ameen, Moawiya A. Haddad, Masnat Al-Hiary, Natural polyphenols: Chemical classification, Definition of classes, subcategories and structure. *J. AOAC Int.* **2019**, *102*, 1397-1400.
3. R. Tsao, Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* **2010**, *2*, 1231-1246.
4. M. H. Chairez-Ramirez, K. G. de la Cruz-Lopez, A. Garcia-Carranca, Polyphenols as antitumor agents targeting key players in cancer-driving signaling pathways. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 710304.
5. K. R. Martin, C. L. Appel. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword; *Nutr. Diet. Suppl.* **2009**, *2010*, 1-12.
6. M. Kamenjašević, N. Oršolić, A. Matković, B. R. Matković, Učinkovitost polifenolne prehrane na zdravlje i funkcionalnu sposobnost sportaša i rekreativaca. *Hrvat. Športskomed. Vjesn.* **2017**, *32*, 5-21.
7. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jimenez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am J Clin Nutr.* **2004**, *79*, 727-747.
8. Y. Han, L. Ma, L. Zhao, W. Feng, X. Zheng, Rosmarinic inhibits cell proliferation, invasion and migration via up-regulating miR-506 and suppressing MMP2/16 expression in pancreatic cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *115*, 108878.
9. Oregon state university. Dietary Factors. Phytochemicals. Lignans. URL: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/lignans> (24. 7. 2024.).
10. Viskupičová, J., Ondrejovič, M., Šturdík, E, Bioavailability and metabolism of flavonoids. *J. Food Nutr. Res.* **2008**, *47*, 151-162.
11. S. Adriouch, E. Kesse-Guyot, T. Feuillet, M. Touvier, V. Olie, V. Andreeva, L. K. Fezeu, Total and specific dietary polyphenol intakes and 6-year anthropometric changes in a middle-aged general population cohort. *Int. J. Obes. (Lond).* **2018**, *42*, 310-317.
12. A. Durazzo, M. Lucarini, E. B. Souto, C. Cicala, E. Caiazza, A. A. Izzo, E. Novellino, A. Santini, Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence and human health. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 2221-2243.

13. A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra, Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, e47.
14. A. Niedzwieck, M. W. Roomi, T. Kalinosky, M. Rath, Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients.* **2016**, *8*, 335-338.
15. N. V. Zagorskina, M. Y. Zubova, T. L. Nechaeva, V. V. Kazantseva, E. A. Goncharuk, V. M. Katanskaya, E. N. Baranova, M. A. Aksenova, Polyphenols in plants: structure, biosynthesis, abiotic stress regulation and practical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13874.
16. M. D'Archivio, C. Filesi, R. Vari, B. Scazzocchio, R. Masella, Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 1321-1342.
17. Y. Lin, H-L. Liu, J. Fang, C-H. Yu, Y-K Xiong, K. Yuan. Anti-fatigue and vasoprotective effects of quercetin-3-O-gentibiose on oxidative stress and vascular endothelial dysfunction induced by endurance swimming in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *68*, 290-296.
18. A. O. Adeoye, J. Ojowu, O. O. Daniel, O. O. Olorunsogo, Inhibition of liver mitochondrial membrane permeability transition pore opening by quercetin and vitamin E in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biocheml. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *504*, 460-469.
19. A. Valavanidis, C. Nisiotou, Y. Papageorgiou, I. Kremli, N. Satravelas, N. Zinieris, H. Zygalaiki, Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2358-2365.
20. S. J. Rietjens, A. Bast, G. R. Haenen, New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7609-7614.
21. A. Umeno, M. Takashima, K. Murotomi, Y. Nakajima, T. Koike, T. Matsuo, Y. Yoshida, Radical-scavenging activity and antioxidative effects of olive leaf components oleuropein and hydroxytyrosol in comparison with homovanillic alcohol. *J. Oleo Sci.* **2015**, *64*, 793-800.
22. A. Umeno, M. Horie, K. Murotomi, Y. Nakajima, Y. Yoshida, Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. *Molecules.* **2021**, *21*, 708.
23. C. Nishizawa, V. C. Nguyen, The Comparison between Coffee and Teas on Desmutagenicity, Radical Scavenging Activity and Antioxidative Activity. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* **2001**, *48*, 533-538.
24. G. Oboh, A. O. Ademosun, A. O. Ademiluyi, O. S. Omojokun, E. E. Nwanna, K. O. Longe, In Vitro studies on the antioxidant property and inhibition of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -

- glucosidase, and angiotensin I-converting enzyme by polyphenol-rich extracts from cocoa (theobroma cacao) bean. *Pathol. Res. Int.* **2014**, *2014*, 549287.
25. H. Kameya, M. Ukai, Hydroxyl radical scavenging ability of instant coffee evaluated by ESR spin trapping. *J. Cook. Sci. Jpn.* **2012**, *45*, 33-36.
26. F. S. Predes, A. L. Ruiz, J. E. Carvalho, M. A. Foglio, H. Dolder, Antioxidative and *in vitro* antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, 25.
27. Y. Sueishi, M. Hori, M. Ishikawa, K. Matsu- Ura, E. Kamogawa, Y. Honda, M. Kita, K. Ohara, Scavenging rate constants of hydrophilic antioxidants against multiple reactive oxygen species. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2014**, *54*, 67-74.
28. J. A. Laranjinha, L. M. Almeida, V. M. Madeira, Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: Antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 478-494.
29. Y. Z. Tang, Z. Q. Liu, Chemical kinetic behavior of chlorogenic acid in protecting erythrocyte and DNA against radical- induced oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11025-11029.
30. C.-Y. O. Chen, P. E. Milbury, J. B. Blumberg, Polyphenols in almond skins after blanching modulate plasma biomarkers of oxidative stress in healthy humans. *Antioxidants*, **2019**, *8*, 95.
31. F. Di Meo, G. Fabre, E. H. Anouar, Understanding antioxidant properties of natural compounds at the atomic scale. *J. Serb. Soc. Comput. Mech.* **2013**, *7*, 58-70.
32. Z. Marković, *J. Serbian Soc. Comput. Mech.* **2016**, *10*, 135-150.
33. N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar, The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* **2018**, *10*, 1618.
34. D. Mohar, S. Malik, The sirtuin system: The holy grail of resveratrol? *J. Clin. Exp. Cardiol.* **2012**, *3*, 216.
35. A. Speciale, J. Chirafisi, A. Saija, F. Cimino, Nutritional antioxidants and adaptive cell responses: An update. *Curr. Mol. Med.* **2011**, *11*, 770-189.
36. L. Biasutto, A. Mattarei, M. Zoratti, Resveratrol and health: The starting point. *ChemBioChem.* **2012**, *13*, 1256-1259.
37. S. Tsuda, T. Egawa, X. Ma, R. Oshima, E. Kurogi, T. Hayashi, Coffee polyphenol caffeic acid but not chlorogenic acid increases 5'AMP-Activated Protein Kinase and Insulin-Independent Glucose Transport in Rat Skeletal Muscle. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 1403-1409.

38. S. Akyol, G. Ozturk, Z. Ginis, F. Amutcu, M. Yigitoglu, O. Akyol, *In vivo and in vitro* antineoplastic actions of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Therapeutic perspectives. *Nutr. Cancer.* **2013**, *65*, 1515-1526.
39. J. Kanwar, Recent Advances on Tea Polyphenols. *Front. Biosci.* **2012**, *E4*, 111-131.
40. B. Singh, S. Shankar, R. Sriivastava, Green Tea Catechin, Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): Mechanisms, Perspectives and Clinical. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1807-1821.
41. K. Landis-Piwowar, D. Chen, R. Foldes, T.-H. Chan, Q. P. Dou, Novel Epigallocatechin Gallate Analogs as Potential Anticancer Agents: A Patent Review (2009–Present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 189-202.
42. J. Bae, Role of High Mobility Group Box 1 in Inflammatory Disease: Focus on Sepsis. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 1511-1523.
43. K. Karasawa, Y. Uzuhashi, M. Hurota, H. Otani, A Matured Fruit Extract of Date Palm Tree (*Phoenix dactylifera* L.) Stimulates the Cellular Immune System in Mice. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11287-11293.
44. S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Constantino, D. A. Hafler, FOXP3 + Regulatory T Cells in the Human Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 490-500.
45. M. C. Boissier, E. Assier, J. Biton, A. Denys, G. Falgarone, N. Bessis, Regulatory T Cells (Treg) in Rheumatoid Arthritis. *J. Bone Spine.* **2009**, *76*, 10-14.
46. D. S. Robinson, M. Larche, S. R. Durham, Tregs and Allergic Disease. *J. Clin. Investig.* **2004**, *114*, 1389-1397.
47. C. P. Wong, L. P. Nguyen, S. R. Noh, T. M. Bray, R. S. Bruno, E. Ho, Induction of Regulatory T Cells by Green Tea Polyphenol EGCG. *Immunol. Lett.* **2011**, *139*, 7-13.
48. J. Wang, M. Pae, S. N. Meydani, D. Wu, Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate Modulates Differentiation of Naïve CD4+T Cells into Specific Lineage Effector Cells. *J. Mol. Med.* **2013**, *91*, 485-495.
49. R. Gonzalez, I. Ballester, R. Lopez-Posadas, M. D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin, F. Sanchez de Medina, Effects of Flavonoids and Other Polyphenols on Inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 331-362.
50. T. Sinha, Tumors: Benign and Malignant. *CTOIJ.* **2018**, *10*, 52-54.
51. A. Saini, M. Kumar, S. Bhatt, V. Saini, Cancer causes an treatments. *IJPSR.* **2020**, *11*, 3121-3134.
52. National cancer institute. What is cancer? URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (15. 7. 2024.).

53. K. H. Kim, M-R. Ki, K. H. Min, S. P. Pack, Advanced Delivery System of Polyphenols for Effective Cancer Prevention and Therapy. *Antioxidants*. **2023**, *12*, 1048.
54. E. H. Rodgers, M. H. Grant, The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem Biol Interac*. **1998**, *116*, 213-228.
55. J. L. Liesveld, C. N. Abboud, C. Lu, C. McNair, A. Menon, A. Smith, K. Rosell, A. P. Rapoport, Flavonoid effects on normal and leukemic cells. *Leukemia Res*. **2003**, *27*, 517-527.
56. M. Richter, R. Ebermann, B. Marian, Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling. *Nutr. Cancer*. **1999**, *34*, 88-99.
57. Q. Zhou, H. Pan, J. Li, Molecular insight into potential contribution of natural polyphenols to lung cancer treatment. *Cancers*. **2019**, *11*, 1565.
58. M. Reyes-Farias, C. Carrasco-Pozo, The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *Int. J. Mol. Sci*. **2019**, *20*, 3177.
59. A. K. Srivastava, Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1985**, *131*, 1-5.
60. A. T. Jan, M. R. Kamli, I. Murtaza, J. B. Singh, A. Ali, Q. M. R. Haq, Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits An Overview. *Food Rev Int*. **2010**, *26*, 302-317.
61. A. E. M. Seufi, S. S. Ibrahim, T. K. Elmaghraby, E. E. Hafez, Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. **2009**, *28*, 80.
62. T. Su-Ni, S. Chandan, N. Dara, M. Daniel, S. Sharmila, K. S. Rakesh, The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocatechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Mol. Signal*. **2010**, *5*, 14.
63. S. S. Baghel, N. Shrivastava, r. S. Baghel, P. Agrawal, S. Raiput, A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *WJPPS*. **2012**, *1*, 14-160.
64. G. Du, H. Lin, Y. Yang, S. Zhang, X. Wu, M. Wang, L. Ji, L. Lu, L. Yu, G. Han, Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. *Int. Immunopharm*. **2010**, *10*, 819-826.
65. C. Han, G. Heyan, X. Zhang, The anti-cancer effect of quercetin in renal cancer through regulating survivin expression and caspase 3 activity. *Med One*. **2016**, *1*, 3.
66. E. Braganhol, L. L. Zamin, A. D. Canedo, F. Horn, A. S. K. Tamajusuku, M. R. Wink, C. Salbego, A. M. O. Battastini, Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*. **2006**, *17*, 663-671.

67. D. W. Lamson, M. S. Brignall, Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern. Med. Rev.* **2000**, *5*, 196-208.
68. A. Murakami, H. Ashida, J. Terao, Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 315-325.
69. S. Caltagirone, C. Rossi, A. Poggi, F. O. Ranelletti, P. G. Natali, M. Brunetti, F. B. Aiello, M. Piantelli, Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int. J. Cancer.* **2000**, *87*, 595-600.
70. L. Gibellini, M. Pinti, M. Nasi, J. P. Montagna, S. De Biasi, E. Roat, L. Bertoncelli, E. L. Cooper, A. Cossarizza, Quercetin and cancer chemoprevention. *eCAM.* **2011**, *2011*, 591356.
71. A. J. Smith, J. Oertle, D. Warren, D. Prato, Quercetin: A Promising Flavonoid with a Dynamic Ability to Treat Various Diseases, Infections, and Cancers. *J. Cancer Ther.* **2016**, *7*, 8395.
72. V. K. Panthi, S. Kaushal, B. Adhikari, N. Basnet, D. Chaudhary, R. R. Parajuli, P. Pokhrel, A review of quercetin: Anticancer activity. *INJIRR.* **2020**, *4*, 2636-8919.
73. Y. R. Liao, J. Y. Lin, Quercetin, but not its metabolite quercetin-3-glucuronide, exerts prophylactic immunostimulatory activity and therapeutic antiinflammatory effects on lipopolysaccharide-treated mouse peritoneal macrophages ex vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2872-2880.
74. A. Rivera Rivera, L. Castillo-Pichardo. Y. Gerena, S. Dharmawardhane, Anti-Breast Cancer Potential of Quercetin via the Akt/AMPK/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade. *PLoS One.* **2016**; *11*: e0157251.
75. F. Yang, X. Jiang, L. Song, H. Wang, Z. Mei, Z. Xu, N. Xing, Quercetin inhibits angiogenesis through thrombospondin-1 upregulation to antagonize human prostate cancer PC-3 cell growth in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 1602-1610.
76. X. Zhao, Q. Wang, S. Yang, C. Chen, X. Li, J. Liu, Z. Zou, D. Cai, Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *781*, 60-68.
77. R. Y. Gan, H.- B. Li, Z. Q. Sui, H. Corke, Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 924-941.
78. H.-Q. Luo, M. Xu, W.-T. Zhong, Z.-Y. Cui, F.-M. Liu, K.-Y. Zhou, X.-Y. Li, EGCG decreases the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF and cell growth in MCF-7 breast cancer cells. *J BUON.* **2014**. *19*, 435-439.

79. D.-W. Eom, J. H. Lee, Y.-J. Kim, G. S. Hwang, S.-N. Kim, J. H. Kwak, G. j. Cheon, K. H. Kim, H.-J. Jang, J. Ham, K. S. Kang, Synergistic effect of curcumin on epigallocatechin gallate-induced anticancer action in PC3 prostate cancer cells. *BMB Rep.* **2015**, *48*, 461-466.
80. Q.-Y. Lu, L. Zhang, J. K. Yee, V.-L. W. Go, W.-N. Lee, Metabolic consequences of LDHA inhibition by epigallocatechin gallate and oxamate in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Metabolomics.* **2015**, *11*, 71-80.
81. S. Sur, D. Pal, S. Mandal, A. Roy, C. K. Panda, Tea polyphenols epigallocatechin gallate and theaflavin restrict mouse liver carcinogenesis through modulation of self-renewal Wnt and hedgehog pathways. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *27*, 32-42.
82. P. Anand, C. Sundaram, S. Jhurani, A. B. Kunnumakkara, B. B. Aggarwal, Curcumin and cancer: An „old age“ disease with an „age old“ solution. *Cancer Lett.* **2008**, *267*, 133-164
83. H.-T. Liu, Y.-S. Ho, Anticancer effect of curcumin on breast cancer and stem cells. *Food Sci. Hum.* **2018**, *7*, 134-137.
84. R. Epelbaum, M. Schaffer, B. Vizel, V. Badmaev, G. Bar-Sela, Curcumin and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Nutr. Cancer.* **2010**, *62*, 1137-1141.
85. J. Hejazi, R. Rastmanesh, F. A. Taleban, S. H. Molana, E. Hejazi, G. Ehtejab, N. Hara, Effect of Curcumin Supplementation During Radiotherapy on Oxidative Status of Patients with Prostate Cancer: A Double Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Nutr. Cancer.* **2016**, *68*, 77-85.
86. M. A. Tomeh, R. Hadianamrei, X. A. Zhao, A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1033.
87. M. Cruz-Correa, L. M. Hyland, J. H. Marrero, M. L. Zahurak, T. Murray-Stewart, R. A. Casero Jr., E. A. Montgomery, C. Iacobuzio-Donahue, L. A. Brosens, G. J. Offerhaus, A. Umar, L. M. Rodriguez, F. M. Giardiello, Efficacy and Safety of Curcumin in Treatment of Intestinal Adenomas in Patients with Familial Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology.* **2018**, *155*, 668-673.
88. K. A. Scheckel, S. C. Degner, D. F. Romagnolo, Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J Nutr.* **2008**, *138*, 2098-2105.
89. M. A. Encalada, K. M. Hoyos, S. Rehecho, I. Berasategi, M. G. de Ciriano, D. Ansorena, I. Astiasarán, I. Navarro-Blasco, R. Y. Caverio, M. I. Calvo, Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line. *Plant Foods Hum Nutr.* **2011**, *66*, 328-334.

90. M. S. Hossan, S. Rahman, A. B. M. Bashar, R. Jahan, A. Nahian, M. Rahmatullah, Rosmarinic acid: A review of its anticancer action. *WJPPS*. **2014**, *3*, 57-70.
91. N. Osakabe, A. Yasuda, M. Natsume, T. Yoshikawa, Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*. **2004**, *25*, 549-557.
92. M. A. Mahmoud, T. M. Okda, G. A. Omran, M. M. Abd-Alhaseeb, Rosmarinic acid suppresses inflammation, angiogenesis, and improves paclitaxel induced apoptosis in a breast cancer model via NF3  $\kappa$ B-p53-caspase-3 pathways modulation. *J. Appl. Biomed.* **2021**, *19*, 202-209.
93. N. Lotfi, Z. Yousefi, M. Golabi, P. Khalilian, B. Ghezlbash, M. Montazeri, M. Hossein Shams, P. Zolfaghari Baghbadorani, N. Eskandari, The potential anti-cancer effects of quercetin on blood, prostate and lung cancers: An update. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1077531.
94. L. J. Hernandez Borrero, W. S. El-Deiry, Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathway and therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. **2021**, *1876*: 188556.
95. Y. S. Tan, Y. Mhoumadi, C. S. Verma, Roles of computational modelling in understanding p53 structure, biology, and its therapeutic targeting. *J. Mol. cell biol.* **2019**, *11*, 306-316.
96. J. Hernandez-Valencia, E. Garcia-Villa, A. Arenas-Hernandez, J. Garcia-Mena, J. Diaz-Chavez, P. Gariglio, Induction of P53 Phosphorylation at Serine 20 by Resveratrol Is Required to Activate P53 Target Genes, Restoring Apoptosis in MCF-7 Cells Resistant to Cisplatin. *Nutrients*. **2018**, *10*, 1148.
97. S. Srivastava, R. R. Somasagara, M. Hegde, M. Nishana, S. K. Tadi, M. Srivastava, B. Choudhary, S. C. Raghavan, Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24049.
98. P. J. Moos, K. Edes, J. E. Mullally, F. A. Fitzpatrick, Curcumin Impairs Tumor Suppressor P53 Function in colon Cancer Cells. *Carcinogenesis*. **2004**, *25*, 1611-1617.
99. W. Zhang, H. T. Liu, MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **2002**, *12*, 9-18.
100. A. Keskin, Impact of polyphenolic compounds on the MAPK signaling pathway against carcinogenesis. *J. Clin Pract Res.* **2023**, *45*, 217-221.



101. Z. Zhang, P. Yi, C. Tu, J. Zhan, L. Jiang, F. Zhang, Curcumin Inhibits ERK/c-Jun Expressions and Phosphorylation against Endometrial Carcinoma. *Biomed. Res. Int.* **2019**, *2019*, 8912961
102. L. Monaghan, M. E. Massett. R. P. Bunschoten, A. Hoose, P. A. Pirvan, R. M. J. Liskamp, H. G. Jorgensen, X. Huang, The Emerging Role of H3K9me3 as a Potential Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 705.
103. W. Zhao, X. Zhou, G. Qi, Y. Guo, Curcumin Suppressed the Prostate Cancer by Inhibiting JNK Pathways via Epigenetic Regulation. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2018**, *32*, e22049.
104. Y. Yang, T. Wang, D. Chen, Q. Ma, Y. Zheng, S. Liao, Y. Wang, J. Zhang, Quercetin Preferentially Induces Apoptosis in KRAS-Mutant Colorectal Cancer Cells via JNK Signaling Pathways. *Cell Biol Int* **2019**, *43*, 117–124.
105. I. Riahi-Chebbi, S. Souid, H. Othman, M. Haoues, H. Karoui, A. Morel, N. Srairi-Abid, M. Essafi, K. Essafi-Benkhadir, The Phenolic Compound Kaempferol Overcomes 5-fluorouracil Resistance in Human Resistant LS174 colon Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 195.
106. C. Guan, X. Zhou, H. Li, X. Ma, J. Zhuang, NF-κB inhibitors gifted by nature: The anticancer promise of polyphenol compounds. *Biomed. & Pharmacother.* **2022**, *156*, 113951.
107. A. Mileo, S. Miccadei, Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 6475624.
108. T. Ohishi, S. Hayakawa, N. Miyoshi, Involvement of microRNA modifications in anticancer effects of major polyphenols from green tea, coffee, wine, and curry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *63*, 7148-7179.
109. W. Li, C. Li, L. Ma, F. Jin, Resveratrol Inhibits Viability and Induces Apoptosis in the Small Cell Lung Cancer H446 Cell Line via the PI3K/Akt/c-Myc Pathway. *Oncol. Rep.* **2020**, *44*, 1821-1830.
110. Y. Jiao, H. Li, Y. Liu, A. Guo, X. Xu, X. Qu, S. Wang, J. Zhao, Y. Li, Y. Cao. Resveratrol Inhibits the Invasion of Glioblastoma-Initiating Cells via Down-Regulation of the PI3K/Akt/NF-κB Signaling Pathway. *Nutrients.* **2015**, *7*, 4383-4402.
111. A. K. Maurya, M. Vinayak, Quercetin Attenuates Cell Survival, Inflammation, and Angiogenesis via Modulation of AKT Signaling in Murine T-Cell Lymphoma. *Nutr. Cancer.* **2017**, *69*, 470-480.
112. L. Castillo-Pichardo, S. F. Dharmawardhane, Grape Polyphenols Inhibit Akt/mammalian Target of Rapamycin Signaling and Potentiate the Effects of Gefitinib in Breast Cancer. *Nutr. Cancer.* **2012**, *64*, 1058-1069.

113. A. Lyubitelev, V. Studitsky, Inhibition of Cancer Development by Natural Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10663.
114. X. Wu, M. Li, Z. Xiao, M. Daglia, S. Dragan, D. Delmus, C. T. Vong, Y. Wang, Y. Zhao, J. Shen, S. M. Nabavi, A. Sureda, H. Cao, J. Simal-Gandara, M. Wang, C. Sun, S. Wang, J. Xiao, Dietary polyphenols for managing cancers: What have we ignored? *Trends Food Sci.* **2020**, *101*, 150-164.
115. G. Briguglio, C. Costa, M. Pollicino, F. Giambò, S. Catania, C. Fenga, Polyphenols in cancer prevention: New insights (Review). *Int J Funct Nutr.* **2020**, *1*, 9.

## 5. PRILOG

### 5.1. Popis kratica

4EBP1	4E vezujući protein 1 (engl. <i>4E-binding protein 1</i> )
AIF	engl. <i>apoptosis inducing factor</i>
Akt/AMPK/mTor	engl. <i>Akt/adenosine monophosphate protein kinase/mammalian target of rapamycin</i>
AP-1	engl. <i>Activator Protein-1</i>
Apaf-1	engl. <i>apoptotic protease activating factor 1</i>
ATM	engl. <i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
Bad	engl. <i>Bcl-2-associated death protein</i>
Bak	engl. <i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	engl. <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	engl. <i>B-cell leukemia/lymphoma 2 protein</i>
Bcl-xl	engl. <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bcl-xs	engl. <i>B-cell lymphoma-extra small</i>
BCRP	engl. <i>breast cancer resistance protein</i>
BIM	engl. <i>B-cell lymphoma 2-like protein</i>
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>Body Mass Index</i> )
CD-31	engl. <i>cluster of differentiation 31</i>
c-Jun	engl. <i>Jun-proto-oncogene</i>
c-Myc	engl. <i>cellular myelocytomatosis oncogene</i>
CoA	koenzim A (engl. <i>Coenzyme A</i> )
COX	ciklooksigenaza (engl. <i>cyclooxygenase</i> )
CRE	engl. <i>c-AMP-response element</i>
CTD	C-terminalna regulacijska domena (engl. <i>C-terminal regulatory domain</i> )
DBD	domena za vezanje DNA (engl. <i>DNA-binding domain</i> )
DC	engl. <i>dendritic cell</i>
DMSO	dimetil sulfoksid
DNMTs	engl. <i>DNA methyl transferases</i>
DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (engl. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> )
ECG	epikatehin galat (engl. <i>epicatehin gallate</i> )

EGC	epigalokatehin (engl. <i>epigallocatehin</i> )
EGCG	epigalokatehin-3-galat (engl. <i>epigallocatechin-3-gallate</i> )
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
eNOS	engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ERK 1/2	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
GICs	engl. <i>Glioblastoma-Initiating Cells</i>
Gli1	engl. <i>glioma-associated oncogene homolog 1</i>
GSH	glutation (engl. <i>glutathione</i> )
GSH-Px	glutation peroksidaza (engl. <i>glutathione peroxidase</i> )
HAT	engl. <i>hydrogen atom transfer</i>
HATs	engl. <i>histone acetyltransferases</i>
HDACs	engl. <i>histone deacetylases</i>
HER2-TK	engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2-tyrosine kinase</i>
Hh	engl. <i>Hedgehog</i>
HIF-1 $\alpha$	engl. <i>hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
HMCB1	engl. <i>high mobility group box1</i>
ICAM-1	engl. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	interferon
IKK	engl. <i>inhibitor of kappa kinase</i>
IKK/JNK	engl. <i>inhibitor of kappa kinase/c-Jun amino-terminal kinases</i>
IL	interleukin
I $\kappa$ B	IKK
iNOS	engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i>
JAK/STAT	engl. <i>Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription protein</i>
JAK2	engl. <i>Janus kinase 2</i>
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza (engl. <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
KC	engl. <i>keratinocyte chemoattractant</i>
KRAS	engl. <i>Kirsten rat sarcoma</i>
LDHA	laktat dehidrogenaza A
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>lowdensity lipoprotein</i> )
LOX	lipooksigenaza, (engl. <i>lipoxygenase</i> )
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom (engl. <i>mitogen activated</i> )

	<i>protein kinase)</i>
MCP-1	engl. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDM <sub>2</sub>	engl. <i>mouse double minute 2 homolog</i>
MMPs	metaloproteinaze matriksa (engl. <i>matrix metalloproteinases</i> )
MMPT	engl. <i>mitochondrial membrane permeability transition</i>
MRP1	engl. <i>multidrug resistance protein 1</i>
mTORC1/2	engl. <i>mammalian target of rapamycin complex 1/2</i>
MTT	engl. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>Nicotinamide Adenin Dinucleotide Phosphate</i> )
NFATc3	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-IL6	engl. <i>nuclear factor interleukin-6</i>
NF-κB	nuklearni faktor kappa B (engl. <i>nuclear factor kappa B</i> )
NK .	engl. <i>natural killer</i>
NOD/SCID	engl. <i>non-obese diabetic severe combined immunodeficient</i>
Nrf2	engl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
P-gp	engl. <i>permeability glycoprotein</i>
PI3K/Akt/mTOR	engl. <i>phosphatidylinositide 3-kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin</i>
PKA/CREB/MITF	engl. <i>protein kinase A/cAMP response element binding protein/microphthalmia-associated transcription factor</i>
PKM2	engl. <i>pyruvate kinase isoenzyme type M2</i>
PLA2	engl. <i>phospholipase A2</i>
PPAR <sub>γ</sub>	engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRAP	engl. <i>prolactin receptor associated protein</i>
Prp4B	engl. <i>pre-mRNA processing factor 4B</i>
PSA	engl. <i>prostate specific antigen</i>
PTCH1	engl. <i>patched homolog 1</i>
PTEN	engl. <i>phosphatase tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
qPCR	engl. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RAF	engl. <i>radical adduct formation</i>
RANKL/RANK/OPG	engl. <i>receptor activator of NF-κB ligand/receptor activator of NF-κB/osteoprotegerin</i>
RHD	homologna Rel domena, (engl. <i>Rel homology domain</i> )

RNS	reaktivne dušikove vrste (engl. <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
RT-PCR	engl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS-PAGE	natrij dodecil sulfat i poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis</i> )
SET-PT	engl. <i>single electron transfer- proton transfer</i>
sFRP1	engl. <i>secreted frizzled-related protein 1</i>
SMO	engl. <i>smoothened homolog</i>
SOD	superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i> )
SPLET	engl. <i>sequential proton loss electron transfer</i>
STAT3	engl. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Trg	regulatorne T stanice
TAC	engl. <i>total antioxidant capacity</i>
TAD	domena za transkripcijsku aktivaciju (engl. <i>transcriptional activation domain</i> )
TET	domena za tetramerizaciju (engl. <i>tetramerization domain</i> )
TF	teaflavin
TGF- $\beta$ 1	engl. <i>transforming growth factor <math>\beta</math>1</i>
Th	engl. <i>T helper</i>
TIMP-1	engl. <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1</i>
TLR	TL-receptor (engl. <i>toll-like receptor</i> )
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizirajući faktor alfa (engl. <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> )
TPA	engl. <i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
TSC	engl. <i>tuberous sclerosis complex</i>
TSP-1	trombospondin-1 (engl. <i>thrombospondin-1</i> )
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	faktor rasta vaskularnog endotela (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
Wnt	engl. <i>wingless-related integration site</i>
WT1	engl. <i>Wilms tumor 1</i>
XIAP	engl. <i>x-linked inhibitor of apoptosis protein</i>