

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina MAHER

**TOKSIČNOST KSANTOHUMOLA ZA RAZLIČNE  
VRSTE NORMALNIH IN RAKAVIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina MAHER

**TOKSIČNOST KSANTOHUMOLA ZA RAZLIČNE VRSTE  
NORMALNIH IN RAKAVIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE TOXICITY OF XANTHOTHUMOL ON VARIOUS NORMAL  
AND CANCER CELLS**

GRADUATE THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja, za somentorico prof. dr. Tamaro Lah Turnšek in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentorica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Somentorica: prof. dr. Tamara Lah Turnšek

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor NEKREP  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tamara LAH TURNŠEK  
Nacionalni inštitut za biologijo v Ljubljani

Član: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katarina Maher

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 616-006: 576.33: 547.97 (043) = 863
- KG protirakave snovi/ksantohumol/vpliv koncentracije/živost celic/rak/citotoksičnost/apoptoza
- AV MAHER, Katarina
- SA HERZOG VELIKONJA, Blagajana(mentorica)/LAH TURNŠEK, Tamara (somentorica) / ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2008
- IN TOKSIČNOST KSANTOHUMOLA ZA RAZLIČNE VRSTE NORMALNIH IN RAKAVIH CELIC
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 76 str., 14 pregl., 20 sl., 85 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI Ksantohumol (XN) je najbolj zastopan preniliran flavonoid v ženskih cvetovih hmelja, *Humulus lupulus* L. Mnogi znanstveniki raziskujejo biološke učinke XN in dosedanje rezultati kažejo, da XN deluje kot protirakava učinkovina, saj s svojimi učinki posega v nastanek in razvoj raka. XN so dosedaj označili kot antioksidant, protivnetni dejavnik, zaviralec karcinogeneze, povzročitelj apoptoze, antimikrobno sredstvo in drugo. Namen naše raziskave je bil opredeliti meje citotoksičnosti XN pri večjem številu različnih vrst rakavih in nerakavih humanih celičnih linij in s tem določiti koncentracijsko območje za vsako celično linijo, v katerem XN deluje selektivno citotoksično. Vzrok citotoksičnosti XN je lahko apoptoza, kar smo raziskovali s preučevanjem izražanja določenih pro- in antiapoptotskih genov *bax* in *bcl-2*, z merjenjem aktivnosti izvršiteljskih kaspaz 3 in 7 in z diferencialnim barvanjem morfoloških sprememb celic. S pomočjo testov za določanje viabilnosti smo pokazali, da je meja toksičnosti XN višja za nerakave kot za rakavo spremenjene celice. Dokazali smo, da zaradi različnega izvora celičnih linij prihaja do prekrivanja rezultatov in da je najbolje primerjati celične linije enakega izvora. Pri koncentraciji 60  $\mu\text{M}$  XN preživi približno polovica nerakavih celic, za razliko od rakavih, na katere ima XN zelo toksičen vpliv že pri koncentraciji 40  $\mu\text{M}$  XN. Nizke koncentracije XN še ne povzročajo apoptoze, razlike med celicami pa opazimo pri višanju koncentracije XN. Veliko več rakavih celic se odstrani v procesu apoptoze, pri nerakavih celicah pa je verjetno prisoten drug mehanizem celične smrti ali pa apoptoza poteka po drugi poti kot pri rakavih celicah. Kljub temu, da mehanizmi delovanja XN še niso razjasnjeni, tudi naši rezultati kažejo, da XN v večji meri škodi rakavim celicam. Upamo lahko, da bodo nadaljnja preučevanja delovanja XN potrdila protirakavo učinkovitost XN.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 616-006: 576.33: 547.97 (043) = 863
- CX anticarcinogenic agents/xanthohumol/effect of concentration/cell viability/  
cancer/cytotoxicity/apoptosis
- AU MAHER, Katarina
- AA HERZOG VELIKONJA, Blagajana (supervisor)/LAH TURNŠEK, Tamara (co-  
advisor)/ ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology
- PY 2008
- TI THE TOXICITY OF XANTHOTHUMOL ON VARIOUS NORMAL AND  
CANCER CELLS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 76 p., 14 tab., 20 fig., 85 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB Xanthohumol (XN), is one of the major prenylflavonoids found in the hop plant, *Humulus lupulus* L. Many studies have focused on biological activities of XN, which has been suggested to have cancer chemo-preventive properties. XN is able to inhibit initiation, promotion and progression stages of carcinogenesis. Previous studies indicate that XN acts as antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-infective agent, apoptosis inducer etc. The aim of our study was to define cytotoxicity of XN on various cancer and noncancer human cell lines. One of the reasons for its cytotoxicity is apoptosis, what we have researched by studying expression of several genes related to cancer progression, by determining the caspases' 3 and 7 activity and by differential staining the morphological modifications of the cells. With cytotoxicity assays, we have shown that XN tends to be cytotoxic at lower concentration for cancer cells than for the noncancer cells. Results' overlap is mainly due to different cells' origin, so it is better to compare the cells of the same tissue origin. XN at concentration (10- 40  $\mu$ M) did not affect the viability of noncancer cells, while it showed severe cytotoxic effect on cancer cells already at 40  $\mu$ M. At 10  $\mu$ M concentration XN appears not to trigger apoptosis in any cell lines, but we defined extremely higher apoptosis levels in cancer versus noncancer cells at higher XN concentration (50  $\mu$ M ). Moreover, an alternative mechanism of cell death or a different apoptotic pathway may be present in noncancer cells. Although the mechanisms of activity of XN are not clear yet, the present study suggested that XN might possess anticancer properties and may represent a novel broad-spectrum chemopreventive agent.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM AMINOKISLIN .....	IX
OKRAJŠAVE.....	X
SLOVARČEK .....	XII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 FLAVONOIDI IN KSANTOHUMOL .....	3
2.1.1 Prenilirani flavonoidi iz hmelja.....	4
2.1.2 Ksantohumol (XN).....	5
2.1.3 Izomerizacija XN v IXN.....	5
2.1.4 Hmelj, prenilirani flavonoidi in pivo .....	6
2.2 BIOLOŠKA DOSTOPNOST XN IN VPLIV XN NA PRENAŠALNE PROTEINE.....	6
2.3 KAKO UČINKUJE XN .....	8
2.4 PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT .....	12
2.4.1 Kaspaze.....	13
2.4.1.1 Od kaspaz odvisna apoptoza .....	14
2.4.2 Vloga celičnih organelov v procesu PCD.....	15
2.4.3 Regulacija apoptoze.....	16
2.4.4 Vzroki za razvoj raka.....	17
2.4.5 Od kaspaz neodvisne PCD .....	18
2.4.6 Vpliv XN na apoptozo .....	20
2.4.7 Možganske celice .....	22
2.4.8 Ali je lahko XN nevrozaščitno sredstvo? .....	22
2.5 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA .....	24
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>25</b>
3.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA .....	25
3.1.1 Kemikalije .....	25
3.1.2 Laboratorijska oprema .....	26
3.1.3 Celične kulture.....	27
3.1.3.1 Celična linija U87.....	27
3.1.3.2 Celična linija MiaPaCa-2 .....	28

3.1.3.3	Celična linija NCI H1299 .....	28
3.1.3.4	Celična linija HepG2 .....	28
3.1.3.5	Celična linija NHA .....	29
3.1.3.6	Celična linija NC-NC .....	30
3.1.3.7	Celična linija HUVEC .....	30
3.1.3.8	Celična linija MCF 10A .....	30
3.2	METODE DELA .....	32
3.2.1	<b>Gojenje in presajanje celičnih linij <i>in vitro</i></b> .....	<b>32</b>
3.2.2	<b>Zamrzovanje in odmrzovanje celic</b> .....	<b>33</b>
3.2.3	<b>Štetje živih celic</b> .....	<b>34</b>
3.2.4	<b>Test citotoksičnosti</b> .....	<b>34</b>
3.2.4.1	Test MTT .....	34
3.2.4.2	Test MTS .....	35
3.2.5	<b>Testi za določanje stopnje apoptoze</b> .....	<b>36</b>
3.2.5.1	Diferencialno barvanje morfoloških sprememb celic .....	37
3.2.5.2	Izražanje genov <i>bax</i> in <i>bcl-2</i> .....	39
3.2.5.2.1	Izolacija RNA z reagentom TRIZOL .....	39
3.2.5.2.2	Merjenje koncentracije RNA .....	40
3.2.5.2.3	Prepis RNA v cDNA .....	41
3.2.5.2.4	Kvantitativna PCR .....	41
3.2.5.3	Določanje aktivnosti izvršiteljskih kaspaz 3 in 7 .....	44
3.2.6	<b>Statistična obdelava rezultatov</b> .....	<b>45</b>
4	<b>REZULTATI</b> .....	<b>46</b>
4.1	CITOTOKSIČNOST KSANTOHUMOLA .....	46
4.2	VPLIV KSANTOHUMOLA NA APOPTOZO .....	51
4.2.1	<b>Diferencialno barvanje morfoloških sprememb celic</b> .....	<b>51</b>
4.2.2	<b>Izražanje genov</b> .....	<b>53</b>
4.2.3	<b>Aktivnost kaspaz</b> .....	<b>54</b>
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>56</b>
5.1	RAZPRAVA .....	56
5.1.1	<b>Citotoksičnost ksantohumola</b> .....	<b>56</b>
5.1.2	<b>Vpliv ksantohumola na apoptozo</b> .....	<b>58</b>
5.2	SKLEPI .....	62
5.3	SMERNICE ZA PRIHODNOST .....	63
6	<b>POVZETEK</b> .....	<b>64</b>
7	<b>VIRI</b> .....	<b>66</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Različne vrste programirane celične smrti (Mathiasen in Jäättelä, 2002: 213). ...	13
Preglednica 2. Primerjava kaspaz s cisteinskimi katepsini (Turk in Stoka, 2007: 2765) .....	20
Preglednica 3. Uporabljene kemikalije.....	25
Preglednica 4. Uporabljena oprema.....	26
Preglednica 5. Gojišča za izbrane celične linije .....	31
Preglednica 6. Uporabljeni kompleti reagentov. ....	32
Preglednica 7. Uporabljeni sonde in začetni oligonukleotidi za kvantitativno PCR .....	32
Preglednica 8. Gostote nasajenih celic za test MTT.....	35
Preglednica 9. Gostote nasajenih celic za diferencialno barvanje morfoloških sprememb celic.....	37
Preglednica 10. Kriteriji za določanje stanja celic po barvanju z AO/EtBr (Hreljac, 2004: 25) .....	39
Preglednica 11. Reakcijska mešanica za 50 mikrolitrsko reakcijo za sintezo cDNA .....	41
Preglednica 12. Specifični začetni oligonukleotidi in sonde za kvantitativno PCR.....	42
Preglednica 13. Reakcijska mešanica za 10 mikrolitrsko reakcijo Q-PCR.....	42
Preglednica 14. Gostote nasajenih celic za test »ApoONE« .....	44



## KAZALO SLIK

Slika 1. Hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> L.) (Stevens in Page, 2004: 1327).....	4
Slika 2. Izomerizacija XN v IXN v kislem okolju. ....	5
Slika 3. Od kaspaz neodvisne signalne poti, ki vodijo v permeabilizacijo mitohondrijske membrane (Mathiasen in Jäättelä, 2002: 217).....	19
Slika 4. Potencialne tarče XN, ki sprožijo apoptozo v humanih črevesnih rakavih celicah (Pan in sod., 2005: 842) .....	21
Slika 5. Celična linija U87.....	28
Slika 6. Celična linija HepG2 .....	29
Slika 7. Celična linija NHA.....	29
Slika 8. Celična linija MCF 10A .....	30
Slika 9. Struktura MTT in njegov formazanski produkt (Protokol test MTT: 10G-Pos-04-01. Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka).....	35
Slika 10. Struktura MTS tetrazolijeve soli in njen formazanski produkt (Protokol Promega TB169: »CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay«) .....	36
Slika 11. Potek verižne reakcije s polimerazo (PCR).....	43
Slika 12. Viabilnost rakave celične linije U87 in nerakave celične linije NHA v odvisnosti od XN v naraščajočih koncentracijah.....	46
Slika 13. Viabilnost nerakavih celičnih linij NHA, NC-NC, HUVEC in MCF 10A v odvisnosti od XN v naraščajočih koncentracijah.....	47
Slika 14. Viabilnost rakavih celičnih linij U87, MiaPaCa-2, NCI H1299 in HepG2 v odvisnosti od XN v naraščajočih koncentracijah .....	48
Slika 15. Povprečne koncentracije XN, pri kateri preživi 50 % celic (LD <sub>50</sub> ).....	49
Slika 16. LD <sub>50</sub> , določen z intervali zaupanja.....	50
Slika 17. Različne stopnje viabilnosti celic po barvanju z AO/EtBr (Hreljac, 2004: 30) .....	51
Slika 18. Delež apoptotskih celic pri celičnih linijah NHA, HUVEC in U87 po 24 urah inkubacije s XN v koncentraciji 10 in 50 μM .....	52
Slika 19. Razmerje stopnje izražanja genov <i>bax/bcl-2</i> v odvisnosti od naraščajoče koncentracije XN.....	53
Slika 20. Aktivnost kaspaz 3 in 7 različnih celičnih linij, izmerjena s testom »ApoONE«	54

## SEZNAM AMINOKISLIN

<b>AMINOKISLINA</b>	<b>OKRAJŠAVA</b>
Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginska kislina	Asp
Cistein	Cys
Glutaminska kislina	Glu
Glutamin	Gln
Glicin	Gly
Histidin	His
Izolevcin	Ile
Levcin	Leu
Lizin	Lys
Metionin	Met
Fenilalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Treonin	Thr
Triptofan	Trp
Tirozin	Tyr
Valin	Val

## OKRAJŠAVE

A	absorbanca
ABC	ATP vezavna kasetna (ATP-binding cassette)
AIF	indukcijski faktor apoptoze (apoptosis inducing factor)
AK	aminokislina
AO/EtBr	akridin oranžno/etidijev bromid (acridine orange/ethidium bromide)
APAF-1	aktivacijski faktor 1 apoptozne proteaze (apoptotic protease activating factor 1)
ATCC	American Tissue Culture Collection
ATP	adenozin trifosfat
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
CTL	citotoksični T limfocit
DD	domena smrti (death domain)
DED	efektorska domena smrti (death effector domain)
DEPC	dietil pirokarbonat
DMEM	osnovni medij za gojenje celičnih kultur (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMEM/F12	osnovni medij za gojenje celičnih kultur (Dulbecco's modified Eagle's medium z dodatkom F12 (1:1))
DMSO	dimetilsulfoksid (dimethylsulfoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
DSMZ	Nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
dUTP	deoksiuridin trifosfat
EDTA	etilendiamintetraacetna kislina
EGF	epidermski rastni dejavnik (epidermal growth factor)
ER	endoplazemski retikulum (endoplasmic reticulum)
FADD	protein, ki se veže na Fas in vsebuje domeno smrti (Fas associating protein with death domain)
FBS	serum govejega zarodka (fetal bovine serum)
HS	konjski serum (horse serum)
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (high-performance liquid chromatography)
IAP	inhibitor proteinov apoptoze (inhibitor of apoptosis protein)
IQ	heterociklični amin 2-amino-3-metilimidazol(4,5-f)kinolin (heterocyclic amine 2-amino-3-metylimidazole (4,5-f)quinoline)
IXN	izoksantohumol
LD <sub>50</sub>	letalna doza 50
LDL	nizkomolekularni lipoprotein (low-density lipoprotein)
MEM	osnovni medij za gojenje celičnih kultur (minimum essential medium)

MTS	3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3 karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij
MTT	1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid
NEAA	neesencialne aminokislina ( <u>n</u> on <u>e</u> ssential <u>a</u> mino <u>a</u> cids)
celice NK	celice ubijalke ( <u>n</u> atural <u>k</u> iller cells)
NO	dušikov oksid
PA	pozno apoptotske celice
PBS	fosfatni pufer ( <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCD	programirana celična smrt ( <u>p</u> rogrammed <u>c</u> ell <u>d</u> eath)
PCR	verižna reakcija s polimerazo ( <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
pKa	potenca ionizacijske konstante kisline
PMS	fenazin metosulfat ( <u>p</u> henazine <u>m</u> etho <u>s</u> ulphate)
Q-PCR	kvantitativna PCR ( <u>q</u> uantitative - PCR)
QR	kinonska reduktaza ( <u>q</u> uinone <u>r</u> eductase)
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti ( <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
RPMI 1640	osnovni medij za gojenje celičnih kultur, poimenovan po inštitutu, kjer so ga razvili: <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
tBOOH	tert- butil- hidroperoksid (tert-butyl hydroperoxide)
pufer TE	Tris, EDTA
TNF	dejavnik tumorske nekroze ( <u>t</u> umour <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor)
UDPGA	uridin 5'-difosfoglukuronska kislina
UV	ultravijolično
VEGF	vaskularni endotelijski rastni dejavnik ( <u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
vrt/min	vrtljajev na minuto
XN	ksantohumol ( <u>x</u> anthohumol)
ZA	zgodnje apoptotske celice

## SLOVARČEK

### Ksantohumol

Naravna snov, preniliran flavonoid, ki se nahaja v ženskih cvetovih hmelja.

### Neoplazma

Tumor

### Neoplastičen

Nanašujoč se na neoplazmo.

### Normalna nerakava celična linija

Pojem normalna nerakava celična linija (kasneje le nerakava) se v naši raziskavi nanaša na nesmrtno, a nerakavo spremenjene celične linije z normalnim kariotipom. Gre za pretvorbo normalnih sesalskih celic v nesmrtno, kar je lahko spontana posledica delovanja virusa, posledica vnosa določenega gena ali aktivacija že obstoječega gena. Te celice se razlikujejo od normalnih celic (brez genskih sprememb) po tem, da so izgubile kontaktno inhibicijo in se lahko prekomerno delijo, kar je sicer značilnost rakavih celičnih linij.

## 1 UVOD

Raziskovanje in odkrivanje novih naravnih spojin, med katerimi so tudi flavonoidi z antimikrobno, antioksidativno in protirakavo aktivnostjo, je v današnjem času v porastu. Predvsem zaradi vedno večjega zanimanja potrošnikov za naravne zaščitne snovi in naraščajočega števila proti antibiotikom odpornih sevov bakterij. Flavonoidi so polifenolne spojine, ki jih najdemo v rastlinah. Rastline ščitijo pred oksidacijskimi poškodbami tkiva in škodljivimi mikroorganizmi. Pripisujemo jim antioksidacijske lastnosti, saj nevtralizirajo proste radikale in ščitijo pred razvojem bolezni, tudi raka. Ksantohumol (3'-(3,3-dimetil alil)-2',4',4'-trihidroksi-6'-metoksihalkon) je glavni prenilflavonoid hmelja (*Humulus lupulus* L.). Nahaja se v cvetovih ženskega dela rastline kot sekundarni metabolit. Hmelj je trajnica, ki jo v veliki meri gojijo v Evropi in Severni Ameriki, saj se cvetovi ženskega dela rastline uporabljajo pri varjenju piva. Hmelj pivu oplemeniti okus, stabilizira peno in doda grenkobo. Nedavne raziskave so potrdile, da ima ksantohumol (XN) širok spekter protirakavega delovanja (Stevens in Page, 2004), saj inhibira metabolno aktivacijo prokarcinogenov (Miranda in sod., 2000c), inducira encime, ki delujejo protirakavo (Gerhäuser in sod., 2002), inhibira rast tumorja v zgodnji fazi, preprečuje delitev celic v napredovani fazi (Miranda in sod., 1999), je selektivno citotoksičen za tumorje v hipoksičnih okoljih (Goto in sod., 2004), imel pa naj bi tudi vlogo v apoptozi (Gerhäuser in sod., 2002). Na trgu je že danes veliko komercialno dostopnih flavonoidov v obliki tablet in kapsul, ki se prodajajo kot prehranska dopolnila. Za klinično uporabo flavonoidov, tudi XN, bo potrebno natančno poznavanje mehanizmov delovanja in njihove citotoksičnosti.

Rak je splošno ime za obsežno skupino različnih bolezni, katerih glavna značilnost je nenadzorovana rast spremenjenih, rakavih celic. Ker je življenjska doba večine celic omejena, je celična delitev, s katero nastajajo nove celice, nujna za obnavljanje tkiv in za ohranitev zdravega organizma. Včasih pa lahko zaradi različnih vzrokov, kot so izmikanje regulaciji celičnega cikla, neobčutljivost na rastne inhibitorne signale, izogibanje celični smrti in nesposobnost staranja, pride do prekomerne delitve in kopičenja celic, kar povzroči nastanek tumorja (Hanahan, 2000).

Najpogostejša in dobro definirana oblika programirane celične smrti je apoptoza (Kerr in sod, 1972), ki je nujna za embriološki razvoj, delovanje imunskega sistema in vzdrževanje

homeostaze tkiv večceličnih organizmov (Jacobson in sod., 1997). V nepravilno podvojeni ali poškodovani celici se inducira pot programirane celične smrti in tako prepreči nadaljnje podvojevanje, kar bi lahko privedlo do kopičenja poškodb. Rakave celice so razvile sposobnosti izogibanja apoptotskim mehanizmom, zato se kljub poškodbam neomejeno delijo. Okvare na poti celične smrti so poglobitni znaki za razvoj raka. Čeprav je odpornost proti apoptozi tesno povezana s tumorigenezo, se lahko smrt tumorskih celic aktivira tudi preko neapoptotskih poti, kot so nekroza, avtofagija, staranje in drugo.

Preizkuša se veliko število spojin, ki bi selektivno uničevale rakave celice in preprečevale njihovo širjenje. Obstaja nekaj naravnih produktov, ki so jih pridobili iz rastlin (fitokemična sredstva) in so potencialno uporabna kot protirakava sredstva. V trenutni uporabi so paklitaksel (Taxol), vinkristin (Oncovin), podofilotoksin in kaptotekin (Pezutto, 1997).

Spodbudni rezultati najrazličnejših raziskav, kliničnih preizkusov, testiranj *in vivo* in *in vitro* pa bi lahko uvrstili tudi XN med zdravilne učinkovine.

## 2 PREGLED OBJAV

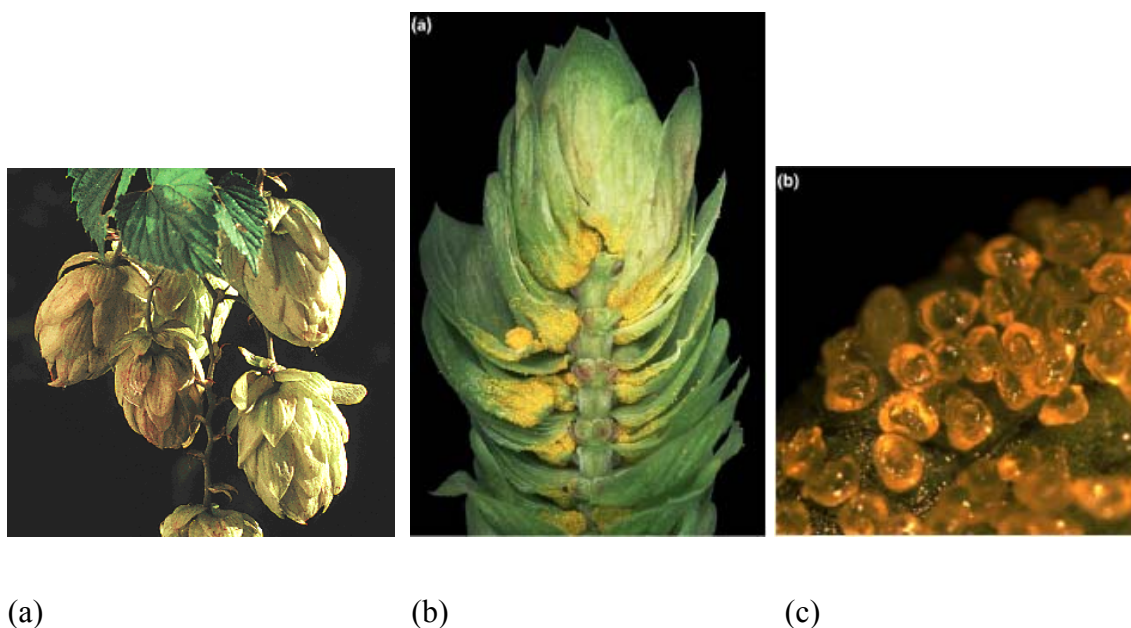
### 2.1 FLAVONOIDI IN KSANTOHUMOL

Hrana ljudi je pogost vir mutagenih snovi (mikotoksini, aditivi, ostanki pesticidov, težke kovine idr.), ki povzročajo napake DNA, zato je težnja po odkrivanju naravnih substanc, ki izvirajo iz rastlin in imajo potencialno kemopreventivno in terapevtsko vlogo, vse večja. Ena izmed skupin s potencialno antitumorsko vlogo so flavonoidi, bodisi sintetični ali naravni, ki so prisotni skoraj v vseh rastlinah, koncentrirani v semenih, lupini, lubju in cvetovih ter so pomembni za rast rastline (Hodek in sod., 2002; Ren in sod., 2003). Zaradi tega so flavonoidi prisotni tudi v živilih, pridobljenih iz rastlin, kot so olivno olje, čaj, rdeče vino, pivo in ostalih (Ishige in sod., 2001). Ren in sod. (2003) ocenjujejo, da človek na dan zaužije nekaj sto miligramov vseh flavonoidov. Osnovna kemijska struktura flavonoidov sta dva benzenova obroča, ki sta povezana s heterocikličnim piranom ali s pirenskimi obročem. Strukturne razlike med različnimi razredi flavonoidov se kažejo v stopnji oksidacije centralnega C obroča (Rice-Evans, 2001), v številu in položaju fenolnih hidroksilnih in metoksilnih skupin in njihovih substituentov (Miranda in sod., 1999; Rice-Evans, 2001). Flavonoide sestavljajo različni kemijski razredi spojin, zato jih lahko razdelimo v sedem glavnih podskupin: **flavoni** (banzoflavon, naftoflavon, apigenin), **izoflavoni** (genistein), **flavanoni** (naringenin, izoksantohumol (IXN)), **flavanoli** (katekin), **halkoni** (ksantohumol), **flavonoli** (kvercetin), **antocijanini** (cianidin) (Moon in sod., 2006). Biološka aktivnost halkonov je odvisna od njihove kemijske zgradbe. Flavonoidom pripisujejo antigenotoksično, antibakterijsko, antiviralno, protivnetno, protiangiogeno, protibolečinsko, antialergeno, antimutageno, antioksidantno in protirakavo delovanje, imajo pa tudi citostatične, apoptotske, hepatozaščitne, estrogene in antiestrogene značilnosti (Hodek in sod., 2002; Ren in sod., 2003). Najmočnejšo antitumorsko delovanje kaže 3'-metil-3-hidroksil-halkon (Miranda in sod., 1999). Zato imajo lahko ugoden vpliv na zdravje in bi jih lahko označili kot možne kemopreventivne ali terapevtske dejavnike proti raku (Ren in sod., 2003). Po drugi strani pa so absorpcija, metabolizem in izločanje flavonoidov pri ljudeh še slabo raziskani. Mikroorganizmi lahko v prebavnem traktu hidrolizirajo na sladkorje vezane flavonoide in tako pospešijo njihovo absorpcijo, vendar mikroorganizmi istočasno tudi razgrajujejo flavonoide do fenolnih kislin. (Hodek in sod., 2002; Hollman in Katan, 1999).



### 2.1.1 Prenilirani flavonoidi iz hmelja

Prenilirani flavonoidi imajo, za razliko od nepreniliranih, flavonoidni obroč nadomeščen s prenilnimi ali geranilnimi skupinami. Tako se poveča lipofilnost molekule, zaradi česar imajo te spojine visoko afiniteto do bioloških membran (Botta in sod., 2005). Prenilirani hmeljevi flavonoidi se izločajo skupaj z grenkimi kislinami (grenčinami) in eteričnimi olji v žlezni trihomah (lupulinske žleze), ki so na površini storžnih listov in na spodnji površini mladih zelenih listov ženskega dela rastline (slika 1) (Stevens in Page, 2004). Biosinteza flavonoidov vključuje prenilacijo in O-metilacijo poliketidnega intermedijata halkanaringenina. Nedavno so iz hmelja izolirali 6 halkonov (npr. ksantohumol) in 3 flavanone (npr. izoksanthumol). Halkoni se enostavno pretvorijo v flavanone ali s kemično reakcijo v kislem okolju ali encimsko s halkan izomerazo (Miranda in sod., 1999). V hmeljevi smoli je v največji meri zastopan preniliran halkan XN; predstavlja 80-90 % flavonoidov v hmelju, kar pomeni od 0,1 do 1 % suhe teže hmelja (Miranda in sod., 2000b; Yilmazer in sod., 2001b; Stevens in Page, 2004).



**Slika 1. Hmelj (*Humulus lupulus* L.)** (Stevens in Page, 2004: 1327). (a) Storžki ženskega dela rastline. (b) Lupulinske žleze ženskih storžkov rastline *H. lupulus*. Grenke kisline in prenilflavonoidi so prisotni v rumenih trihomah, ki jih imenujemo lupulinske žleze in pokrivajo ovršne liste hmeljevih storžkov. (c) Povečana lupulinska žleza na ovršnem listu.

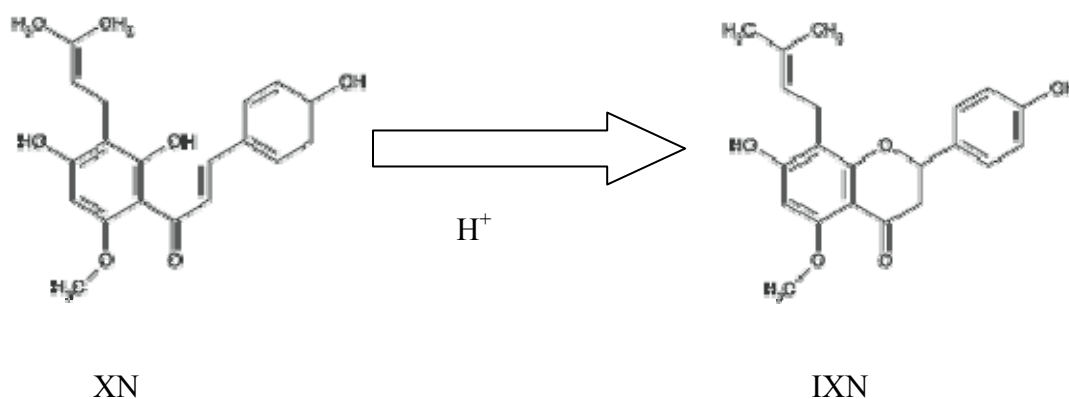
### 2.1.2 Ksantohumol (XN)

Ksantohumol [v grščini xantho pomeni rumen] (3'-(3,3-dimetil alil)-2',4',4-trihidroksi-6'-metoksihalkon) je eden izmed najpomembnejših preniliranih flavonoidov iz hmelja zaradi mnogih bioloških aktivnosti (Yilmazer in sod., 2001b; Stevens in Page, 2004). XN je verjetno obrambna snov hmelja pred insekti, ki se hranijo na ženskih storžkih in tako ščiti tudi semena. Ksantohumol so odkrili leta 1913 (Powers in sod., 1913, cit. po Stevens in Page, 2004), a so njegove zdravilne učinke začeli raziskovati šele pred 10 leti. Sedaj ga označujejo kot možno protirakavo učinkovino, ki deluje v več stadijih pri razvoju raka (Gerhäuser in sod., 2002; Stevens in Page, 2004; Miranda in sod, 1999)

XN ekstrahiramo s kloroformom ali acetonom, ki raztopita smole. Ekstrakt vsebuje različne grenke kisline in prenilflavonoide. Surov XN nato izoliramo s kolonsko kromatografijo, z uporabo metanola kot eluenta in očistimo s HPLC (Stevens in Page, 2004).

### 2.1.3 Izomerizacija XN v IXN

Večina halkonov v smoli hmelja vsebuje prosto 2'-hidroksi skupino in zato lahko le-ti izomerizirajo v pripadajoče flavanone (Stevens in Page, 2004). Po oralnem zaužitju želodčna kislina povzroči izomerizacijo XN v IXN (slika 2).



Slika 2. Izomerizacija XN v IXN v kislem okolju.

#### 2.1.4 Hmelj, prenilirani flavonoidi in pivo

Pivo je eno izmed najbolj priljubljenih alkoholnih pijač in bi lahko predstavljalo dober medij za povečan vnos naravnih snovi z antioksidantskimi in zdravju koristnimi lastnostmi, kar pa ne bi smelo vključevati zaužitja prekomernih količin alkohola. Kljub temu, da je XN glavni prenilflavonoid v hmelju, je v pivu zastopan v majhnih količinah, zaradi termične izomerizacije halkonov v flavanone med procesom varjenja, ko XN prehaja v IXN (Stevens in Page, 2004; Gerhäuser in sod., 2002). Vsebnost IXN v pivu je približno 10 do 20 krat višja od vsebnosti XN. Izmerili so, da se koncentracija IXN giblje med  $0,74 \pm 0,5$  mg/L, koncentracija XN pa  $0,08 \pm 0,03$  mg/L ( $0,23 \pm 0,08$   $\mu$ M) (Gerhäuser in sod., 2002). Poleg izomerizacije je delež XN v pivu zmanjšan tudi zaradi nepopolne ekstrakcije in adsorpcije na netopne proteine slada ter kvasovke med fermentacijo piva (Botta in sod., 2005). Miranda in sod. (1999) so pokazali, da tudi IXN inhibira celično rast različnih človeških rakavih celičnih linj in tudi inhibira aktivnost CYP1A2 *in vitro* v mikrosomih (Miranda s sod., 2000c). Koncentracija XN v pivih je nizka, izjema je posebno s XN obogateno pivo, ki ga pridobivajo s »Xan-tehnologijo« (Wunderlich in sod, 2005). Kljub nezadostnim raziskavam o vplivu na zdravje ljudi, je to pivo že komercialno dostopno ponekod v Nemčiji. Dnevni vnos prenilflavonoidov (približno 0,14mg) je relativno majhen v primerjavi s celotnim deležem polifenolov v pivu. Zato Stevens in Page (2004) trdita, da prenilflavonoidi iz piva zelo malo prispevajo k antioksidacijskim lastnostim piva. Zanimivo pa je, da so prenilflavonoidi, za razliko od drugih polifenolov v pivu, bolj lipofilni in bi bili lahko učinkoviti antioksidanti na lipofilnih površinah kot so membrane in lipoproteini (Stevens in sod, 2003). Zaradi hidrofobne narave XN pa bi ga lahko vključili v živila z veliko vsebnostjo maščob, na primer v margarino, maslo ipd.

#### 2.2 BIOLOŠKA DOSTOPNOST XN IN VPLIV XN NA PRENAŠALNE PROTEINE

Ugodne lastnosti XN bi se lahko izrazile šele ob dobri dostopnosti za celice, kar pomeni, da je potrebno preučiti tudi metabolizem XN. V podgane so oralno vnesli 50 mg XN/kg teže podgane. Ugotovili so, da je delež nerazgrajenega XN v urinu podgan zelo nizek. Ti poskusi so razkrili, da je biodostopnost XN po oralnem zaužitju zelo nizka, najverjetneje zaradi intenzivnega metabolizma črevesnih mikroorganizmov (Stevens in Page, 2004). Potrebno je raziskati, kako se XN v telesu razgradi in na katere metabolite razpada, saj so lahko določeni metaboliti citotoksični za normalne sesalske celice. Yilmazer in sod.

(2001a) so nadalje pokazali, da ima glukuronidacija pomembno vlogo pri metabolizmu XN, saj so dokazali, da se XN ob prisotnosti CYP-inducirajočih faktorjev (UDPGA) v podganjih in humanih jetrnih mikrosomih pretvarja v monoglukuronide s potencialnimi antioksidantskimi in estrogenimi značilnostmi, glukuronidi pa lahko celo aktivirajo celice NK. Metaboliti XN pa bi lahko kazali tudi protimikrobni in protimalarijski potencial, kar je raziskoval Herath (2003). Plazar in sod. (2008) pa v svoji raziskavi niso dodali kofaktorja UDPGA v mikrosome in so ugotovili (XN ni razpadel na metabolite), da XN inhibira CYP1A aktivnost. Možno je, da metaboliti XN za razliko od XN ne zmanjšajo aktivnosti ali izražanja CYP encimov v podganjih jetrnih rezinah, kar pa bi bilo potrebno še podrobneje raziskati (Plazar in sod., 2008). Z nedavno raziskavo so skušali raziskati črevesno prepustnost, ki je omejujoč dejavnik biodostopnosti XN (Pang in Nikolic, 2007). Ugotovili so, da je prepustnost črevesnih epitelnih celic za XN visoka, a je le enosmerna. Kljub temu, da XN hitro vstopa v celice Caco-2, ostane v celicah ujet in zelo počasi izhaja. Ugotovili so, da se z inhibicijo prenašalnih proteinov vnos XN pravzaprav poviša, kar napeljuje na domnevo, da mora v celicah Caco-2 obstajati aktivna črpalka za vnos XN. Po vstopu v celico se XN ne veže na celične membrane in ne prehaja v organele. Kar 94 % XN se zadrži v citosolu, vezanega na citosolne proteine. Znano je, da se XN kovalentno veže na citosolni protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) preko reakcije med Keap-1-cistein-sulfhidrilno skupino in  $\alpha$ - $\beta$  nenasičenim ketonom XN. Alkilacija Keap1 s XN pa je tudi eden od mehanizmov protirakavega delovanja XN (Pang in Nikolic, 2007). Rezultat interakcije citosolnega proteina Keap1 s transkripcijskim faktorjem Nrf2 (Nuclear factor-E<sub>2</sub>-related factor 2) je zmanjšano izražanje genov, ki nosijo zapise za proteine, ki ščitijo celice. Alkilacija ene ali večih cisteinskih sulfhidrilnih skupin človeškega Keap1 pa vodi v povišano jedrno koncentracijo Nrf2, to poviša izražanje genov, kar preprečuje razvoj degenerativnih bolezni, kot je rak (Luo in sod., 2007). V novejši raziskavi so preučevali, kako lahko različni flavonoidi, tudi XN, uravnavajo vnos in prepustnost substratov, ki se prenašajo s prenašalnimi proteini z multiplo odpornostjo, preko transportnega sistema Caco-2 celic (Rodriguez-Proteau in sod., 2006). Visoke koncentracije flavonoidov v črevesu lahko inhibirajo metabolizem in absorpcijo določenih zdravil, nutrientov in ksenobiotikov (Kuo in sod., 1998). Določeni flavonoidi lahko uravnavajo aktivni transport izčrpanja snovi pri rakavih celicah z multiplo odpornostjo (Rodriguez-Proteau in sod., 2006). Veliko zeliščnih preparatov vsebuje bioaktivne snovi,

kot na primer flavonoide, ki lahko vplivajo na absorpcijo določenih zdravil. Taki dodatki, ki bi zvišali biodostopnost, na primer protirakavih zdravil in imunosupresivov, bi bili lahko zelo koristni za zdravje. Po drugi strani pa obstaja veliko zdravil z zelo ozko specifičnostjo (npr. digoksin). Prehranski dodatki bi lahko preveč pospešili njihovo absorpcijo, kar bi vodilo v nenormalno visok nivo zdravila v krvi. Ugotovili so, da se lahko XN veže na P-glikoprotein in inhibira vnos ciklosporina (imunosupresiv) ne pa digoksina (zdravilo za srčne okvare) (Rodriguez-Proteau in sod., 2006). Inhibicija P-glikoproteina zaradi delovanja flavonoidov je lahko pomembna za zmanjšanje multiple odpornosti rakavih celic, medtem ko lahko stimulacija transporterjev multiple odpornosti zmanjša znotrajcelične koncentracije karcinogenov in s tem zmanjša možnost razvoja raka (Rodriguez-Proteau in sod., 2006). V raziskavi je XN najbolj učinkovito zmanjšal prehajanje ciklosporina preko prenašalcev multiple odpornosti v smeri bazolateralne proti apikalni strani. To pomeni, da bi XN lahko povečal biodostopnost ciklosporina z inhibicijo prenašalcev multiple odpornosti v črevesnih celicah. Po drugi strani pa je XN inhibiral vnos ciklosporina v celice Caco-2, ko te celice niso bile več polariziran monosloj, zato je še vedno neznano, kako XN vpliva v drugih primerih, kot so rakave celice z multiplo odpornostjo (Rodriguez-Proteau in sod., 2006). XN bi lahko torej genotoksični vpliv IQ in BaP preprečil tako, da bi inhibiral celični vnos genotoksičnih substanc (Plazar in sod., 2007).

### 2.3 KAKO UČINKUJE XN

Mnoge raziskave potrjujejo širok spekter delovanja XN.

#### - **XN spremeni aktivacijo pro-karcinogenov z inhibicijo encimov citokroma P450**

Encimi citokroma P450 (CYP) so vključeni v oksidacijo in izločanje tako endogenih kot tudi eksogenih nepolarnih spojin v telesu in imajo pomembno vlogo pri metabolni aktivaciji določenih genotoksičnih snovi (Henderson in sod., 2000). Človeško gensko družino CYP1, ki je del kompleksa encimov citokroma P450, sestavljajo: CYP1A1, CYP1A2 in CYP1B1. Encimi CYP1 so vključeni v bioaktivacijo policikličnih aromatskih ogljikovodikov, heterocikličnih aminov in estradiola (spolni hormon) v mutagene in karcinogene intermediate, ki se

prekomerno izražajo v rakavih tkivih (Chaudhary in Willett, 2005). Dokazali so, da XN in IXN pri nizkih mikromolarnih koncentracijah močno inhibirata encime citokroma P450 (CYP1A1, CYP1B1 in CYP1A2, a ne CYP2E1 in CYP3A4), ki aktivirajo karcinogene snovi (Henderson, 2000). Miranda in sod. (2000c) so dokazali, da XN inhibira metabolno aktivacijo prokarcinogena heterocikličnega amina 2-amino-3-metilimidazol(4,5-f)kinolina (IQ) in benzo(a)pirena (BaP), ki se nahajata v kuhani hrani, preko inhibicije kompleksa encimov citokroma P450. Hkrati so zapisali tudi, da je koncentracija XN in drugih flavonoidov, ki jih zaužijemo s pivom premajhna, saj plazemska koncentracija ne doseže 1  $\mu$ M koncentracije XN in zato XN ne inhibira metabolne aktivacije IQ *in vivo*. Po drugi strani pa so nedavno dokazali, da XN ne inhibira aktivnosti CYP1A v intaktnih podganjih jetrnih rezinah. Štiriindvajset urna inkubacija celic s XN ni vplivala na izražanje genov za encime CYP1A1 in CYP1A2. Ti rezultati kažejo, da inhibicija CYP najverjetneje ni glavni zaščitni mehanizem XN (Plazar, 2008).

**- XN sproži aktivacijo encimov, ki razstrupljajo karcinogene snovi**

NAD(P)H: kinon reduktaza (QR) (encim faze 2) je citosolni flavoprotein in ščiti celice pred toksičnostjo ksenobiotikov, tako da vodi  $2e^-$  redukcijo kinonov v hidrokinone, ki se nato izločijo (Miranda in sod, 2000a; Gerhäuser in sod., 2002). Zato je določevanje aktivnosti QR *in vitro* preprosta metoda za preučevanje spojin s potencialno protirakavimi lastnostmi (Miranda in sod., 2000a). Dokazali so, da XN in 6 drugih preniliranih halkanov inducirajo QR v gojenih mišjih jetrnih celicah Hepa1c1c7 (Miranda in sod., 2000a). XN so opisali kot induktor, ki selektivno inducira QR, ne da bi povzročil transkripcijo gena za encim faze 1, CYP1A1. Torej bi XN lahko imel koristno vlogo pri detoksifikaciji karcinogenov z inhibicijo encima faze 1 in indukcijo encima faze 2.

**- XN inhibira rast tumorskega tkiva v zgodnji stopnji razvoja in inducira apoptozo**

Antiproliferacijske in citotoksične vplive XN so študirali že mnogi znanstveniki. Miranda in sod. (1999) so *in vitro* testirali XN na celicah raka dojke (MCF-7), raka tankega črevesa (HT-29) in celicah raka na jajčnikih (A-2780). Ugotovili so, da XN inhibira proliferacijo MCF-7 in A-2780 ter dokazali, da XN ne kaže citotoksičnosti pri jetrnih celicah, ne inhibira mitohondrijske respiracije in ne moti oksidativne

fosforilacije v izoliranih podganjih jetrnih mitohondrijih pri 10 ali nižji mikromolarni koncentraciji XN. Negativno delovanje na razmnoževanje celic in s tem preprečevanje karcinogeneze v napredovani fazi, vključuje inhibicijo sinteze DNA, zaustavitev celičnega cikla v fazi S, indukcijo apoptoze in celično diferenciacijo (Gerhäuser in sod., 2002).

#### - **XN inhibira nastanek vnetij**

Z raziskavami *in vitro* so XN označili tudi kot protivnetni dejavnik, ki zavira nastanek vnetij povzročenih s strani mikroorganizmov, kot so DNA in RNA virusi, po Gramu pozitivne bakterije, mikobakterije, humane patogene glive in protozoji (*Plasmodium falciparum*) (Buckwold in sod., 2004; Gerhäuser, 2005b; Stavri in sod., 2004). Nesmrtnost rakavih celic in njihova nekontrolirana delitev vodi v povečano sintezo mediatorjev vnetij, prostaglandinov in s tem v razvoj vnetij. Miranda in sod. (1999) so dokazali, da XN deluje tudi protivnetno. Gerhäuser in sod. (2002) so potrdili, da XN prepreči sintezo prostaglandinov, ko inhibira delovanje encimov ciklooksigenaze-1 in -2. Prostaglandini sodelujejo pri procesu tvorbe novih krvnih žil (angiogeneza), kar je zelo pomembna stopnja v rasti tumorjev, saj kri oskrbuje tumor s hranili (Stevens in Page, 2004). Dušikov oksid (NO) ima pomembno vlogo pri mnogih vnetnih odzivih in je tudi vpleten v karcinogenezo. Ugotovili so, da XN inhibira tvorbo NO z negativnim vplivom na izražanje inducibilne NO-sintaze (iNOS). Povečana tvorba NO spodbuja produkcijo žilnega endotelijskega rastnega faktorja (VEGF), ki je znan kot induktor angiogeneze (Zhao in sod., 2003).

#### - **XN deluje kot antioksidant in lovi proste radikale**

Malo študij raziskuje antioksidantske lastnosti preniliranih flavonoidov, najverjetneje zato, ker je njihov vnos s hrano bistveno manjši od vnosa flavonoidov iz sadja in zelenjave. Miranda in sod. (2000b) so dokazali, da halkoni zaščitijo nizkomolekularne lipoproteine (LDL) pred z ioni  $\text{Cu}^{2+}$  inducirano oksidacijo *in vitro*. Ugotovili so, da XN odstranjuje hidroksilne ( $\text{OH}^{\cdot-}$ ), peroksilne ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) in superoksidne anionske radikale ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ter preprečuje tvorbo slednjih. Kot slabši antioksidanti pa so se izkazali ostali prenilirani flavonoidi, na primer IXN. Določeni so kazali celo pro-oksidantski vpliv na oksidacijo LDL (Miranda in sod., 2000b). Najnovejše raziskave so potrdile, da je XN učinkovit antioksidant.

Ugotovili so zaščitno delovanje XN na oksidativne poškodbe DNA, ki so nastale kot posledica delovanja prostih radikalov, povzročenih z oksidantom *t*BOOH. XN je za 50 % zmanjšal poškodbe DNA celic HepG2 pri koncentraciji 0,1  $\mu$ M (Plazar in sod., 2007).

**- XN lahko deluje kot proestrogen**

Hormoni kot na primer 17 $\beta$ -estradiol so endogeni tumorski promotorji, saj stimulirajo celično rast preko interakcij z estrogenskimi receptorji in povečujejo tveganje za raka dojke. Gerhäuser in sod. (2005a) so raziskovali pro- in antiestrogene značilnosti XN in IXN. XN je učinkovito inhibiral preko estrogena sproženo indukcijo alkalne fosfataze brez notranjega estrogenskega potenciala. IXN pa je bil šibek estrogenski agonist. XN inhibira človeško rekombinantno aromatazno (CYP19) aktivnost in lahko tako zmanjša nivo endogenih estrogenov (Gerhäuser in sod., 2005a).

**- XN zavira genotoksične učinke kancerogenov na sesalske celice (antigenotoksični učinki XN)**

Celice HepG2 so tretirali s XN in s prokarcinogenoma IQ ali BaP. Ugotovili so, da XN prepreči poškodbe DNA, ki jih povzročajo prokarcinogeni. Netoksične koncentracije (0,01 do 10  $\mu$ M) XN ne povzročajo lomov DNA. Pri citotoksičnih koncentracijah (>10  $\mu$ M) pa niso merili poškodb DNA, ker so le-te pod takimi pogoji posledica nekroze ali apoptoze (Henderson in sod., 1998). Nivo lomov DNA pri celicah, izpostavljenih le prokarcinogenom, je bil precej višji kot pri kontrolnih celicah, medtem ko se nivo poškodb DNA pri celicah tretiranih s prokarcinogenom v prisotnosti XN ni dosti razlikoval od kontrolnih celic (Plazar in sod., 2007).

**- XN inhibira sintezo triacilglicerolov**

Hipoksične celice ustvarjajo energijo s procesom glikolize, zaradi akumulacije mlečne kisline pa se znotrajcelična vrednost pH zniža. Ob oksidaciji celic se znotrajcelične maščobne kisline oksidirajo, kar vodi v poškodbe celic. Zato je znano, da hipoksične celice pretvarjajo maščobne kisline v nevtralne lipide in s tem vzdržujejo ustrezno znotrajcelično vrednost pH in se samozaščitijo. Nizka koncentracija XN (3  $\mu$ M) v organizmu deluje kot diacilglicerol-aciltransferazni inhibitor (Goto in sod., 2004). V splošnem velja, da so citotoksična sredstva, ki jih uporabljajo za klinično kemoterapijo, nespecifična proti rastočim normalnim



celicam in imajo tudi mnoge stranske učinke. Povečana citotoksičnost XN pod hipoksičnimi pogoji bi bil lahko primeren način kemoterapije, saj večina rakavih celic v trdnih tumorjih raste v hipoksičnem okolju (Goto in sod., 2004).

#### **- XN zmanjša migriranje celic**

Za razširjanje rakavih celic s primarnega tumorja na drugo mesto v telesu in nastanek metastaz so ključni trije procesi, ki so značilni za invazivne celice tekom karcinogeneze, in sicer usmerjena celična migracija, proteoliza zunajceličnih komponent in adhezivnost (Kovačič, 2005). Zaustavitev katerega koli od treh omenjenih procesov bi namreč ustavilo razširjanje rakavih celic. Pod hipoksičnimi pogoji se poveča migriranje celic in ker rakave celice rastejo pod takimi pogoji, se širijo s primarnega mesta tumorja po telesu in metastazirajo (Tabata in sod., 1997). Goto in sod. (2004) so odkrili, da XN zmanjša celično migracijo v hipoksičnih pogojih. V našem laboratoriju so tudi že preverjali vpliv XN na proteolizo zunajceličnih komponent (test invazivnosti in test adhezivnosti) pri rakavih oz. transformiranih celicah (U87 oz. MCF10A neoT). Pri obeh testih so uporabili dva različna substrata (matrigel in fibronektin). Pokazali so, da XN v koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  zniža invazivnost celične linije U87 skozi matrigel za 20 %, skozi fibronektin pa za 30 %, ne vpliva pa na znižanje invazivnosti celične linije MCF10A neoT skozi oba substrata. Vzrok je morda v različni aktivnosti proteinaz posamezne celične linije. Zmanjšanje invazivnosti je verjetno posledica zmanjšane adhezivnosti. V primeru celic MCF10A neoT XN v izbranih koncentracijah ne inhibira proteinaz ali pa deluje le v hipoksičnih pogojih (Kovačič, 2005).

## 2.4 PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT

Med razvojem večceličnega evkariontskega organizma morajo določene celice umreti. Poznana sta dva celična procesa, ki vodita v celično smrt; celična nekroza in programirana celična smrt (PCD). Celično nekrozo ponavadi sprožijo zunanji dejavniki, kot so fizične poškodbe, okoljske spremembe, patogenost mikroorganizmov in propad celične celotnosti (integritete) kar pogosto vpliva na mnoge celice znotraj tkiva. PCD pa je odvisna od notranjih signalov umirajoče celice, ki aktivirajo genetsko določene poti in delujejo na nivoju ene same celice. Najbolj raziskana oblika PCD je apoptoza, ki predstavlja nujen fiziološki proces in igra pomembno vlogo pri razvoju in tkivni homeostazi (Zimmermann

in sod., 2001). Na molekularnem nivoju je apoptoza regulirana in vodena z aktivacijo kaskade kaspaz (aspartat-specifične cistein-proteaze) ali od tega neodvisna. Druge proteaze so tudi pomembne za normalno fiziologijo, saj prevzamejo vlogo kaspaz, ko so le-te inaktivirane (Abraham in Shaham, 2004). Poznanih je več vrst programirane celične smrti, ki se med seboj razlikujejo (preglednica 1).

**Preglednica 1. Različne vrste programirane celične smrti** (Mathiasen in Jäättelä, 2002: 213).

<b>VRSTA PROGRAMIRANE CELIČNE SMRTI</b>	<b>KROMATIN</b>	<b>OSTALE ZNAČILNOSTI</b>	<b>KASPAZE</b>
Apoptoza	Kompaktna kondenzacija kromatina v geometrične oblike	Fosfatidilserin se prestavi na zunanjo stran membrane, krčenje citoplazme, tvorba apoptotskega telesa	Sproži se z aktivacijo kaspaze 3
Apoptozi podobna programirana celična smrt	Manj kompaktna kondenzacija kromatina kot pri apoptozi	Sinteza in transport molekul na površino celic. Fagocitne celice prepoznajo te molekule.	Lahko je odvisna ali neodvisna od kaspaz
Nekrozi podobna programirana celična smrt	Ni kondenzacije kromatina	Nabrekanje citoplazme in porušitev celične membrane, fosfatidilserin se prestavi na zunanjo stran membrane pred lizo celice	/

#### 2.4.1 Kaspaze

Poznanih je 11 kaspaz pri človeku, vse so zelo specifične, saj imajo katalitični cistein in cepijo svoje tarče za aspartatnim ostankom (Fuentes-Prior, 2004). Kaspaze uvrščamo v 2 skupini. Kaspazna poddružina 1 je vključena v vnetni odziv (kaspaze 1, 4, 5). Kaspazna poddružina 3, ki jo sestavljajo kaspaze 2, 3, 6, 7, 8, 9 in 10, je vključena v apoptozo. Proapoptotske kaspaze lahko razdelimo na iniciatorske kaspaze (kaspaze 2, 8, 9 in 10) in izvršiteljske kaspaze (kaspaze 3, 6 in 7). Iniciatorske kaspaze imajo dolge prodomene, kot je domena smrti (DED) in dopolnilna domena (CARD) ter se nahajajo v citosolu kot neaktivni monomeri. Izvršiteljske kaspaze pa se pojavljajo kot dimeri v obliki zimogena (Boatright in Salvesen, 2003).

#### 2.4.1.1 Od kaspaz odvisna apoptoza

Kaspaze se lahko aktivirajo po:

- **notranji / intrinzični poti preko mitohondrijev** (od receptorja neodvisna pot)
- **zunanji / ekstrinzični poti preko receptorjev smrti**

Proapoptotski (Bax in Bak) in antiapoptotski (Bcl-2 in Bcl-X<sub>L</sub>) člani družine Bcl-2 regulirajo mitohondrijsko pot. Proapoptotski člani družine Bcl-2 so odgovorni za permeabilizacijo zunanje mitohondrijske membrane, kar povzroči izločanje toksičnih proteinov iz mitohondrijskega medmembranskega prostora. To pa lahko antiapoptotski člani družine Bcl-2 preprečijo tako, da heterodimerizirajo proteine podobne proteinu Bax. Zveze med člani družine lahko ustvarijo dimere z različnim vplivom na apoptozo, tudi delež nastalih proteinov je pomemben. Bax, proapoptotski, in Bcl-2, antiapoptotski član družine Bcl-2 kontrolirata aktivacijo izvršiteljskih kaspaz z aktivnimi iniciatorskimi kaspazami (Huppertz in sod., 1999). Občutljivost celice, ki bo podvržena apoptozi je sorazmerna z razmerjem Bax/Bcl-2 (Chao in Korsmeyer, 1998). Celični stres inducira proapoptotske člane družine Bcl-2 le z domeno BH3 (Bim, Noxa, Puma, Bid in Bad). Sledi inhibicija delovanja antiapoptotskih članov družine Bcl-2 (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub>) in s tem omogočena oligomerizacija in aktivacija proteina Bax (Bcl-2-pridružen x protein) in/ali Bak, ki nato tvorita pore v mitohondrijski membrani, čemur sledi sproščanje proapoptotskih faktorjev kot so citokrom c, Smac/Diablo, AIF (indukcijski faktor apoptoze), serinske proteaze Omi/HtrA2 in endonukleaze G (Kroemer in sod., 2007). Antiapoptotski proteini Bcl-2 delujejo tako, da preprečujejo sprostitve citokroma c iz mitohondrija in tako omogočajo celično preživetje (Zimmermann in sod., 2001). Ko se citokrom c znajde v citoplazmi, se veže na Apaf-1, le-ta se konformacijsko spremeni in oligomerizira, kar vodi v nastanek apoptosoma, ki aktivira apoptotsko proteazo prokaspazo 9, ki nato aktivira prokaspazo 3. Kljub različnim funkcijam, proteine iz družine Bcl-2 združuje ohranjeno zaporedje - homologna domena Bcl-2 (BH) (Pan in Becker, 2005). Protein Bid lahko aktivira proapoptotski protein Bax po cepitvi s kaspazo 8 in tako poveže obe poti apoptoze; mitohondrijsko in pot preko receptorjev smrti (Khosravi-Far in Esposti, 2004; Adams in sod., 2001).

Zunanja pot aktivacije kaspaz pa poteka kot aktivacija celičnih transmembranskih receptorjev, imenovanih receptorji smrti, ki spadajo v družino receptorjev TNF (faktor tumorske nekroze), za katere je značilna znotrajcelična domena blizu C-terminalnega konca, sestavljena iz približno 80 AA in se imenuje domena smrti (DD) (Borner, 2003). Na zunajcelični strani receptorjev pa se nahaja vezavno mesto za specifične ligande iz družine TNF. Aktivacija receptorjev smrti iz družine TNF, kot so receptorji CD95 (APO-1/Fas) ali TRAIL (TNF- soroden, apoptoza-inducirajoč ligand), se odraži v oligomerizaciji receptorjev. Na citoplazemski strani se na DD receptorjev smrti s svojimi DD vežejo adaptorski proteini, kot sta FADD in TRADD, ki poleg lastne DD vsebujejo tudi efektorske domene smrti (DED). DED vsebujejo tudi prokaspaze 8, ki se preko le-teh vežejo na adaptorske proteine. Nastane signalni kompleks DISC, v katerem se aktivira prokaspaza 8 in sproži kaspazno kaskado tako, da s cepitvijo aktivira izvršiteljske kaspaze 3, 6 in 7 ter cepi proapoptotični protein Bid družine Bcl-2, ki nato inducira sprostitvev citokroma c. (Debatin, 2004; Zimmermann, 2001; Okada in Mak, 2004). CD95 sistem so že uporabili v kemoterapiji, da bi inducirali celično smrt rakavih celic (Fulda in Debatin, 2004).

#### **2.4.2 Vloga celičnih organelov v procesu PCD**

Celični organeli, ki so vključeni v proces programirane celične smrti so mitohondrij, lizosomi in endoplazemski retikulum (Bröker in sod., 2005).

**Mitohondrij** ima ključno vlogo pri aktivaciji kaspaz po mitohondrijski poti (2.4.1.1).

Nedavne raziskave so potrdile pomembno vlogo **lizosoma** pri regulaciji apoptoze. Oksidativni stres, TNF- $\alpha$  in kemoterapevtiki sprožijo aktivacijo lizosomskih proteaz in s tem njihovo sodelovanje pri celični smrti. Cisteinski proteazi katepsin B in L ter aspartatna proteaza D so najpomembnejše lizosomske proteaze. Katepsina B in D sta najbolj stabilna pri fiziološki, citoplazemski vrednosti pH in sodelujeta pri apoptozi in nekrozi podobni PCD. Katepsin B je odgovoren za lokalno rušenje membrane, kar je eden izmed zgodnjih morfoloških znakov aktivne celične smrti. Delna permeabilizacija lizosomov povzroči apoptotično obliko PCD, popolna porušitev lizosomov pa vodi v nekrozo. Proapoptotični proteini iz družine Bcl-2 nadzorujejo permeabilizacijo lizosomov. Lizosomske proteaze

lahko direktno sprožijo celično smrt z aktivacijo kaspaz ali pa delujejo na mitohondrije in povzročijo sproščanje proteinov iz mitohondrijev (Bröker in sod., 2005).

**Endoplazemski retikulum** (ER) je pomemben senzor celičnega stresa, lahko zadrži proteinsko sintezo in pripomore, da metabolizem obnovi celično homeostazo. Če so poškodbe ER prehude, je to signal za sprožitev PCD preko odgovora nezvitih proteinov ali preko sproščanja kalcija v citoplazmo. To vodi v aktivacijo kaspaze 12, za kar je potrebna translokacija člana družine Bcl-2 - proteina Bim, v ER. Kaspaza 12 se v neaktivni obliki nahaja na citosolni strani ER, ko pa se aktivira, povzroči aktivacijo drugih kaspaz in posledično apoptozo. Če se kaspaza 12 ne aktivira, lahko ER povzroči permeabilizacijo mitohondrija in tako aktivira različne poti celične smrti. Stres ER povzroči izločanje kalcijevih ionov, kar aktivira družino citosolnih proteaz, kalpainov (s kalcijem aktivirane nevtralne proteaze). Kalpains aktivirajo kaspaze (Bröker in sod., 2005). Znana je tudi kaskada kalpain-katepsin, kjer aktivirani kalpains inducirajo sproščanje lizosomskih katepsinov, čemur sledi celična smrt (Yamashima, 2004).

### 2.4.3 Regulacija apoptoze

Regulatorji apoptoze direktno ali indirektno kontrolirajo aktivnost kaspaz, ki so glavni izvršitelji apoptoze. Zunanja pot apoptoze je regulirana na nivoju preden se aktivira receptor smrti. V normalnih celicah se sintetizirajo nepopolni receptorji smrti, ki nimajo citoplazemske regije ali pa je le-ta krajša, torej brez DD in zato ne pride do vezave z ligandom in prenosa signala (Budihardjo in sod., 1999). Obstajajo celični proteini FLIP, ki so homologe neaktivne kaspaze 8 in imajo DED, s katerimi tekmujejo za vezavna mesta na adaptorskih proteinih skupaj s prokaspazo 8 in preprečijo stik prokaspaze 8 s kompleksom DISC in tako ne pride do aktivacije prokaspaze 8 (Budihardjo in sod., 1999). Proteini FLIP so lahko pozitivni ali negativni regulatorji kaspaze 8, odvisno od njihove koncentracije (Kataoka, 2005). Regulacija notranje poti apoptoze je bolj kompleksna. Mitohondrij ima vodilno regulatorno vlogo. Apoptotska pot je lahko inhibirana tudi na stopnjah, kataliziranih s poznimi kaspazami. Protein IAP se lahko veže na prokaspaze in aktivirane kaspaze ter inhibira njihovo delovanje (Salvesen in Duckett, 2002). Proteina Smac in Omi vsebujeta IAP-vezavne motive, preko katerih reagirajo z IAP in preprečijo njihovo delovanje in tako omogočajo prehod celic v apoptozo (Eckelman in sod., 2006).

#### 2.4.4 Vzroki za razvoj raka

Ljudje smo izpostavljeni najrazličnejšim karcinogenim dejavnikom kot so kemikalije, radiacija, virusi in drugo. Glavne stopnje v procesu karcinogeneze so iniciacija, napredovanje in širjenje tumorskega tkiva. Začetek raka zaznamujejo poškodbe DNA v celici ali v populaciji celic. Če taka poškodba ni popravljena, lahko vodi v genetske mutacije. Napredovanje karcinogeneze poteka, ko se preneoplastične celice v procesu klonskega širjenja, ki ga pospešujejo stopnjujoča genomska nestabilnost in spremembe v izražanju genov, razvijejo v tumorske celice (Pitot, 1989). Torej lahko proces karcinogeneze pri ljudeh opišemo kot kopičenje sprememb v genih, ki regulirajo celično homeostazo, kot so onkogeni, tumor supresorski geni, geni, ki regulirajo apoptozo in geni za popraviljanje DNA (Stanley, 1995). Mutacije v proapoptotskem tumor supresorskem genu *p53* so najpogostejše genetske napake pri človeškem raku. Gen *p53* kodira jedrni fosfoprotein, ki se v vseh normalnih celicah nahaja v nizki koncentraciji. Radiacija ali ostale poškodbe DNA aktivirajo izražanje gena *p53*, količina proteina se v celici poveča in to vodi v apoptozo ali v zaustavitev rasti, tako, da prepreči napredovanje celičnega cikla v G1 fazi, preko aktivacije p21, ki je inhibitor celičnega cikla in tudi inhibitor od ciklina odvisnih kinaz (Lai in sod., 2006). Mehanizem p53-inducirane apoptoze je slabo raziskan, p53 lahko poveča izražanje gena *bax* (Miyashita in Reed, 1995). Lai in sod. (2006) so odkrili, da visok nivo izražanja gena *p53* v celicah raka jeter vodi v apoptozo, medtem ko nizek nivo izražanja *p53* le v ustavitvi celičnega cikla.

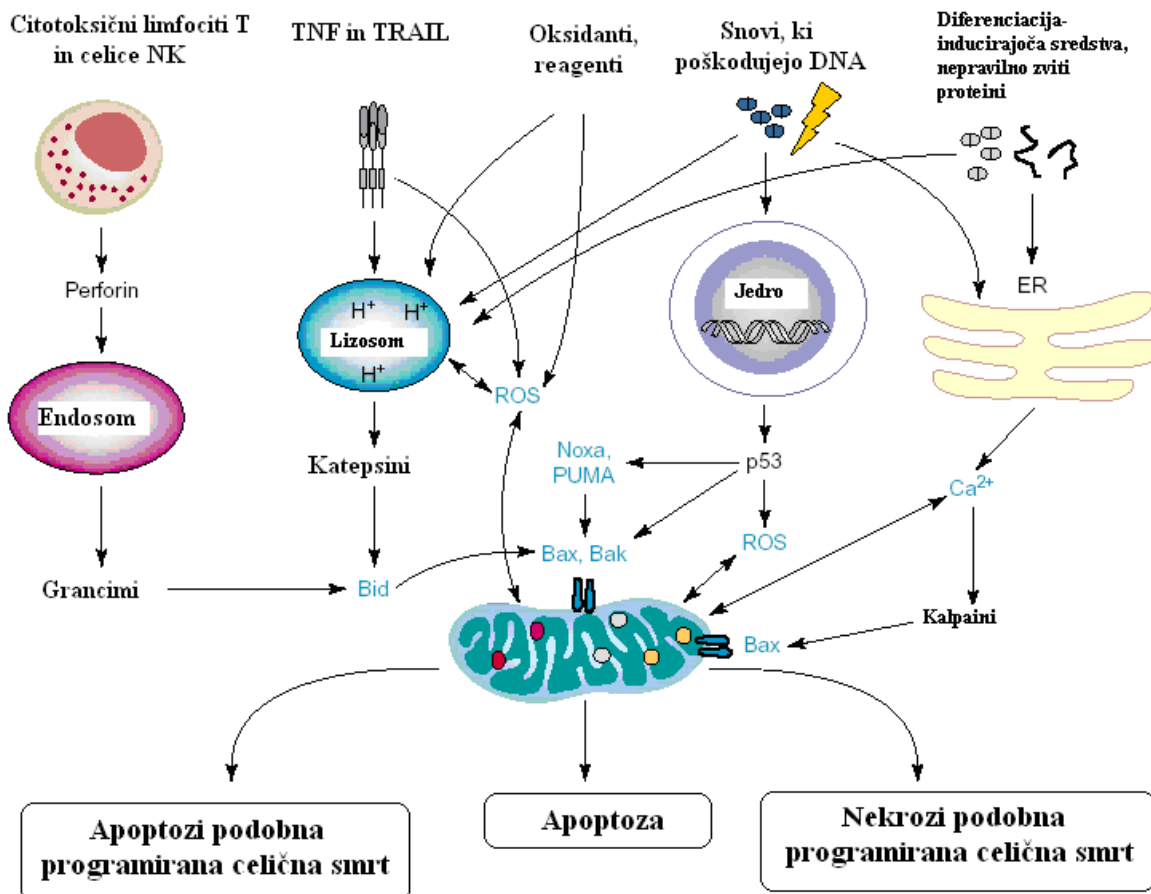
Antiapoptotske poti lahko vključujejo tudi inaktivacijo Apaf-1, povišan nivo izražanja antiapoptotskih genov družine Bcl-2, prekomerno izražanje preživetvenih ali ostalih članov družine IAP ter povišan nivo antiapoptotskih proteinov toplotnega šoka. Poleg teh preživetvenih mehanizmov, je odpornost na protirakava zdravila dosežena tudi s povišano sintezo P-glikoproteina, ki je znan kot protein MDR (multidrug-resistance protein). P-glikoprotein izloča zdravila iz celice in tudi ščiti celice pred apoptozo, ki se sproži z receptorji smrti. Pogosto so v tumorjih inhibirane tudi eksocitoza iz citotoksičnih granul CTL, zato ne pride do aktivacije kaspaz. Torej obstaja veliko poti, po katerih lahko celica ubeži aktivaciji kaspaz. Za organizem pa bi bilo zelo nevarno, če bi bil odvisen le od ene družine proteaz, ki bi s svojim delovanjem odstranile potencialno nevarne celice. Poskusi,

pri katerih so inhibirali kaspaze, so razkrili, da večina apoptotskih dejavnikov, ki aktivirajo kaspaze, to so substance, ki poškodujejo DNA, onkogeni, proapoptotski člani družine Bcl-2, stavrosporin, CTL in v določenih primerih celo receptorji smrti, ne potrebujejo kaspaz za sprožitev PCD (Mathiasen in Jäättelä, 2002).

#### **2.4.5 Od kaspaz neodvisne PCD**

Od kaspaz neodvisne PCD so pogosto odvisne od proteaz in permeabilnosti mitohondrijske membrane (slika 3). Te proteaze vključujejo kalpaine, katepsin B, D in L ter grancim A in B, ki lahko sodelujejo s kaspazami pri klasični apoptozi. Nedavne raziskave pa potrjujejo, da lahko te proteaze (brez prisotnosti kaspaz) sprožijo PCD in povzročijo morfološke spremembe, značilne za apoptozo (v preglednici 2 so zapisane razlike med kaspazami in katepsini). Proteazna družina katepsinov vključuje cisteinske, aspartatne in serinske proteaze (Mathiasen in Jäättelä, 2002). Večina katepsinov dozori v predelku endosom-lizosom. Aktivirajo se lahko z avtoproteolizo pri kisli vrednosti pH ali s proteolizo drugih proteaz. Sodelujejo tako pri od kaspaz odvisnih in neodvisnih PCD, stimulirajo pa jih lahko receptorji smrti, oksidanti, žolčne soli, kamptotekin idr. Katepsini se premestijo iz lizosoma v citosol in/ali v jedro pred pojavom morfoloških sprememb, značilnih za PCD. V določenih celicah pa so katepsini celo ključni za preživetje, kar so dokazali s cistein katepsinskim inhibitorjem CATI-1, kar je povzročilo smrt levkemičnih in limfomskih celic (Zhu in sod., 2000). Katepsini so zelo uničevalne molekule in ni presenetljivo, da obsežna poškodba lizosomov vodi v nekrotično obliko celične smrti (Bursch, 2001). Zmerne poškodbe lizosomov pa naj bi vodile v apoptozo, včasih tudi brez aktivacije kaspaz, a so ti mehanizmi še slabše raziskani (Turk in Stoka, 2007). Aktivnost katepsinov je delno regulirana z neugodno nevtralno vrednostjo pH v citosolu, a njihovi endogeni inhibitorji stefini, cistatini, serpini in tiropini oblikujejo glavni obrambni mehanizem (Turk in sod., 2005). Zanimivo je, da je taka celična smrt neodvisna od znanih kaspaz in bi lahko kazala na nov pristop zdravljenja hematoloških malignosti. Serinski proteazi grancin A in B se nahajata v citotoksičnih granulah citotoksičnih limfocitov T. Grancim B cepi substrate za aspartatnim ostankom in lahko tako direktno aktivira kaspaze. V prisotnosti kaspaznih inhibitorjev pa grancim B sproži nekrotično obliko PCD. Grancim A je tripsinu podobna proteaza in cepi substrate za lizinskim in argininskim ostankom, aktivira pa tudi DNazo, ki povzroči enojne cepitve DNA, kar vodi v celično smrt (Mathiasen in Jäättelä, 2002).

Apoptoza, ki jo sprožijo cisteinski katepsini je v večji meri odvisna od kaspaz. Torej so prave uničevalne molekule kaspaze in ne katepsini, čeprav so katepsini v veliko pomoč v primeru, ko je kaspazna aktivnost zmanjšana, zaradi prekomerne sinteze antiapoptotskih proteinov, na primer pri raku (Turk in Stoka, 2007).



**Slika 3. Od kaspaz neodvisne signalne poti, ki vodijo v permeabilizacijo mitohondrijske membrane** (Mathiasen in Jäättelä, 2002: 217). Grancimi, sproščeni iz granul citotoksičnih limfocitov T in celic NK, prehajajo z difuzijo s pomočjo perforina ali z endocitozo v tarčne celice. V citosolu tarčne celice, grancim B cepi in aktivira protein Bid, ki nato aktivira proteina Bax in/ali Bak, ki tvorita poro. Liganda TNF in TRAIL, različni oksidanti, detergenti in kemoterapevtska zdravila lahko inducirajo sproščanje aktivnih katepsinov iz lizosoma, ki tudi aktivirajo Bid. Ligandi TNF in TRAIL lahko v določenih tarčnih celicah povišajo koncentracijo reaktivnih kisikovih zvrsti, ki lahko poškodujejo mitohondrij in/ali lizosom. Sevanje in razna zdravila, ki poškodujejo DNA, inducirajo transkripcijo genov *bax*, proteinov homolognih Bcl-2, ki imajo le domeno BH3 (proteina Noxa in PUMA) ter proteine vključene v tvorbo ROS, preko p53. Stres ER se odraža v sproščanju ionov Ca<sup>2+</sup>, ki lahko neposredno škodijo mitohondriju ali posredno aktivirajo protein Bax preko kalpainov. Permeabilizacija mitohondrijske membrane je vzrok za sprožitev PCD; od kaspaz odvisne ali od kaspaz neodvisne PCD, kar je odvisno od dražljajev, vrste celice in metabolnega stanja celice.

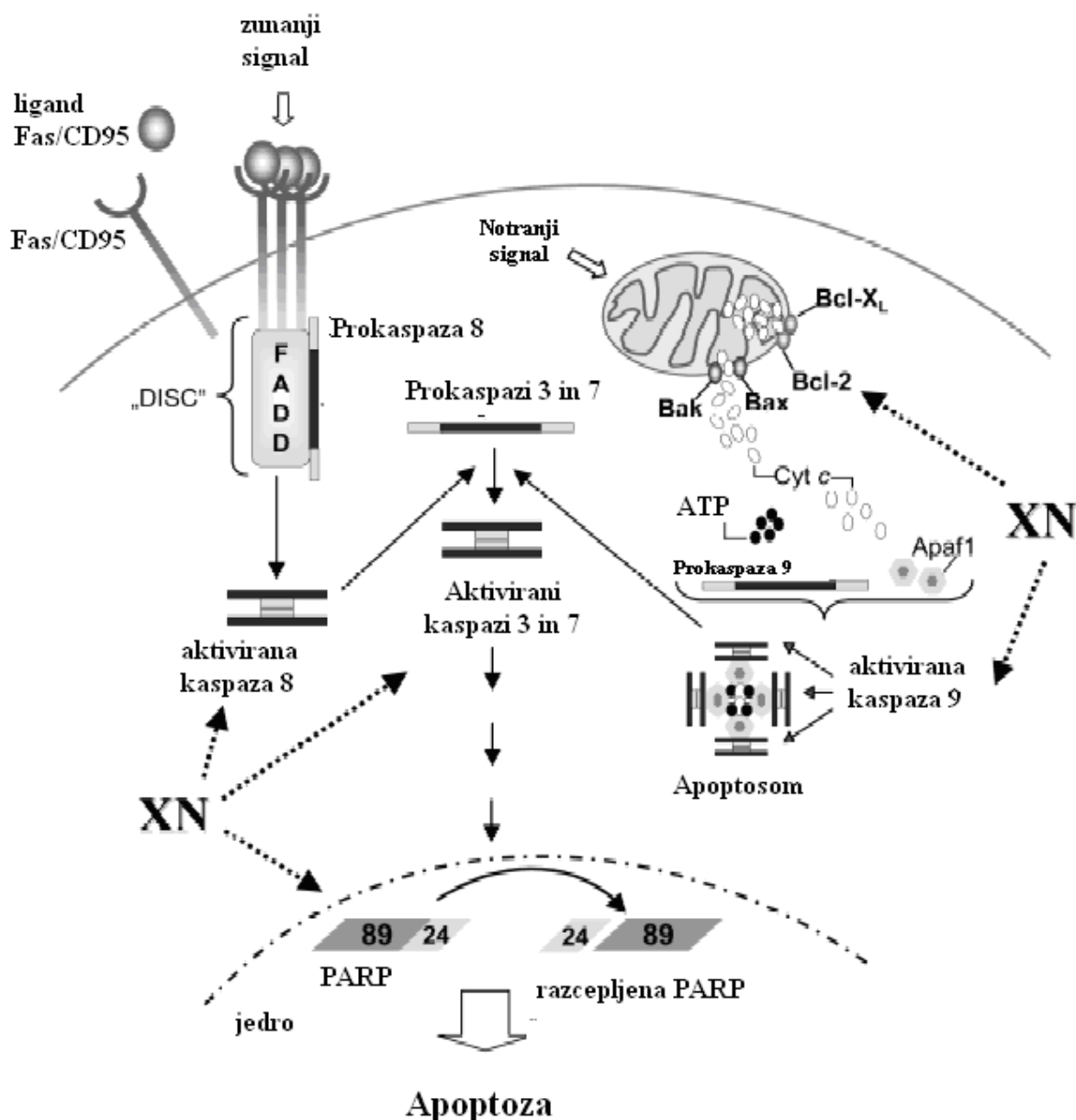


**Preglednica 2. Primerjava kaspaz s cisteinskimi katepsini** (Turk in Stoka, 2007: 2765).

ZNAČILNOST	KASPAZE	KATEPSINI
Vrsta molekule	Cisteinska proteaza	Cisteinska proteaza
Značilnost cepitve	Ozka specifičnost, cepi za Asp ostakom na mestu P2	Širša specifičnost s preferenco do hidrofobnih ali bazičnih ostankov na mestu P2
Način aktivacije	Nahajajo se v citosolu kot neaktivni zimogeni in čakajo na signal smrti, ki jih aktivira	So že aktivni znotraj lizosoma in se morajo prenesti v citosol, kjer izrazijo svojo proapoptotsko funkcijo
Način cepitve	Cepijo na samo enem mestu ali na nekaj mestih	Cepitev substrata poteka korakoma
Regulacija	Bolj natančna	Manj natančna

#### 2.4.6 Vpliv XN na apoptozo

Pan in sod. (2005) so dokazali, da XN povzroča celično smrt rakavih celic debelega črevesa s sprožitvijo apoptoze po obeh poteh aktivacije kaspaz (slika 4). Potrdili so vpletenost receptorja smrti, ker so zaznali povišano koncentracijo aktivirane kaspaze 8. Vpliv XN na aktivacijo kaspaz preko mitohondrijske poti pa so dokazali s prisotnostjo aktivirane kaspaze 9 in z nižjo stopnjo sinteze proteina Bcl-2 (Pan in sod., 2005). Druga skupina znanstvenikov je odkrila, da XN inhibira delovanje transkripcijskega faktorja NF-kappaB in s tem inducira apoptozo pri prostatni hiperplaziji (Colgate in sod., 2006). Neprestana aktivacija transkripcijskega faktorja NF-kappaB v jedru je značilna za različne rakave celice, vodi pa v izražanje genov, ki kodirajo molekule adhezije, vnetne citokine, rastne faktorje in antiapoptotske gene. Lust in Vanhoecke (2005) sta raziskovala kako XN vpliva na rakave celice B-kronične limfocitne levkemije. Odkrila sta, da XN cepi protein PARP-1 (poli(ADP)-riboza polimeraza), ki je jedrni substrat za kaspaze in razcepljen encim PARP-1 označuje začetek apoptoze. V *in vitro* pogojih skoraj vse kaspaze cepijo PARP-1, medtem ko je PARP-1 tarčna molekula le za izvršiteljski kaspazi 3 in 7 pod *in vivo* pogojih (Pan in sod., 2005). PARP-1 je vključen tudi v regulacijo NF-kappaB. Študije z modeli izbitih genov so pokazale, da je PARP-1 koaktivator NF-kappaB. V primeru inhibicije PARP-1, le-ta ne aktivira transkripcijskega faktorja NF-kappaB in posledično ne pride do transkripcije genov, ki jih aktivira NF-kappaB (Geraets in Moonen, 2007).



**Slika 4. Potencialne tarče XN, ki sprožijo apoptozo v humanih črevesnih rakavih celicah** (Pan in sod., 2005: 842). Pot preko receptorja smrti se aktivira s cepitvijo iniciatorske prokaspaze 8 in sprostitvijo aktivirane kaspaze 8 z molekule FADD v kompleksu DISC. Razcepljena kaspaza 8 nato aktivira kaspazno kaskado izvršiteljskih kaspaz 3 in 7, kar vpliva na cepitev molekule PARP, ki označuje začetek apoptoze. XN aktivira tudi mitohondrijsko pot, tako da aktivira protein Bcl-2, kar sprosti citokrom c iz mitohondrija, nato poteče tvorba apoptosoma in aktivacija kaspaze 9, ki nato aktivira izvršiteljske kaspaze, ki sprožijo apoptozo.

#### **2.4.7 Možganske celice**

V diplomski nalogi smo velik delež pozornosti namenili možganskim celicam, primerjali smo vpliv XN na rakavo celično linijo U87 in na celično linijo normalnih humanih astrocitov (NHA).

V centralnem živčnem sistemu so prisotne celice glia, ki obdržijo sposobnost proliferacije in nevroni, ki po diferenciaciji ne proliferirajo. Večina nevroloških tumorjev izvira iz celic glia (Zhu in Parada, 2002). Astrociti so podvrsta celic glia, oskrbujejo nevrone s hranili in skupaj z obdajajočimi endotelijskimi celicami vzdržujejo krvno-možgansko pregrado. Astrociti imajo na svoji površini plazemske prenašalce, kot na primer glutamatne prenašalce za različne neurotransmiterje (glutamat, ATP, GABA) (Parri in Crunelli, 2003; Piet in sod., 2004)

#### **2.4.8 Ali je lahko XN nevrozaščitno sredstvo?**

Krvno-možgansko pregrado sestavlja endotelij možganskih mikrokapilar in astrociti. Posebnosti, ki ločijo možganski endotelij od ostalih organov so kompleksne tesne povezave, nizka gostota pinocitotskih veziklov in prisotnost številnih specifičnih prenašalnih sistemov in metabolnih encimov, kar ustvarja mejno površino, ki selektivno omejuje prenos zdravil v centralni živčni sistem. Permeabilnost zdravil določajo tudi njihove fizikalno-kemijske značilnosti, molekularna teža, lipofilnost in  $pK_a$ . Mnogi flavonoidi imajo pomembno nevrozaščitno vlogo. Nevrološke motnje so pogosto posledica oksidativnega stresa, še vedno pa ni povsem znano ali flavonoidi delujejo le kot antioksidanti, ki dajejo vodik ali pa z interakcijami posegajo v različne signalne kaskade. Prenašalni proteini lahko omejujejo vstop določenim flavonoidom, niso pa uspeli dokazati kateri prenašalni protein je vključen (Youdim in Qaiser, 2004). P-glikoprotein je ABC-prenašalni protein, ki izloča iz celic različne hidrofobne molekule in tudi protirakava zdravila (Di Pietro in sod., 2002). Conseil in sod. (1998) so dokazali, da določeni prenilirani flavonoidi lahko tudi inaktivirajo P-glikoprotein z vezavo na njegovi vezavni mesti za ATP in steroidne molekule, s čimer bi lahko sprostili vnos protirakavih zdravil v celico. Flavonoidi, ki so bolj lipofilni, prehajajo skozi krvno-možgansko pregrado hitreje. Manj lipofilni pa ostajajo v lipidnem dvosloju dalj časa in so tako bolj občutljivi na izpiranje. XN je močno lipofilen flavonoid s prenilno skupino, zato bolje prehaja preko

celičnih membran kot ostali flavonoidi in je posledično bolj citotoksičen in genotoksičen (Plochmann in sod., 2007). Ta lastnost bi bila koristna za zdravljenje rakavega tkiva. Permeabilnost določenih flavonoidov *in vivo* je torej odvisna od njihove lipofilnosti in interakcij s prenašalnimi proteini (Youdim in Qaiser, 2004).

## 2.5 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

V današnjem času se preizkuša mnogo protirakavih učinkovin, še posebno tistih, ki kažejo selektivno citotoksičnost. Glede na dosedanje raziskave in rezultate mnogih nadaljnjih poskusov in kliničnih testiranj, bi lahko bil taka učinkovina tudi XN. V našem diplomskem delu smo se osredotočili na preverjanje meja citotoksičnosti XN pri večjem številu različnih vrst rakavih in nerakavih celic in s tem na določitev koncentracijskega območja, v katerem XN deluje selektivno citotoksično. Skušali smo določiti mejne citotoksične vrednosti XN za nerakave celice ter preučiti enega izmed možnih mehanizmov toksičnosti XN.

V nalogi smo želeli potrditi delovne hipoteze, da XN selektivno vpliva na preživetje rakavih v primerjavi z nerakavimi celicami, kakor tudi na rast in razmnoževanje (proliferacijo). Pričakovali smo, da bo meja toksičnosti ksantohumola višja za nerakave kot za rakavo spremenjene celice. Predpostavljali smo tudi, da je eden od možnih mehanizmov citotoksičnosti ksantohumola njegova sposobnost, da sproži apoptozo.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA

##### 3.1.1 Kemikalije

**Preglednica 3. Uporabljene kemikalije.**

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC	KATALOŠKA ŠTEVILKA
akridinoranžno	Sigma	A-6014
DEPC	Sigma	D-5758
DMEM	Sigma	D5671
DMEM/F12	Sigma	D6421
DMSO	Sigma	D-8779
EDTA	Sigma	E-5134
EGF	Sigma	E-9644
etanol	RDH	32221
etidijev bromid	Sigma	E-8751
FBS	Euroclone	ECS 0180L
glikogen	Sigma	G-8751
HS	Sigma	H-1270
inzulin	Sigma	I-1882
izopropanol	Sigma	I-0398
kloroform	Sigma	C-5312
ksantohumol	N.I.C.	102- 04-012
L- glutamin	Euroclone	ECB3000D
MEM	Euroclone	EC B2071L
MTS	Promega	G 1111
MTT	Sigma	M 5655
NEAA	Sigma	M 7145
PBS, 10x	Euroclone	ECM4004XL
Penicilin/streptomycin	Sigma	P7539
PMS	Fluka	68600
Pufer HEPES	Sigma	H0887
RPMI 1640	Sigma	R7388
TE, 20x	Molecular Probes	P11496
Tripan modro (0,4 % raztopina)	Sigma	T-8154
Tripsin	Sigma	T-4174
TRIzol	Gibco	15596-018
Williams' medium E	Sigma	W 1878

### 3.1.2 Laboratorijska oprema

#### Preglednica 4. Uporabljena oprema.

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Brezprašna celična komora	Iskra, Slovenija
Centrifuga, tip 3K15	Sigma, ZDA
Centrifuga 5415	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga Minispin	Eppendorf, Nemčija
Centrifugirke (15 mL)	Costar, ZDA
Centrifugirke (50 mL)	Costar, ZDA
Digestorij	Koetterman, Nemčija
Fluorescentni mikroskop Eclipse E800	Nikon, Japonska
geneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Hladilnik	Gorenje, Slovenija
Inkubator s CO <sub>2</sub>	Kambič laboratorijska oprema, Slovenija
Kriogene vialne (2 mL)	Costar, ZDA
Mikrocentrifugirke (epice)	Plastibrand, Nemčija
Nastavki za pipete s filtrom (0,2-10 µL)	Costar, ZDA
Nastavki za pipete s filtrom (1-30 µL)	Costar, ZDA
Nastavki za pipete s filtrom (1-200 µL)	Costar, ZDA
Nastavki za pipete s filtrom (100-1000 µL)	Costar, ZDA
Objektna stekla s 4 komorami	LabTeh, Slovenija
PCR-epruvete	Costar, ZDA
Pipete	Costar, ZDA
Plastenke za celične kulture s perforiranim zamaškom (25 cm <sup>2</sup> )	Costar, ZDA
Plastenke za celične kulture s perforiranim zamaškom (75 cm <sup>2</sup> )	Costar, ZDA
Plastenke za celične kulture s perforiranim zamaškom (175cm <sup>2</sup> )	Costar, ZDA
Plošče za gojenje celic (6 vdolbinic)	Costar, ZDA
Plošče za gojenje celic (96 vdolbinic)	Costar, ZDA
Plošče za gojenje celic (384 vdolbinic)-transparentne	Costar, ZDA
Plošče za gojenje celic (384 vdolbinic)-črne	Costar, ZDA
Plošče za PCR	ABIPRISM, ZDA
Spektrofluorimeter	Tecan, Avstrija
Svetlobni mikroskop	Reichert-Jung, Avstrija
Univerzalni nastavki za pipete (1-200 µL)	Costar, ZDA
Univerzalni nastavki za pipete (100-1000 µL)	Costar, ZDA
Zmrzovalna skrinja (-20 °C)	Gorenje
Zmrzovalna skrinja (-70 °C)	Angelantoni scientifica
7900HT Sequence Detection system	ABIPRISM, ZDA

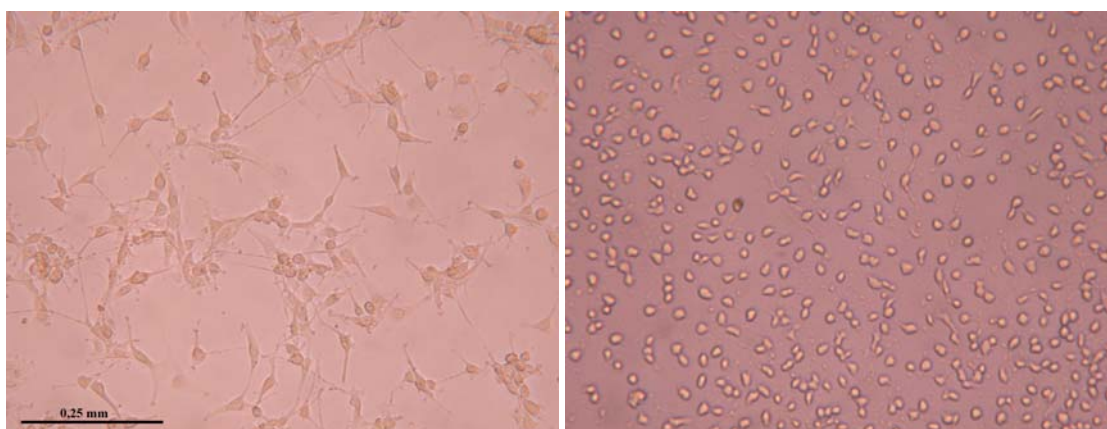
### 3.1.3 Celične kulture

Koščki tkiv in tudi posamezne celice lahko pod določenimi pogoji preživijo tudi zunaj organizma (*in vitro*). Celice za svoje preživetje, rast in razmnoževanje potrebujejo ustrezno hranilno gojišče, ki je sestavljeno iz hranilnih snovi, rastnih faktorjev, antibiotikov. Celične kulture lahko rastejo le v mediju, ki ima ustrezno vrednost pH (7,4) in ustrezno temperaturo, ki je enaka telesni temperaturi organizma, iz katerega so bile celice izolirane (37 °C za sesalske celice ter atmosfera s 5 % CO<sub>2</sub>). Plastenke, v katerih gojimo celične linije, morajo biti sterilne, inkubirati jih moramo v ustrezni atmosferi, omogočati morajo pritrjanje celic na podlago. Rastne faktorje smo zagotovili z dodajanjem telečjega seruma (FBS). Uporaba celičnih kultur omogoča dobro proučevanje živih celic, ki so v kulturi lažje dostopne za opazovanje in izvajanje poskusov, pomembno pa je, da v veliki meri ohranjajo lastnosti tkiva, iz katerega izvirajo. Nekatere celice, ki jih dolgo časa ohranjamo v kulturi, izgubijo lastnost, da morajo po določenem številu delitev odmreti, zato jih imenujemo trajne celične linije. Te celice se morfološko in fiziološko razlikujejo od celic, iz katerih izvirajo. Poskusi s celicami so lahko ponovljivi in z njihovo uporabo se izognemo poskusom na laboratorijskih živalih. V naši diplomski nalogi smo izbrali nerakave, nesmrtnne celične linije ter rakave celične linije, pridobljene iz tumorskega tkiva. Gojišča za izbrane celične linije so navedena v preglednici 5.

#### 3.1.3.1 Celična linija U87

Celična linija U87 (slika 5) je visoko maligna linija primarnega človeškega tumorja možganov, glioblastoma multiforme. Linija je hipodiploidna, pri 48 % celic je kromosomsko število 44. Celice so pridobili iz malignega glioma 44-letne pacientke (Ponten in Macintyre, 1968). Celice U87 so po morfologiji epitelijske celice, rastejo pritrjene na podlago in imajo značilno zvezdasto obliko. Celična linija je bila kupljena pri American Tissue Culture Collection (ATCC).





(a)

(b)

**Slika 5. Celična linija U87.** (a) Netretirane celice v hranilnem gojišču; celice so pravilne zvezdaste oblike in niso poškodovane. (b) Celice, tretirane s XN koncentracije 80  $\mu\text{M}$ , ki je toksična za celice. Morfologija mrtvih celic se povsem spremeni, postanejo okrogle, se odlepijo od podlage in se ne svetijo pod svetlobnim mikroskopom. Slikane so pod svetlobnim mikroskopom pri povečavi 100x. Črta označuje 0,25 mm.<sup>1</sup>

### 3.1.3.2 Celična linija MiaPaCa-2

MiaPaCa-2 je slabo diferencirana celična linija, pridobljena iz raka trebušne slinavke. Celično linijo smo prejeli od gospe dr. Verene Murphy, National Institute for Cellular Biotechnology, Dublin, Irska.

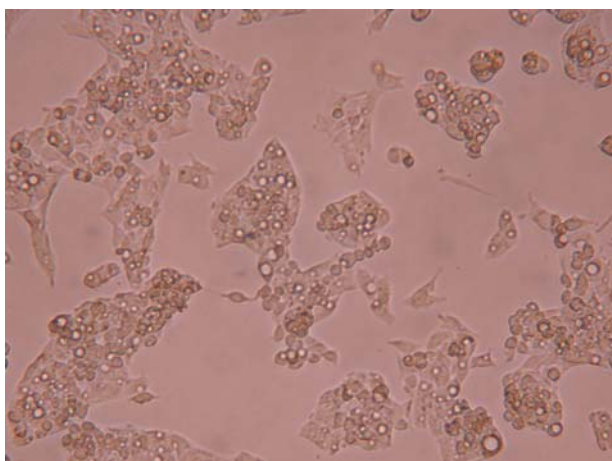
### 3.1.3.3 Celična linija NCI H1299

Celična linija NCI H1299 je maligna linija, pridobljena iz malignega pljučnega tumorja 43 let starega moškega. Celično linijo smo prejeli od gospe dr. Verene Murphy, National Institute for Cellular Biotechnology, Dublin, Irska.

### 3.1.3.4 Celična linija HepG2

Celična linija HepG2 (slika 6) izvira iz človeškega primarnega hepatocelularnega karcinoma, celice imajo neskončno zmožnost delitve in so ohranile številne specifične jetrne funkcije, tudi aktivnost nekaterih encimov, ki sodelujejo v metabolnih reakcijah. Podaril nam jo je gospod dr. Firouz Darroudi, Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, University of Leiden, Netherlands.

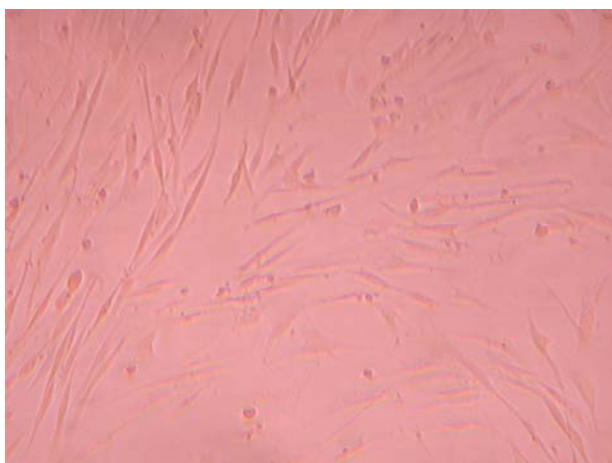
<sup>1</sup> Merilo na sliki 5a, označeno s črto, ki prestavlja 0,25 mm, je enako tudi za sliko 5b, 6, 7 in 8.



**Slika 6. Celična linija HepG2.** Netretirane celice, rastejo v kupčkih. Slikane so pod svetlobnim mikroskopom pri povečavi 100x.

#### 3.1.3.5 Celična linija NHA

NHA je celična linija normalnih človeških astrocitov (slika 7), komercialno dostopna (Cambrex, USA). Celice NHA rastejo v enem sloju in imajo podolgovato, zvezdasto, vlaknasto obliko. Uravnavajo okolje živčnih celic z odstranjevanjem ionov (zlasti kalija). Astroцитi so tudi pomembni gradniki krvno-možganske pregrade ter vplivajo na vazokonstrikcijo in vazodilatacijo kapilar. Med posameznimi celicami astrocitov se nahajajo presledkovni stiki, po katerih poteka neposredna komunikacija med celicami.



**Slika 7. Celična linija NHA.** Netretirane celice, vretenaste oblike. Slikane so pod svetlobnim mikroskopom pri povečavi 100x.

### 3.1.3.6 Celična linija NC-NC

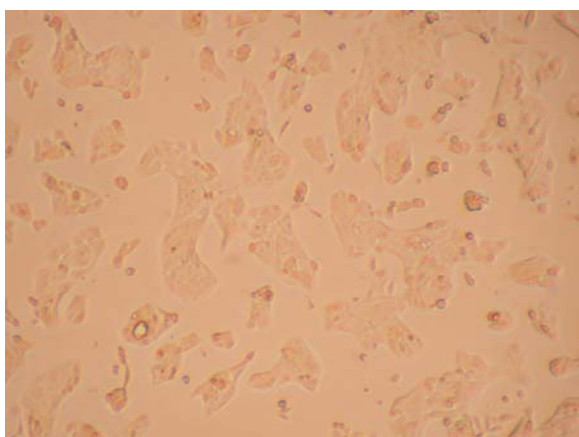
Linija NC-NC predstavlja humane B limfoblastoidne celice, pridobljene iz limfocitov 27 letne bolnice. Transformirane so z virusom Epstein-Barr. Celice so suspenzijske, okroglih oblik. Kupljene iz zbirke DSMZ.

### 3.1.3.7 Celična linija HUVEC

Celično linijo HUVEC sestavljajo humane endotelijske celice vene popkavnice. Ta celična linija je spontano imortalizirana, a nerakava. Celice HUVEC rastejo v enem sloju, so hitrorastoče, podolgovate oz. vretenaste oblike z izrastki. Pridobljene so od Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

### 3.1.3.8 Celična linija MCF 10A

Celična linija MCF 10A (slika 8) je spontano imortalizirana linija celic predrakave stopnje, ki izhaja iz epitela fibrocistične dojke. Celice so nesmrtno, diploidne, pridobljene iz pacientke s fibrocistično boleznijo dojke, ki je benigne oblike. Celična linija izvira iz inštituta Barbara Ann Karmanos Cancer Institute Detroit, USA.



**Slika 8. Celična linija MCF 10A.** Netretirane celice, so bolj okrogle, rastejo v kupčkih. Slikane so pod svetlobnim mikroskopom pri povečavi 100x.

**Preglednica 5. Gojišča za izbrane celične linije**

<b>CELIČNA LINIJA</b>	<b>SESTAVA GOJIŠČA</b>
U87, HUVEC	Gojišče MEM 10-odstotni FBS 2mM L-glutamin 1-odstotni penicilin/streptomycin 1-odstotne neesencialne AK
MiaPaCa-2 in NHA	Gojišče DMEM 10-odstotni FBS 2mM L-glutamin 1-odstotni penicilin/streptomycin 20mM pufer HEPES
NCI H1299	Gojišče RPMI 1640 5 % FBS 2mM L-glutamin 1-odstotni penicilin/streptomycin 0,69 mg/ mL NaHCO <sub>3</sub> 20mM pufer HEPES
NC-NC	Gojišče RPMI 1640 10-odstotni FBS 1-odstotni penicilin/streptomycin
HepG2	Williams' medium E 15 % FBS 2mM L-glutamin 1-odstotni penicilin/streptomycin
MCF 10A	DMEM/F12 5 % HS 2,5 mM L-glutamin 10 mM pufer HEPES 1-odstotni penicilin/streptomycin 10 µg/mL inzulina 20 ng/mL EGF 0,5 µg/mL hidrokortizona

### Preglednica 6. Uporabljeni kompleti reagentov.

KOMPLET REAGENTOV	PROIZVAJALEC	KATALOŠKA ŠTEVILKA
RiboGreen RNA Quantation kit	Molecular probes	R-11490
High capacity cDNA archive kit	Applied biosystems	4322171
Taq Man Universal PCR MasterMix	Roche	4304437
ApoONE Homogenous Caspase 3 and 7 Assay	Promega	G7790

### Preglednica 7. Uporabljeni sonde in začetni oligonukleotidi za kvantitativno PCR

SONDI	PROIZVAJALEC
Sonda za <i>bax</i>	Applied Biosystems, Velika Britanija
Sonda za <i>bcl-2</i>	Applied Biosystems, Velika Britanija
ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI	PROIZVAJALEC
Prvi začetni oligonukleotid za <i>bax</i>	Applied Biosystems, Velika Britanija
Drugi začetni oligonukleotid za <i>bax</i>	Applied Biosystems, Velika Britanija
Prvi začetni oligonukleotid za <i>bcl-2</i>	Applied Biosystems, Velika Britanija
Drugi začetni oligonukleotid za <i>bcl-2</i>	Applied Biosystems, Velika Britanija

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Gojenje in presajanje celičnih linij *in vitro*

Pri delu smo se držali postopkov dobre laboratorijske prakse. Celične linije smo gojili v ustreznem hranilnem gojišču v sterilnih plastenkah s perforiranim zamaškom pri temperaturi 37 °C in atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Delo s celičnimi linijami je potekalo v brezprašni komori, torej v popolnoma sterilnih pogojih. Pritrjene celične linije (vse, razen NC-NC, ki je suspenzijska celična linija, zato ni bilo težav s prekomerno preraščenostjo) so rasle na dnu plastenke in ko so dosegle 70- do 80-odstotno konfluenco, smo jih presadili v novo sterilno plastenko. Najprej smo odstranili staro, izrabljeno gojišče s pipeto za enkratno uporabo. Nato smo pritrjene celice dvakrat sprali z 1x PBS, da smo popolnoma odstranili staro gojišče in mrtve celice. Odstranitev starega gojišča je pomembna za učinkovito delovanje tripsina (proteolitični encimi, ki razgrajujejo medcelične povezave), saj se v gojišču nahaja FBS, ki inaktivira tripsin. Sprane celice smo nato tretirali z raztopino 1 % tripsina v 0,02 % EDTA in pustili delovati 5-10 min v inkubatorju pri 37 °C

in 5 % CO<sub>2</sub>. Delovanje tripsina smo spremljali pod svetlobnim mikroskopom, takoj ko smo opazili, da so se celice v celoti odlepili od podlage, smo zaustavili delovanje tripsina tako, da smo dodali ustrezno sveže gojišče. Nato smo jih centrifugirali pri 900vrt/min (centrifuga 5415) in sobni temperaturi 6 minut, sledilo je odstranjevanje supernatanta in resuspendiranje zbranih celic v usedlini s svežim gojiščem. Za presajanje celic, zamrzovanje celic in za nadaljnje poskuse smo morali določiti število odlepljenih živih celic. V platenke smo nasajali celice ustrezne gostote, odvisno od površine dna platenke. V platenko s površino 25 cm<sup>2</sup> smo nasadili  $5-7 \cdot 10^5$  celic v 5 mL svežega gojišča, v platenke s površino 75 cm<sup>2</sup>  $1.5-2 \cdot 10^6$  celic v 10 mL svežega gojišča, ter  $3-5 \cdot 10^6$  celic v 20 mL svežega gojišča v platenko s površino 175cm<sup>2</sup>. Vsa gojišča, dodatke in pufre smo predhodno segreli v vodni komori na 37 °C.

### 3.2.2 Zamrzovanje in odmrzovanje celic

Celice se lahko hrani pri temperaturi -80 °C več mesecev ali neskončno dolgo v tekočem dušiku (-196 °C). Pomembno je, da zamrzemo celice ustrezne gostote, saj določen odstotek celic ne preživi, gostota živih celic po odtaljevanju pa mora biti primerna za ponovno nasaditev. Na splošno zamrzujemo  $3 - 5 \cdot 10^6$  celic pritrjenih celičnih linij in  $5 - 10 \cdot 10^6$  suspenzijskih celic. V posamezno kriogeno vialo smo odpipetirali 900μL resuspendiranih celic v svežem gojišču in dodali 100 μL krioprotektanta DMSO, tako, da je končna koncentracija DMSO 10 %. Le-ta prepreči nastajanje kristalov, ki poškodujejo celice. Nadalje smo celice takoj prenesli v zmrzovalno skrinjo s temperaturo -80 °C.

Postopek odmrzovanja celic je zelo pomemben in vpliva na preživetje celic. Pomembno je, da kriogeno vialo razkužimo z etanolom in jo sterilno odpremo v brezprašni komori. Najprimernejše je hitro odmrzovanje, ki poškoduje najmanj celic. Celice smo odtalili tako, da smo v kriogeno vialo dodali 1 mL ustreznega svežega toplega gojišča (segretega na 37 °C) in nato odpipetirali odtaljeno celično suspenzijo. Postopek smo ponavljali, dokler nismo celic popolnoma odmrznili in jih nato prenesli v 5 mL svežega segretega gojišča, ter jih centrifugirali pri 900 vrt/min (centrifuga 5415) 6 minut, nato smo odstranili supernatant in s tem citotoksičen DMSO, celično usedlino smo resuspendirali v svežem gojišču in to prenesli v sterilno platenko za gojenje celic s površino 25 cm<sup>2</sup>.

### 3.2.3 Štetje živih celic

Uporabili smo metodo barvanja s tripanskim modrilom, ki obarva samo celice s poškodovano membrano, torej mrtve celice. Vitalne celice so pravih oblik, brezbarvne in se svetijo, saj je intaktna membrana neprepustna za to barvilo. Viabilnost celic mora biti večja od 95 %. Po centrifugiranju (900 vrt/min, 6 min, centrifuga 5415), odstranitvi supernatanta, smo usedlino celic resuspendirali v določenem volumnu svežega gojišča in od tu odpipetirali 10  $\mu$ L celične suspenzije in dodali 40  $\mu$ L tripanskega modrila, nato pa smo 10  $\mu$ L te mešanice aplicirali v hemocitometer in pod svetlobnim mikroskopom prešteli žive celice. Število celic/mL smo izračunali po enačbi (1).

$$N = \frac{n}{4} \cdot 5 \cdot 10^4 \quad \dots(1)$$

n je število celic v štirih kvadratih hemocitometra, N je število celic v 1 mL suspenzije. Število 5 predstavlja 5-kratno redčitev celic v tripanskem modrilu, z  $10^4$  pa pomnožimo, ker je volumen suspenzije na področju kvadrata 1/10 000 mL.

### 3.2.4 Test citotoksičnosti

#### 3.2.4.1 Test MTT

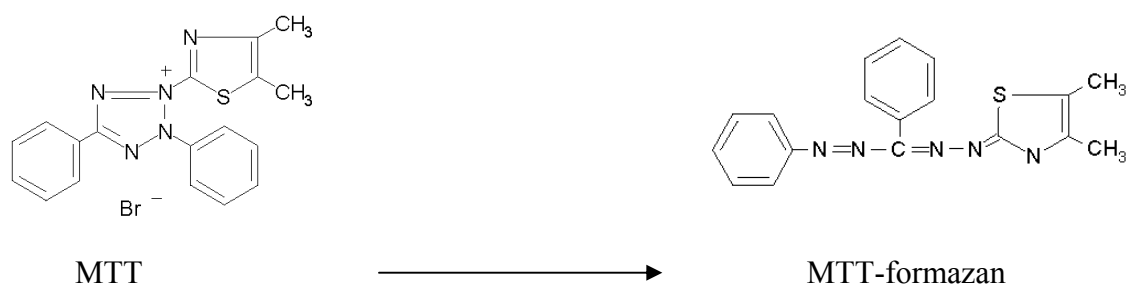
Test MTT je enostavna, natančna in kvantitativna kolorimetrična metoda za določevanje števila celic, ki ga je opisal Mossman (1983). Uporabljamo ga lahko za določevanje citotoksičnosti snovi in vpliva teh snovi na celično proliferacijo. MTT (1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid) je rumena vodotopna snov, ki jo mitohondrijska dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste netopne kristale formazana (slika 9). Kristali so topni v dimetilsulfoksidu (DMSO) in drugih organskih topilih. Količino nastalega formazana določimo kolorimetrično z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 570 nm in z referenčnim filtrom valovne dolžine 690 nm (merjenje  $\Delta_{OD}$  570 nm/ 690 nm). Zveza med količino nastalega formazana in številom živih celic je linearna in specifična za vsako celično linijo.

Celice z ustrešno gostoto smo nasadili v 200  $\mu$ L gojišča na prozorno ploščo s 96 vdolbinicami (preglednica 8), in sicer za vsako preverjano koncentracijo XN in kontrolo v petih paralelkah.

### Preglednica 8. Gostote nasajenih celic za test MTT.

CELIČNA LINIJA	GOSTOTA NASAJENIH CELIC ZA TEST MTT
U87	7000 celic / vdolbinico v 200 $\mu$ L
MiaPaCa-2	7000 celic / vdolbinico v 200 $\mu$ L
NCI H1299	8000 celic / vdolbinico v 200 $\mu$ L
Hep G2 EC	8000 celic / vdolbinico v 200 $\mu$ L
NHA	15 000 celic / vdolbinico v 200 $\mu$ L
HUVEC	8000 celic / vdolbinico v 200 $\mu$ L

Nasajene plošče smo nato inkubirali 24 h v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, nato pa smo celicam zamenjali gojišče s svežim gojiščem, ki je vseboval določeno koncentracijo XN v končnem volumnu 200  $\mu$ L. Vse izbrane celične linije smo tretirali s XN v koncentraciji 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 in 100  $\mu$ M. Kontrolnim petim vdolbinicam pa smo izrabljeno gojišče zamenjali s svežim, brez XN. Po 21-urni inkubaciji smo dodali MTT v končni koncentraciji 10 % (20  $\mu$ L v 200  $\mu$ L). Inkubirali smo še 3 ure, da je potekla tvorba kristalov formazana. Po končani inkubaciji smo previdno odstranili gojišče, pazili, da nismo odpipetirali kristalov formazana in dodali 200  $\mu$ L DMSO, v katerem smo raztopili kristale. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 570 nm z referenčnim filtrom pri 690 nm ( $A_{(570/690)}$ ).



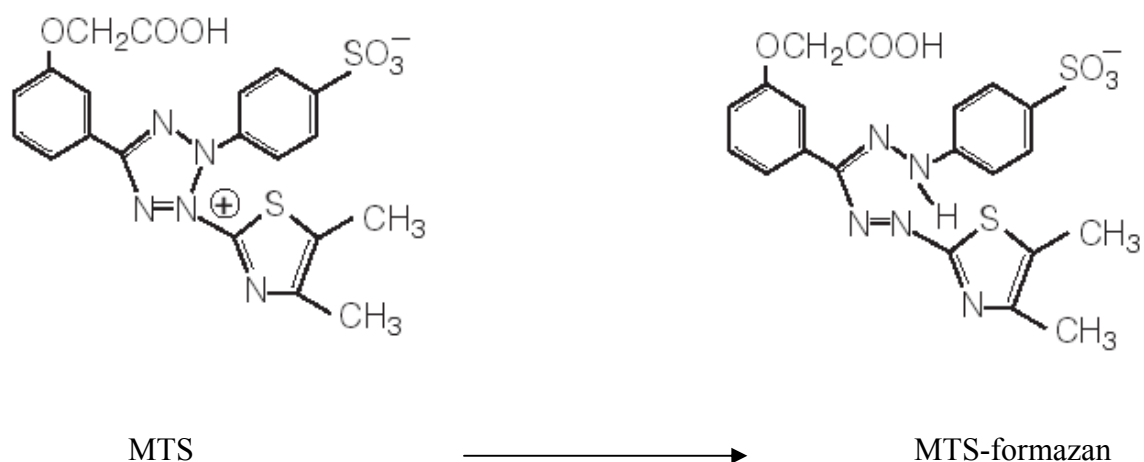
Slika 9. Struktura MTT in njegov formazanski produkt (Protokol test MTT: 10G-Pos-04-01. Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka).

#### 3.2.4.2 Test MTS

Test MTS (Protokol Promega TB169: »CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay«) smo uporabili za določanje citotoksičnosti XN na suspenzijskih celicah NC-NC. Sprememba MTS [3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3 karboksimetoksifenil)-



2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] v vodotopen formazan se zgodi pod vplivom dehidrogenaznih encimov, ki so le v živih celicah (slika 10). Količino nastalega formazana smo določili s spektrofluorimetrom. Pri valovni dolžini 515 nm smo izmerili absorbanco, ki je proporcionalna številu živih celic v merjeni kulturi. MTS je enostavna, natančna in kvantitativna kolorimetrična metoda za določanje proliferacije, viabilnosti in citotoksičnosti določenih substanc.



**Slika 10. Struktura tetrazolijeve soli MTS in njen formazanski produkt** (Protokol Promega TB169: »CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay«).

Prednost testa MTS v primerjavi s testom MTT je v tem, da pri MTS raztapljanje kristalov ni potrebno, ker je MTS-formazan vodotopen, tako da testiranje poteka brez spiranja ali žetve celic. Izognemo se uporabi strupenih organskih topil (npr. DMSO).

Celice NC-NC smo nasadili v petih paralelkah (40 000 celic/vdolbinico v 100  $\mu\text{l}$  serumskega medija z ustrežno koncentracijo XN) na plošče za gojenje celic s 96 vdolbinicami. Celice smo inkubirali 24 h pri 37  $^{\circ}\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$ . Nato smo tik pred uporabo zmešali raztopini MTS in PMS v razmerju 20:1 in mešanico dodali celicam v razmerju 1:5 (20  $\mu\text{l}$  na 100  $\mu\text{l}$ ). Nato smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 515 nm.

### 3.2.5 Testi za določanje stopnje apoptoze

Stopnjo apoptoze smo preverjali s tremi neodvisnimi testi in primerjali rezultate. Uvodni poskus je temeljil na diferencialnem barvanju morfoloških sprememb celic po tretiranju s

XN. Celična membrana je v odvisnosti od stopnje celičnega cikla različno prepustna za fluorescenčni barvili akridinoranžno in etidijev bromid (AO/EtBr). Z drugima dvema poskusoma pa smo preučevali znotrajcelično dogajanje po tretiranju celic s XN; določali smo izražanje genov vpletenih v proces apoptoze, ki vplivajo tudi na delovanje izvršiteljskih kaspaz 3 in 7 z odločilno vlogo pri apoptozi. Z zadnjim poskusom smo merili njuno aktivnost s posebnim kitom.

### 3.2.5.1 Diferencialno barvanje morfoloških sprememb celic

Diferencialno barvanje morfoloških sprememb celic s fluorescenčnimi barvili AO/EtBr temelji na različni prepustnosti celičnih membran v različnih stopnjah apoptoze. Raziskovalec subjektivno razvršča celice v štiri skupine, glede na kriterije za določanje stanja celic (morfološki znaki in obarvanost pod fluorescentnim mikroskopom). Testirali smo tri celične linije, in sicer NHA, HUVEC in U87. Akridinoranžno je vitalno barvilo, ki jedro živih celic obarva zeleno. Etidijev bromid pa oranžno obarva mrtve celice. Z barvanjem z AO/EtBr lahko razlikujemo med živimi, zgodnje apoptotskimi, pozno apoptotskimi in nekrotičnimi celicami na osnovi različne obarvanosti citoplazme in jedra, kot tudi po morfoloških posebnostih, značilnih za posamezno stanje celice.

Celice ustrezne gostote smo nasadili v plošče za gojenje celic s šestimi vdolbinicami v 2 mL ustreznega gojišča (preglednica 9).

**Preglednica 9. Gostote nasajenih celic za diferencialno barvanje morfoloških sprememb celic.**

CELIČNA LINIJA	GOSTOTA NASADITVE
NHA	600 000 celic/vdolbinico v 2 mL
HUVEC	150 000 celic/ vdolbinico v 2 mL
U87	200 000 celic/ vdolbinico v 2 mL

Celice smo inkubirali 24 h pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaciji smo izrabljeno gojišče zamenjali z gojiščem za tretiranje. Vse celične linije smo tretirali s XN v koncentraciji 10 in 50 µM. Nasadili smo tudi celice negativne in pozitivne kontrole. Celicam negativne kontrole smo zamenjali gojišče s svežim gojiščem brez XN, celice pozitivne kontrole pa smo tretirali s stavrosporinom, mutageno snovjo, ki povzroča apoptozo celic. Celice tretirane s XN smo nato inkubirali 24 h, s stavrosporinom pa smo celice inkubirali 4 h

(dodali smo ga 20  $\mu\text{L}$  - končna koncentracija 1  $\mu\text{M}$  – 4 h pred iztekom 24 h inkubacije celic s XN). Po končani inkubaciji smo odpipetirali gojišče in ga shranili v centrifugirke, celice smo sprali z 1x-PBS in tudi to prenesli v isto centrifugirko. Celice na plošči smo tretirali s tripsinom in odlepljene celice odpipetirali iz vdolbinice in jih prenesli v centrifugirko, kamor smo že predhodno shranili izrabljen medij in PBS iz iste vdolbinice. Centrifugirke smo centrifugirali pri 900 vrt/min 6 minut (centrifuga 5415), nato smo odstranili supernatant, usedlino celic pa resuspendirali v 80  $\mu\text{L}$  svežega gojišča. Od tod smo nato 50  $\mu\text{L}$  suspenzije prenesli v mikrocentrifugirke in dodali še 2  $\mu\text{L}$  barvila AO/EtBr (raztopljeno v PBS v razmerju 1:1) s koncentracijo 100  $\mu\text{g/mL}$ . Barvilo je svetlobno občutljivo, zato smo mikrocentrifugirke skrbno zavili v alufolijo. Na objektno stekelce smo kanili 10  $\mu\text{L}$  obarvane celične suspenzije in pod kotom pokrili s krovnim stekelcem, da niso nastali zračni mehurčki. Objektno stekelce smo prenesli pod objektiv fluorescentnega mikroskopa in pri povečavi 60x in skozi filter B-2A opazovali obarvanost celic in morfološke značilnosti. Šteli smo normalne žive celice, apoptotske celice, med katere spadajo zgodnje in pozno apoptotske, ter nekrotične celice. Prešteli smo okoli 400 celic. Delež apoptotskih celic smo izračunali po enačbi (2).

$$\% \text{ apoptotskih celic} = \frac{\text{število apoptotskih celic}}{\text{število vseh celic}} * 100 \quad \dots(2)$$

Na podlagi opazovanj celic negativne in pozitivne kontrole smo določili kriterije za razvrstitev v štiri skupine, podane v preglednici 10. Kriteriji veljajo za vse tri celične linije.

**Preglednica 10. Kriteriji za določanje stanja celic po barvanju z AO/EtBr (Hreljac, 2004: 25).**

STANJE CELIC	OBARVANOST	MORFOLOŠKE POSEBNOSTI
Žive celice	Intenzivno zeleno jedro in citoplazma	Okrogle celice s pravilnim okroglim jedrom. Lahko se pojavljajo izrastki v membrani.
Zgodnje apoptotske celice (ZA)	Manj intenzivno zelena pobarvanost jedra in citoplazme	Jedro je potisnjeno ob rob celice, je nenavadne oblike ali razpadlo, pogosta je zgostitev citoplazme
Pozno apoptotske celice (PA)	Intenzivno oranžno-rdeče jedro in oranžna citoplazma	Skrčene celice različnih oblik, značilen razpad jedra
Nekrotične celice	Svetlo oranžno jedro in citoplazma	Zelo povečane celice s povečanim ali razpadlim jedrom

### 3.2.5.2 Izražanje genov *bax* in *bcl-2*

#### 3.2.5.2.1 Izolacija RNA z reagentom TRIZOL

Celice smo gojili na ploščah s 6 vdolbinicami. Celice U87 smo nasadili z gostoto 200 000 celic/vdolbinico v 2 mL svežega gojišča, celice NHA pa z gostoto 600 000 celic/vdolbinico v 2 mL svežega gojišča. Celice smo pustili rasti 24 h, nato pa smo gojišče zamenjali z gojiščem za tretiranje s XN v koncentraciji 10, 40 in 70  $\mu\text{M}$  za U87 in s XN v koncentraciji 10, 50 in 70  $\mu\text{M}$  za NHA. Ena vdolbinica je služila za kontrolo, zato smo izrabljeno gojišče zamenjali s svežim gojiščem. Ponovno smo inkubirali 24 h, nato smo odstranili gojišče, sprali celice z 1xPBS in celice 5 minut lizirali z dodatkom reagenta Trizol. Trizol je mono-fazna raztopina fenola in gvanidin izotiocianata. Ta reagent ohrani integriteto RNA, ker inaktivira RNaze, poruši pa celično strukturo, celična vsebina se izloči in razdre komplekse proteinov z nukleinskimi kislinami. Lizat celic smo s pipeto v vdolbinici dobro premešali, ga prenesli v mikrocentrifugirko in pustili na sobni temperaturi 10 minut. Dodali smo 0,2 mL kloroforma na 1 mL Trizola in 8  $\mu\text{L}$  glikogena (2 mg/mL), ker se glikogen obori hkrati z RNA in je zato usedlina RNA bolj vidna. Mikrocentrifugirke smo dobro pretresli in jih inkubirali 3 minute. Mikrocentrifugirke smo nato centrifugirali

15 minut pri 10 000 vrt/min in temperaturi 4 °C (centrifuga 3K15). Tako smo ločili organsko, ki je vsebovala DNA in proteine, od vodne faze, ki je vsebovala RNA. Vodno, zgornjo brezbarvno, fazo smo odpipetirali v nove mikrocentrifugirke, spodnjo in vmesno organsko fazo pa smo zavrgli, ker nismo izolirali DNA in proteinov. Vodni fazi smo nato dodali 0,5 mL izopropil alkohola in mikrocentrifugirko z obračanjem premešali, ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi, nato smo mikrocentrifugirke centrifugirali 10 minut pri 10 000 vrt/min in 4 °C (centrifuga 3K15). RNA tvori usedlino na zunanjem robu dna mikrocentrifugirke. Previdno smo odstranili supernatant, sprali usedlino z 1 mL 75 % etanola, dobro premešali na vorteksu in nato ponovno centrifugirali 5 minut pri 7500 vrt/min in 4 °C (centrifuga 3K15). S pipeto smo odstranili supernatant in na zraku posušili usedlino, ki je vsebovala RNA. Suho usedlino smo raztopili v 30 µL DEPC-H<sub>2</sub>O, nato 5 minut inkubirali mikrocentrifugirke v vodni kopeli pri 50 °C in jih nato do nadaljnje uporabe shranili pri -80 °C.

#### 3.2.5.2.2 Merjenje koncentracije RNA

Koncentracijo RNA smo izmerili s kompletom reagentov »RiboGreen RNA Quantation kit«. Pripravili smo umeritveno krivuljo s standardnimi koncentracijami RNA, 20 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL in 5000 ng/mL, ki smo jih pripravili z redčenjem ribosomske RNA s koncentracijo 100 µg/mL v pufru 1x TE. Vzorce z izolirano RNA, smo redčili s pufrom 1x TE 50 krat. Fluorescirajoči reagent »Ribogreen«, ki se veže na RNA, smo redčili s pufrom 1x TE 200 krat. Na črno ploščo s 96 vdolbinicami smo nanesti 100µL vsake standardne koncentracije ribosomske RNA v treh paralelkah ter 100 µL vzorčne RNA v treh paralelkah. Nanesli smo tudi slepi vzorec, ki je vseboval le pufer 1x TE. V vsako vdolbinico smo dodali 100 µL raztopine »Ribogreen« ter ploščo pokrili z aluminijasto folijo, ker je reagent občutljiv za svetlobo. Ploščo smo rahlo pretresli, da smo ustvarili homogene raztopine v vdolbinicah, nato pa smo s spektrofluorimetrom izmerili fluorescenco pri ekscitacijski valovni dolžini 485 nm z referenčnim filtrom pri 535 nm. Koncentracijo RNA v vzorih smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje.

### 3.2.5.2.3 Prepis RNA v cDNA

Za prepis RNA v cDNA smo uporabili komplet reagentov »High capacity cDNA archive kit«. Najprej smo pripravili osnovno mešanico reagentov za sintezo cDNA za naše število vzorcev (preglednica 11).

**Preglednica 11. Reakcijska mešanica za 50 mikrolitrsko reakcijo za sintezo cDNA**

1) OSNOVNA REAKCIJSKA MEŠANICA VSAKEGA VZORCA (25 µL)	
Reagent	Volumen
10x pufer	5 µL
25x raztopina dNTP-jev	2 µL
10x raztopina začetnih oligonukleotidov	5 µL
Reverzna transkriptaza	2,5 µL
RNazni inhibitor	2,5 µL
Voda brez RNaz	8 µL
Končni volumen	25 µL
2) MEŠANICA ZA VSAK VZOREC POSEBEJ (25 µL)	
50 ng vzorčne RNA	x (določili iz umeritvene krivulje)
DEPC-H <sub>2</sub> O	25 µL – x

Za sintezo cDNA smo uporabili PCR-mikrocentrifugirke z volumnom 200 µL. V posamezno mikrocentrifugirko smo najprej odpipetirali 25 µL osnovne reakcijske mešanice, nato ustrezen volumen DEPC-H<sub>2</sub>O in nazadnje še volumen vzorčne RNA, ki je vseboval 50 ng RNA. Za prepis smo uporabili aparat za PCR, v katerem je reverzna transkripcija tekla najprej 10 minut pri 25 °C in nato še 2 h pri 37 °C. Vzorce smo za nadaljnjo uporabo shranili pri temperaturi – 20 °C.

### 3.2.5.2.4 Kvantitativna PCR

Metodo kvantitativne PCR smo uporabili za določanje izražanja genov za proteine Bax in Bcl-2. Vzdrževalni gen za protein GADPH smo uporabili za notranjo kontrolo. Osnovna reakcijska mešanica (9 µL za en vzorec) je bila sestavljena iz kompleta reagentov »Taq Man Universal PCR MasterMix« (vsebuje optimizirani pufer, encim UNG-AmpErase, DNA -polimerazo Taq, mešanico dNTP-jev z dUTP-ji in barvilo ROX), iz sonde za preučevani gen, sonde in začetnih oligonukleotidov za vzdrževalni gen (GADPH), prvega

začetnega oligonukleotida za preučevani gen, drugega začetnega oligonukleotida za preučevani gen in DEPC-H<sub>2</sub>O (zaporedja sond in začetnih oligonukleotidov za preučevana gena (*bax* in *bcl-2*) so zapisana v preglednici 12, reakcijska mešanica za 10 µL reakcijo Q-PCR pa v preglednici 13). Najprej smo v vdolbinice na mikrotitrski plošči za PCR odpipetirali 9 µL osnovne reakcijske mešanice in nato dodali še 1 µL vzorca cDNA. Dve vdolbinici sta bili za negativno kontrolo, nanesti smo 9 µL osnovne reakcijske mešanice in 1 µL DEPC-H<sub>2</sub>O. Ploščo smo prekrili s posebno prozorno folijo in centrifugirali 2 minuti pri 3000 vrt/min in sobni temperaturi (centrifuga 3K15).

**Preglednica 12. Specifični začetni oligonukleotidi in sonde za kvantitativno PCR.**

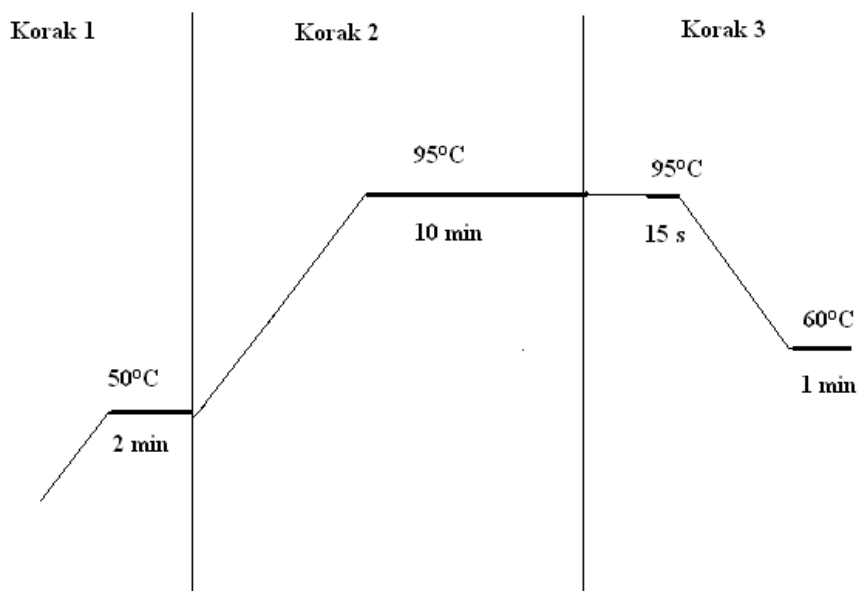
<i>bax</i>	
Sonda	5'-AAC TGG TGC TCA AGG CCC TGT GCA-3'
1. zač. oligont.	5'-TCC CGG AGG AAG TCC AAT G-3'
2. zač. oligont.	5'-CGA GTG GCA GCT GAC ATG TTT-3'
<i>bcl-2</i>	
Sonda	5'-TGA AGT ACA TCC ATT ATA AGC TGC CGC AGA GGG-3'
1. zač. oligont.	5'- TCC CGC ATC CCA CTC GTA-3'
2. zač. oligont.	5'-GCG CAC GCT GGG AGA A-3'

**Preglednica 13. Reakcijska mešanica za 10 mikrolitrsko reakcijo Q-PCR.**

REAGENT	VOLUMEN
Master-mix (2x)	5 µL
Sonda za gen	0,5 µL
Sonda in začetni oligonukleotidi za GADPH	0,5 µL
1. začetni oligonukleotid	0,2 µL
2. začetni oligonukleotid	0,2 µL
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,6 µL
Vzorec	1 µL

PCR je potekala v aparaturi »ABI 7900HT« s prednastavljenim programom, ki je prikazan na sliki 11. Pri temperaturi 50 °C in v času 2 minut je encim UNG-AmpErase razgradil morebitne nepravilne produkte PCR, nato je v času 10 min in pri 95 °C potekala aktivacija na temperaturo odporne DNA-polimeraze Taq, sledila je denaturacija DNA v enojne verige

pri 95 °C 15 sekund in nato prileganje začetnih oligonukleotidov ter sinteza nove verige DNA ob matični DNA pri temperaturi 60 °C eno minuto. PCR je tekla v 40 ciklih.



Slika 11. Potek verižne reakcije s polimerazo (PCR).

Rezultate smo obdelali s programom SDS 2.2.2. Rezultat kvantitativne PCR je vrednost Ct. Ct je zaporedna številka cikla podvajanja, pri katerem je jakost fluorescenčnega signala presegla prazno vrednost. Zanimalo nas je relativno izražanje genov. Za vsak vzorec smo izračunali razliko med vrednostjo Ct za določen gen in vrednostjo Ct za GADPH. Vse vzorce smo primerjali s kontrolnim vzorcem (izražanje genov brez dodanega XN). Izračunali smo razliko med vrednostjo  $\Delta Ct$  za določen gen in vrednostjo  $\Delta Ct$  za referenčni vzorec (kontrola). V vsakem ciklu PCR se število molekul podvoji. Končno vrednost smo izračunali po enačbah (3), (4) in (5).

$$\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{GADPH} \quad \dots (3)$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{referenca} \quad \dots (4)$$

$$RI = 2^{-\Delta \Delta Ct} \quad \dots (5)$$



### 3.2.5.3 Določanje aktivnosti izvršiteljskih kaspaz 3 in 7

Komplet testa Apo-ONE™ je sestavljen iz vseh potrebnih reagentov za hitro in občutljivo meritev aktivnosti kaspaz 3 in 7. Pufer hitro in učinkovito lizira/permeabilizira celice in omogoči optimalno encimsko delovanje kaspaze 3 in 7. Komplet vsebuje tudi kaspazni substrat Z-DEVD-R110 v pufru (1:100). Kaspazi 3 in 7 specifično prepoznata zaporedje Asp-Glu-Val-Asp, ki se imenuje DEVD in cepita C-terminalno od Asp. Pri tem se sprosti rodamin 110 (R110), ki fluorescira. (Povzeto po navodilih za uporabo proizvajalca Promega No. 295.) Fluorescenco smo izmerili s spektrofluorimetrom pri valovni dolžini 485 nm z referenčnim filtrom pri 535 nm.

Celice ustrezne gostote (preglednica 14) smo v petih paralelkah nasadili na črno ploščo s 384 vdolbinicami. Nasadili smo tudi pet paralelk, ki so bile za kontrolo in pet paralelk za slepo kontrolo. Celice smo inkubirali 24 h pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaciji smo celice tretirali s XN v 30 µL svežega gojišča, kontrolnim celicam smo le zamenjali gojišče s svežim. Celice smo ponovno inkubirali pri enakih pogojih 21,5 h, nato smo dodali 30 µL reagenta »ApoONE« homogenega testa in nato izmerili absorbanco.

**Preglednica 14. Gostote nasajenih celic za test »ApoONE«.**

<b>CELIČNA LINIJA</b>	<b>GOSTOTA NASADITVE</b>
NHA	9000 celic/ vdolbinico v 80 µL
HUVEC	3000 celic/ vdolbinico v 80 µL
U87	5000 celic/ vdolbinico v 80 µL
MiaPaCa-2	5000 celic/ vdolbinico v 80 µL
HepG2	3000 celic/ vdolbinico v 80 µL

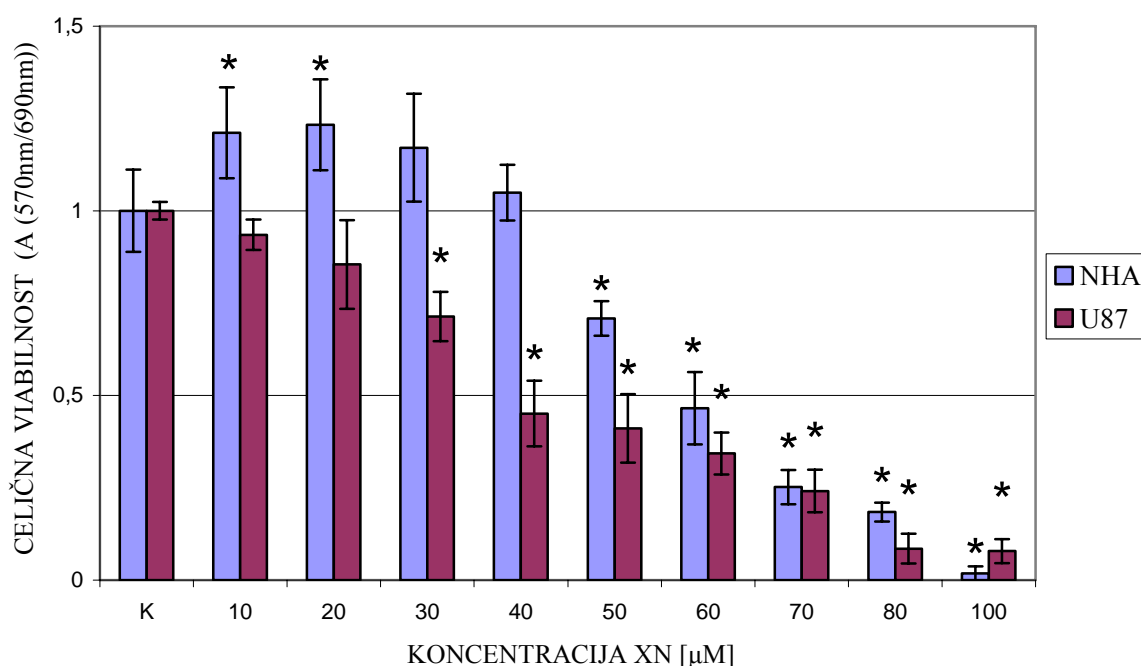
### **3.2.6 Statistična obdelava rezultatov**

Rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost meritev paralelk in več neodvisnih poskusov, obdelali smo jih s programom Microsoft Excel, s katerim smo tudi izračunali standardno deviacijo in standardno napako, ki smo jo prikazali tudi na slikah. Za statistično analizo podatkov smo uporabili Studentov t-test z dvodelno porazdelitvijo in dvovzorčno neenako varianco. Odstopanja od kontrole smo imeli za statistično značilna, če je bila verjetnost, da sta dva vzorca enaka, manjša od 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 4 REZULTATI

### 4.1 CITOTOKSIČNOST KSANTOHUMOLA

Preverjali smo citotoksičnost XN za različne vrste celičnih linij. Primerjali pa smo tudi vpliv XN na dveh celičnih linijah enakega izvora - iz možganskega tkiva (slika 12). Kot nerakavo celično linijo smo izbrali NHA (Normal Human Astrocyte) in kot rakavo spremenjeno smo izbrali linijo U87, pridobljeno iz malignega glioblastoma.

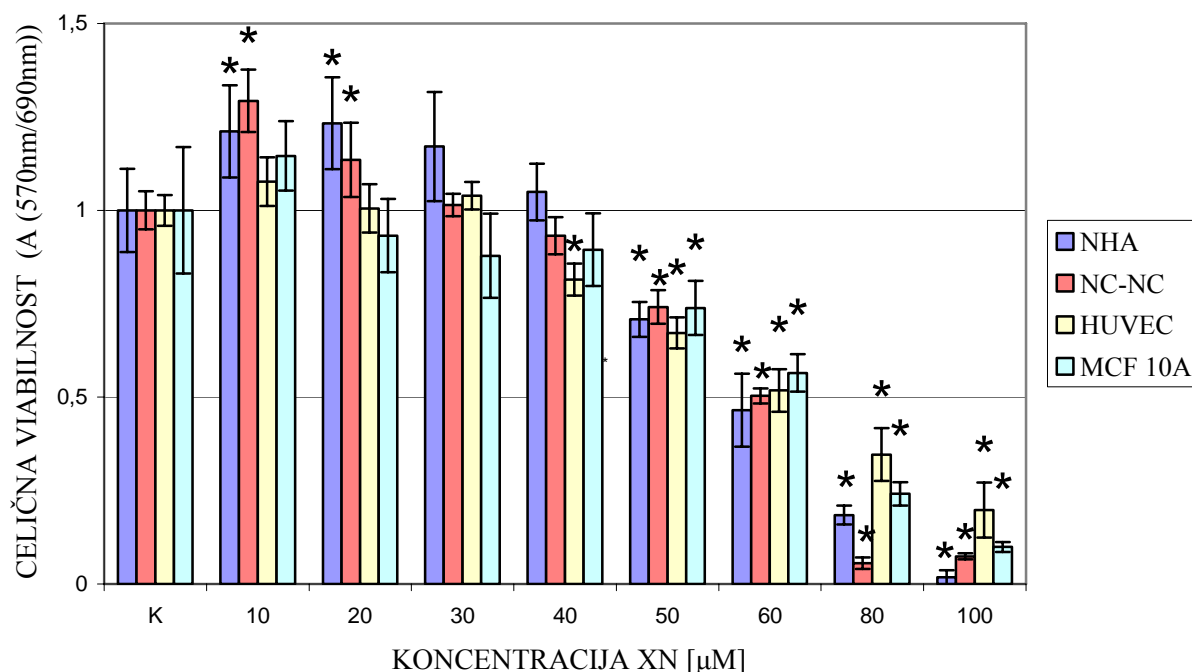


**Slika 12. Viabilnost rakave celične linije U87 in nerakave celične linije NHA v odvisnosti od XN v naraščajočih koncentracijah.** Rezultati so naravnani glede na kontrolo (netretirane celice), ki smo ji določili vrednost 1. Vrednosti absorbance (A) so relativizirane. Prikazane so povprečne vrednosti izmerjene optične gostote pri valovni dolžini 570 nm in z referenčnim filtron 690 nm, ki je premo sorazmerna številu živih celic. Pri obeh celičnih linijah smo uporabili podatke dveh neodvisnih poskusov v petih vzporednih ponovitvah. V histogramih je prikazana standardna napaka. \* označuje statistično značilno odstopanje od kontrole.

Ugotovili smo, da viabilnost rakave celične linije U87 začne upadati pri nižjih koncentracijah XN, statistično značilno odstopanje (v smislu zmanjševanja viabilnosti) od kontrole se pojavi že pri koncentraciji 30 µM XN pri U87 in šele pri 50 µM XN pri NHA. Pri koncentraciji 70 µM XN preživi le približno četrtnina celic obeh vrst celičnih linij,

koncentracija 100  $\mu\text{M}$  XN pa je za obe celični liniji povsem toksična. Statistično značilno odstopanje od kontrole pri NHA opazimo tudi pri 10 in 20  $\mu\text{M}$  XN, kjer opazamo zvišanje viabilnosti.

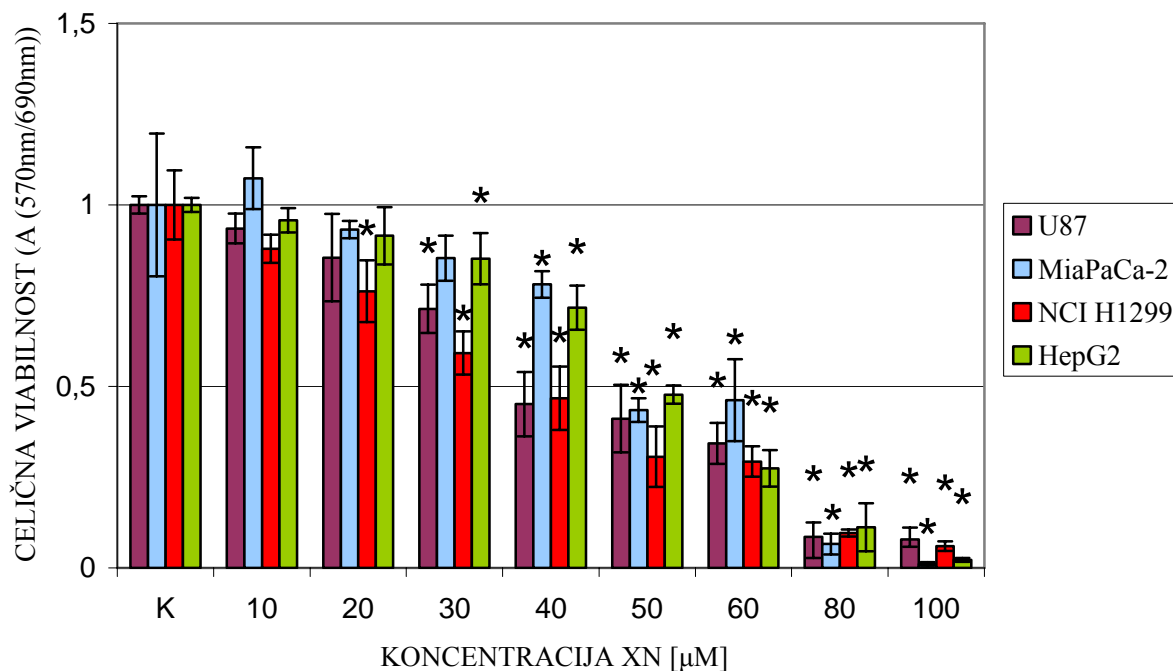
Poleg omenjenih celičnih linij enakega izvora (NHA in U87) smo preverjali meje citotoksičnosti XN tudi pri ostalih izbranih vrstah nerakavih (slika 13) in rakavih (slika 14) celic in in s tem določili koncentracijska območja, v katerem XN deluje selektivno citotoksično.



**Slika 13. Viabilnost nerakavih celičnih linij NHA, NC-NC, HUVEC in MCF 10A v odvisnosti od XN v naraščajočih koncentracijah.** Rezultati so naravnani glede na kontrolo (netretirane celice), ki smo ji določili vrednost 1. Vrednosti absorbance (A) so relativizirane. Prikazane so povprečne vrednosti izmerjene optične gostote pri valovni dolžini 570 nm in z referenčnim filtrom 690 nm, ki je premo sorazmerna številu živih celic. Pri vseh celičnih linijah smo uporabili podatke dveh neodvisnih poskusov v petih vzporednih ponovitvah. V histogramih je prikazana standardna napaka. \* označuje statistično značilno odstopanje od kontrole.

Primerjava vseh štirih nerakavih celičnih linij kaže, da je XN približno enako citotoksičen za vse celične linije. Iz slike 13 je razvidno, da približno polovica celic vseh izbranih nerakavih celičnih linij preživi koncentracijo 60  $\mu\text{M}$  XN. Prvo

statistično značilno odstopanje od kontrole se kaže v povišani proliferaciji celic NHA in NC-NC pri koncentraciji 10 in 20  $\mu\text{M}$  XN, znižanje viabilnosti pa opazimo pri koncentraciji 50 - 100  $\mu\text{M}$  XN.



**Slika 14. Viabilnost rakavih celičnih linij U87, MiaPaCa-2, NCI H1299 in HepG2 v odvisnosti od XN v naraščajočih koncentracijah.** Rezultati so naravnani glede na kontrolo (netretirane celice), ki smo ji določili vrednost 1. Vrednosti absorbance (A) so relativizirane. Prikazane so povprečne vrednosti izmerjene optične gostote pri valovni dolžini 570 nm in z referenčnim filtron 690 nm, ki je premo sorazmerna številu živih celic. Pri vseh celičnih linijah smo uporabili podatke dveh neodvisnih poskusov v petih vzporednih ponovitvah. V histogramih je prikazana standardna napaka. \* označuje statistično značilno odstopanje od kontrole.

Kot kaže slika 14 so rakave celične linije bolj občutljive za XN, saj se začne viabilnost teh celičnih linij zmanjševati že pri koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  XN, kar je nižja koncentracija XN kot pri nerakavih. Razvidne so tudi razlike glede na izvor celičnih linij, a je trend upadanja viabilnosti primerljiv. Manj kot polovica celic vseh izbranih rakavih celičnih linij preživi koncentracijo 50  $\mu\text{M}$  XN. Zadnji dve najvišji koncentraciji XN, 80 in 100  $\mu\text{M}$ , pa sta tudi za rakave celične linije povsem toksični.

S primerjavo povprečne koncentracije XN, pri kateri preživi 50 % celic različnih celičnih linij (slika 15), smo potrdili, da je koncentracija XN, ki uniči 50 % celic višja za nerakave kot za rakave celične linije.

Za izračun  $LD_{50}$  smo uporabili naslednjo enačbo

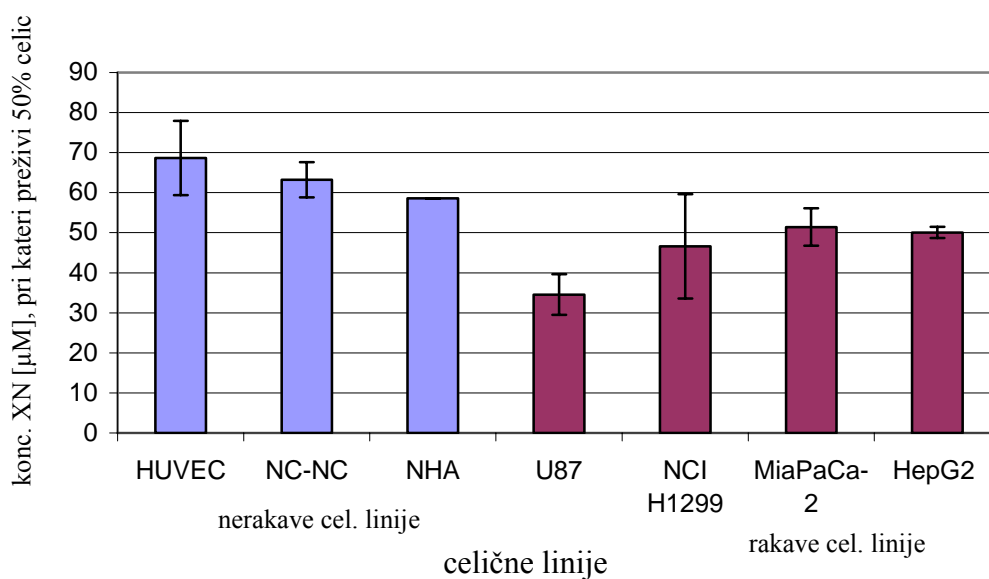
$$LD_{50} = c_i + (c_{i+1} - c_i) \cdot \frac{0,5 - A_i}{A_{i+1} - A_i} \quad \dots (6)$$

$c_i$ ..... koncentracija, pri kateri smo določili normalizirano povprečno absorbanco nad 0,5

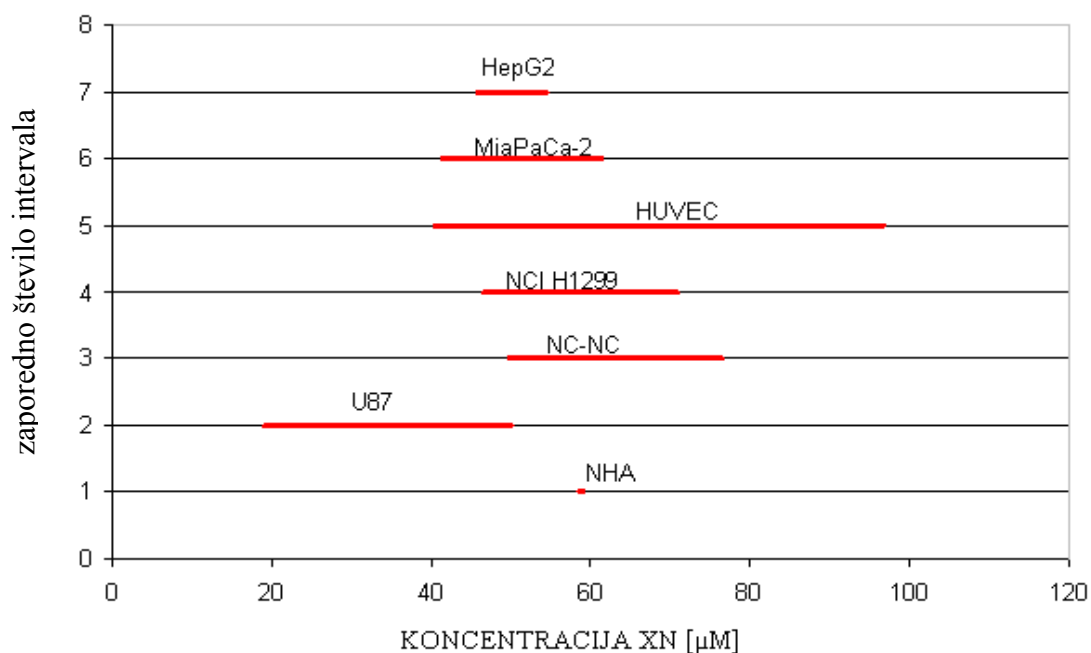
$c_{i+1}$ ..... koncentracija, pri kateri smo določili normalizirano povprečno absorbanco pod 0,5

$A_i$ ..... normalizirana povprečna absorbanca pri koncentraciji  $c_i$

$A_{i+1}$ ..... normalizirana povprečna absorbanca pri koncentraciji  $c_{i+1}$



**Slika 15. Povprečne koncentracije XN, pri kateri preživi 50 % celic ( $LD_{50}$ ).** Statistično smo določili  $LD_{50}$  in ga grafično predstavili. Za izračun  $LD_{50}$  smo uporabili podatke treh neodvisnih poskusov v petih vzporednih ponovitvah. V histogramih je prikazana standardna napaka.



**Slika 16. LD<sub>50</sub>, določen z intervali zaupanja.** 95 % verjetnosti je, da točna vrednost LD<sub>50</sub> leži znotraj intervala predstavljenega na sliki 16.

$$SE_{LD50} = \frac{st.dev_{LD}}{\sqrt{\text{št. poskusov}}} \quad \dots(7)$$

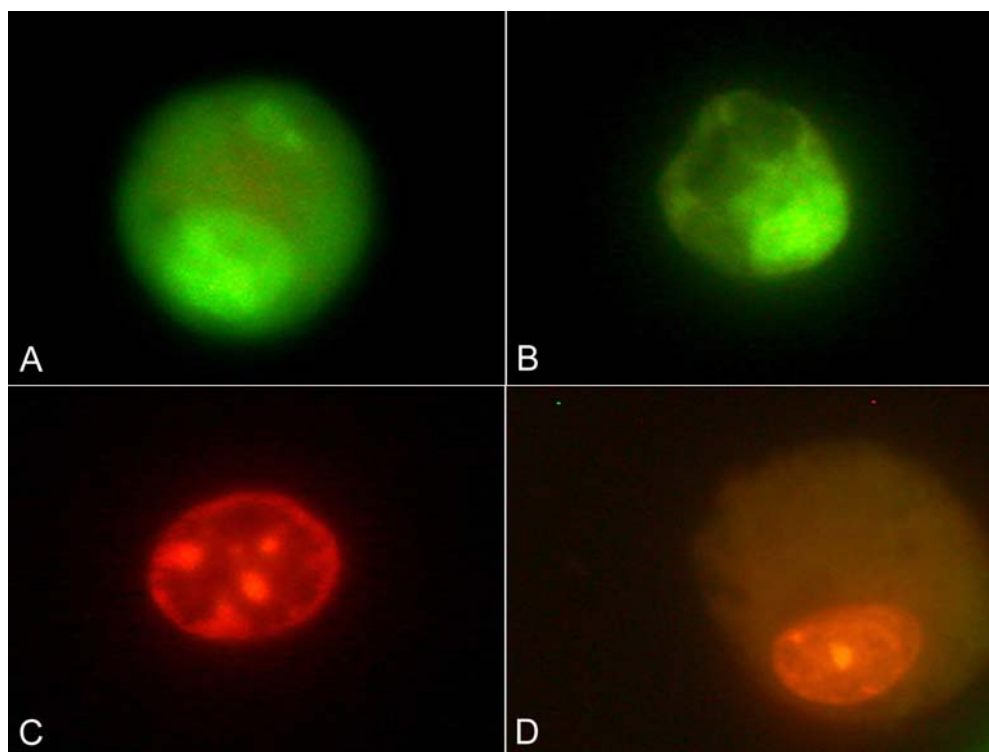
$$IZ = \overline{x_{LD50}} \pm 4,3 \cdot SE_{LD50} \quad \dots(8)$$

Na sliki 16 je predstavljen drug način prikaza letalne doze 50. Standardno napako (SE) smo izračunali po formuli (7) in nato uporabili formulo (8) za izračun intervalov zaupanja (IZ). Iz slike 16 je razvidno, da je bila variabilnost pri celični liniji NHA izredno majhna, ponovljivost pa zelo velika, zato je pripadajoči interval izredno kratek. Grafični prikaz nazorno prikaže, da je pri nekaterih linijah razpon precej širok, kar pomeni, da je bila ponovljivost poskusov manjša. Intervali različnih celičnih linij se lahko tudi prekrivajo, kar pomeni, da se lahko njihova vrednost LD<sub>50</sub> nahaja v enakem koncentracijskem območju, kar je vsaj delno posledica različnega izvora celičnih linij.

## 4.2 VPLIV KSANTOHUMOLA NA APOPTOZO

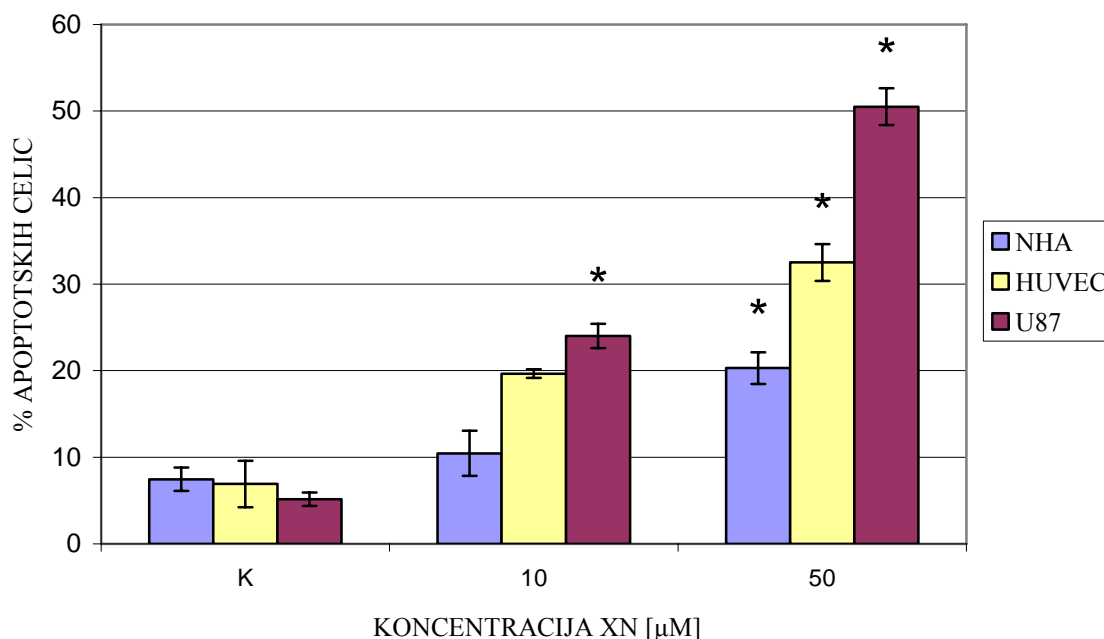
### 4.2.1 Diferencialno barvanje morfoloških sprememb celic

Z diferencialnim barvanjem morfoloških sprememb celic po tretiranju s XN smo določili stopnjo viabilnosti celic (slika 17) ter to grafično predstavili z deležem apoptotskih celic različnih celičnih linij NHA, HUVEC in U87 pri naraščajoči koncentraciji XN (slika 18).



**Slika 17. Različne stopnje viabilnosti celic po barvanju z AO/EtBr (Hreljac, 2004: 30).** Legenda: A: živa celica, B: zgodnje apoptotska celica, C: pozno apoptotska celica, D: nekrotična celica. Morfološke značilnosti in obarvanost so bile podobne pri vseh treh celičnih linijah, ki smo jih diferencialno barvali (NHA, HUVEC in U87). Na sliki so prikazane celice HUVEC pod fluorescentnim mikroskopom pri povečavi 60X.



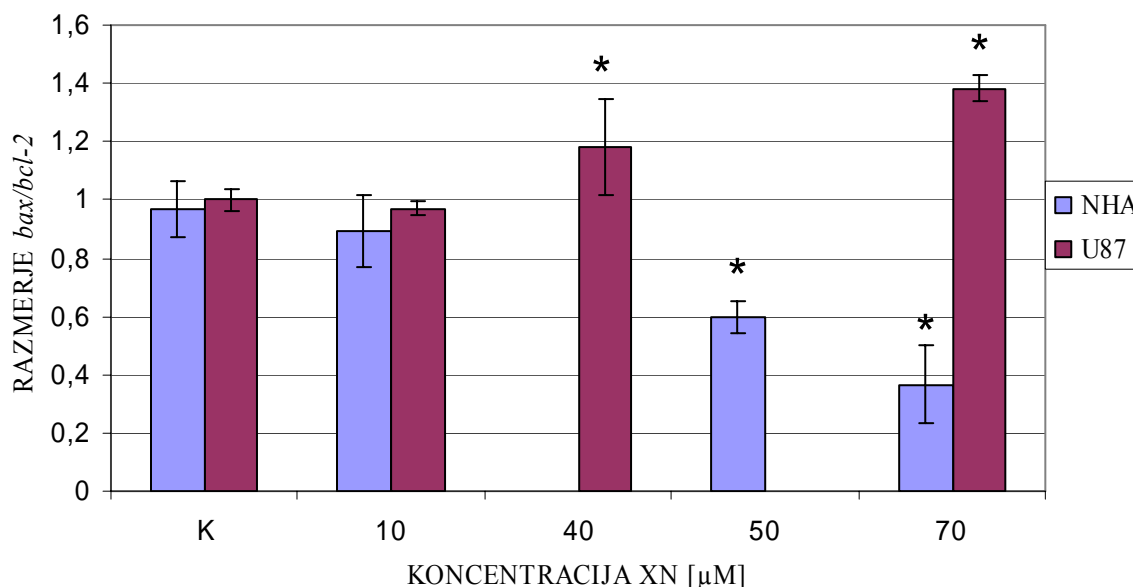


**Slika 18. Delež apoptotskih celic pri celičnih linijah NHA, HUVEC in U87 po 24 urah inkubacije s XN v koncentraciji 10 in 50 μM.** Uporabili smo podatke treh neodvisnih poskusov. V histogramih je prikazana standardna napaka. \* označuje statistično značilno odstopanje od kontrole.

Iz slike 18 je razvidno, da so deleži apoptotskih celic vseh treh celičnih linij primerljivi s kontrolo (netretirane celice). Rezultati diferencialnega barvanja kažejo znatno povišanje deleža apoptotskih celic z višanjem koncentracije XN. Bistvena razlika je med normalni človeškimi astrociti (NHA) in rakavo celično linijo U87. Razlika v deležih je opazna tudi pri obeh nerakavih celičnih linijah (NHA in HUVEC), saj je delež celic, ki so prehajale v apoptozo dvakrat višji pri celicah HUVEC v primerjavi z NHA pri koncentraciji 10 μM XN. Razlika se ohrani tudi pri višji, 50 μM koncentraciji XN, deleži apoptotskih celic pa se pri vseh treh celičnih linijah povečajo. Pri obeh izbranih koncentracijah XN je delež apoptotskih celic rakave celične linije U87 najvišji in tudi statistično odstopa od kontrole.

#### 4.2.2 Izražanje genov

Kot kazalec celične smrti smo uporabili tudi razmerje stopnje izražanja genov *bax/bcl-2*, ki je količnik med relativnim izražanjem proapoptotskega gena *bax* in relativnim izražanjem antiapoptotskega gena *bcl-2* v posamezni celični kulturi (slika 19).



**Slika 19. Razmerje stopnje izražanja genov *bax/bcl-2* v odvisnosti od naraščajoče koncentracije XN.**

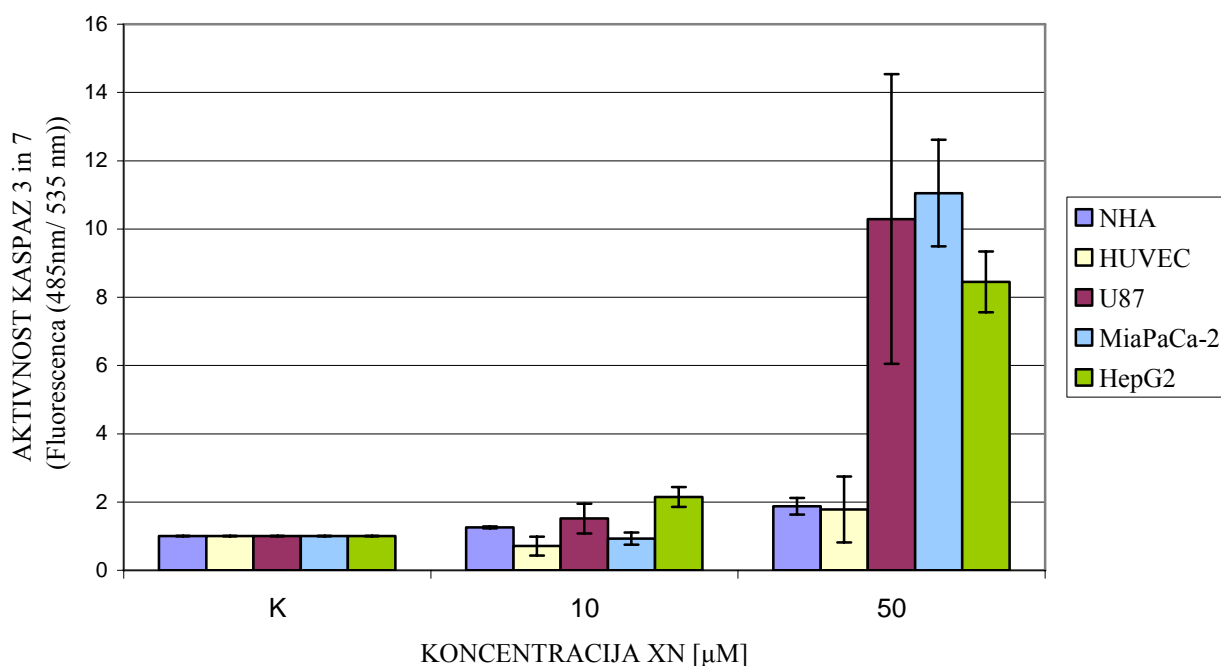
Izražanje proapoptotskega *bax* gena in antiapoptotskega *bcl-2* gena smo določili s Q-PCR. Prikazane so povprečne vrednosti *Bax/Bcl-2* razmerja. Pri obeh celičnih linijah smo uporabili podatke dveh neodvisnih poskusov v dveh vzporednih ponovitvah. V histogramih je prikazana standardna napaka. \* označuje statistično značilno odstopanje od kontrole.

Iz slike 19 je razvidno, da nižje koncentracije XN (10  $\mu\text{M}$ ) ne vplivajo na izražanje proapoptotskih ali antiapoptotskih genov, saj je razmerje primerljivo s kontrolo (netretirane celice). Razlike pa se pokažejo pri višjih, delno toksičnih koncentracijah XN; pri rakavih celicah U87, tretiranih s XN v koncentraciji 40  $\mu\text{M}$  smo izmerili višje izražanje proapoptotskega gena *bax*, posledično se je povečalo razmerje *bax/bcl-2*. Celice U87 so torej prehajale v apoptozo, če je prišlo tudi do translacije mRNA gena *bax*. Za nerakavo celično linijo NHA pa smo izbrali nekoliko višjo koncentracijo XN (50  $\mu\text{M}$ ). Razmerje stopnje izražanja genov *bax/bcl-2* je po takem tretmaju statistično značilno nižje od kontrole. Najvišja izbrana koncentracija XN, 70  $\mu\text{M}$ , je že precej toksična za obe celični

liniji, a povzroči pri vsaki liniji drugačen odziv. Glede na rezultate citotoksičnosti (MTT) lahko trdimo, da je XN v koncentraciji 70  $\mu\text{M}$  toksičen za obe vrsti celic. Pri rakavo spremenjenih celicah U87 se je razmerje *bax/bcl-2* zelo povečalo, kar pomeni, da je bilo izražanje genov v prid proapoptotskim. Pri celicah NHA pa je bilo izražanje proapoptotskih genov bistveno nižje.

#### 4.2.3 Aktivnost kaspaz

Z ugotavljanjem aktivnosti izvršiteljskih kaspaz 3 in 7 lahko določimo, če se sproži proces apoptoze (slika 20) po notranji ali zunanji poti, saj sta ti dve kaspazi skupni obema potema in končni molekuli v kaskadi kaspaz.



**Slika 20. Aktivnost kaspaz 3 in 7 različnih celičnih linij, izmerjena s testom »ApoONE«.** Izmerjena fluorescenca (485 nm/ 535 nm) je sorazmerna s količino aktivnih kaspaz 3 in 7 in je izražena na število celic. Prikazane so povprečne vrednosti izmerjene fluorescence. Celice smo tretirali s XN 24 h. (Rezultati so naravnani glede na kontrolo (netretirane celice), ki smo ji določili vrednost 1). Pri vseh celičnih linijah smo uporabili podatke dveh neodvisnih poskusov v petih vzporednih ponovitvah. V histogramih je prikazana standardna napaka.

Že pri nizki, netoksični (glede na MTT) koncentraciji XN (10  $\mu\text{M}$ ) so opazne razlike med celičnimi linijami. Rahlo povečanje aktivnosti izvršiteljskih kaspaz 3 in 7 je opazno pri

rakavih celicah, U87 in HepG2, medtem ko je tretja rakava celična linija MiaPaCa-2 primerljiva z nerakavima celičnima linijama (NHA in HUVEC). Precejšnje povišanje aktivnosti kaspaz pa opazimo pri rakavih celičnih linijah U87, MiaPaCa-2 in HepG2 tretiranih s 50  $\mu\text{M}$  XN. Kaspaze 3 in 7 imajo glavno vlogo pri sprožitvi apoptoze, zato lahko sklepamo, da je pri rakavih celičnih linijah apoptoza sprožena pogosteje in pri nižjih koncentracijah XN, kot pri nerakavih celičnih linijah.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Citotoksičnost ksantohumola

Cilj številnih raziskav je odkritje popolnega antioksidanta, antimutagena oziroma protirakave učinkovine, ki pri nizkih koncentracijah ne bi povzročala poškodb DNA normalnih celic in bi bila selektivno citotoksična za rakavo spremenjene celice. Namen naše raziskave je bil torej preučiti delovanje ksantohumola, preniliranega flavonoida iz hmelja, na različnih vrstah humanih celičnih linijah in določiti mejne vrednosti citotoksičnosti za nerakave in rakavo spremenjene celice. Med celicami smo izbrali tudi dve celični liniji enakega izvora. Taka primerjava je zagotovo najprimernejša, ker se celice iz različnih tkiv razlikujejo in prihaja do prekrivanja rezultatov, zato je primerjava težja. Veliko znanih flavonoidov kaže kemopreventivne lastnosti pri nizkih in citotoksične vplive pri višjih koncentracijah. Močno lipofilni flavonoidi s prenilno skupino, kot je XN, prehajajo bolje skozi celične membrane kot ostali flavonoidi, zato so bolj citotoksični in genotoksični (Plochmann in sod., 2007). Naša prva naloga je bila določiti koncentracijsko območje, v katerem je XN selektivno citotoksičen za rakave celice. Z rezultati citotoksičnih testov smo pokazali, da je hitrost upadanja živih celic, pri celicah različnega izvora, precej različna. Naši rezultati kažejo, da so nižje koncentracije XN prej citotoksične za rakave kot za nerakave celice. Podobne rezultate so objavili tudi Miranda in sodelavci (1999). Raziskovali so antiproliferacijske in citotoksične vplive preniliranih flavonoidov na humanih rakavih celičnih linijah MCF-7 (rak dojke), HT-29 (rak debelega črevesa) in A-2780 (rak jajčnikov). Ugotovili so, da koncentracije višje od 10  $\mu\text{M}$  XN inhibirajo rast celic raka dojke po 2 dneh. Tudi Pan in sod. (2005) so določili, da je koncentracija 10  $\mu\text{M}$  XN povzročila velik upad celične rasti humane celične linije HCT116 (rak debelega črevesa). V naši raziskavi smo tretirali celice s XN le 24 h, kar je lahko razlog, da koncentracija 10  $\mu\text{M}$  XN še ni povzročila drastičnega upada viabilnosti rakavih celic, višje koncentracije pa so že bile precej citotoksične. Možno je tudi, da je imela serija XN, ki smo jo uporabljali, zaradi neznanih vzrokov, spremenjeno aktivnost kot v primerljivih raziskavah. Zanimivo je, da smo pri nekaterih nerakavih celicah (NHA in NC-NC) opazili celo pozitiven vpliv XN na proliferacijo celic (slika 13), saj se je število živih celic v primerjavi s kontrolo povišalo pri koncentraciji 10 in 20  $\mu\text{M}$  XN. Povišano proliferacijo bi

lahko delno razložili kot vpliv XN na izločanje metabolita, ki pozitivno vpliva na razmnoževanje celic. Tega pojava nismo določili pri nobeni od testiranih rakavih celičnih linijah. Če bi tudi z drugimi metodami in z nadaljnimi poskusi dokazali, da ima XN zares to lastnost, da stimulira rast nerakavih celic pri nižjih koncentracijah in hkrati uničuje rakave celice, bi XN lahko postal odlično protirakavo zdravilo z možnostjo regeneracije zdravih celic. Možnost laboratorijske napake je zaradi ponovljivosti rezultatov v zaporednih poskusih manj verjetna. Preživelost rakavih celic je začela upadati pri koncentracijah višjih od 10  $\mu\text{M}$  XN in se je zmanjševala sorazmerno s koncentracijo XN (slika 14). Viabilnost nerakavih celic pa je začela padati nekje pri 40  $\mu\text{M}$  XN (slika 13). Koncentracije od 10 do 40  $\mu\text{M}$  XN statistično značilno ne zmanjšujejo viabilnosti nerakavih celic, najbolj občutljiva je celična linija HUVEC. Za vse celične linije pa je koncentracija 100  $\mu\text{M}$  XN že povsem citotoksična, kar so ugotovili tudi Miranda in sod. (1999). Zaustavitev rasti je lahko posledica vpliva XN na sintezo DNA, kar so ugotovili z vnosom označenega timidina v celice MCF-7. XN je preprečil vključevanje [ $^3\text{H}$ ]timidina v DNA pri nižjih koncentracijah kot IXN (Miranda in sod., 1999). XN so označili tudi kot inhibitor diacilglicerol-aciltransferaze, kar pomeni, da XN zmanjša sintezo triacilglicerolov in inhibira nastajanje lipidnih kapljic pod hipoksičnimi pogoji in tako poškoduje rakave celice, ki rastejo pod takimi pogoji (Tabata in sod., 1997). XN je bolj učinkovit inhibitor rasti in mobilnosti visoko invazivnih rakavih celic fibrosarkoma HT-1080 pod hipoksičnimi, pod normalnimi pogoji pa XN ni inhibiral rasti, kar je tudi eden izmed mehanizmov selektivne citotoksičnosti XN (Goto in sod., 2004).

Najboljša primerjava vpliva XN na različne celice je izračun letalne doze 50 ( $\text{LD}_{50}$ ). Ugotovili smo, da so vse letalne doze 50 za nerakave celične linije nad koncentracijo 50  $\mu\text{M}$  XN, kar pomeni, da je pri tej koncentraciji XN preživela polovica celic (slika 15). Letalna doza 50 je najnižja za rakavo celično linijo U87, ki se giblje med 30 in 40  $\mu\text{M}$  XN, ostale tri rakave celične linije (NCI H1299, MiaPaCa-2 in HepG2) so nekoliko manj občutljive, saj se letalna doza 50 giblje med 30 in 60  $\mu\text{M}$  XN. Letalne doze 50 smo predstavili tudi z intervali zaupanja, ki so določeni s spodnjo in zgornjo mejo (slika 16). V intervalih se z dano gotovostjo (v naši raziskavi smo določili 95-odstotno) nahaja naš ocenjevalni parameter. Predstavitev ponazori, kako se intervali  $\text{LD}_{50}$  različnih celičnih linij med seboj prekrivajo. Dolžine intervalov prikazujejo tudi, kako ponovljivi so bili

posamezni poskusi med seboj in kolikšna so bila odstopanja. Daljši kot je interval, višja je bila izračunana standardna napaka. Krajši intervali pa označujejo dobro ponovljive poskuse z majhno standardno napako. Potrdili smo našo hipotezo, da je XN bolj citotoksičen za rakave celične linije, vendar hkrati ugotovili, da je občutljivost za XN močno odvisna od posamezne vrste celic. Tudi Miranda in sod. (1999) so ugotovili, da se različne rakave celične linije različno odzivajo na prisotnost XN. Celice raka na jajčnikih so bile bolj občutljive za XN od celic raka debelega črevesa in raka dojke po 48 urah. Celice raka na jajčnikih pa so nepričakovano postale manj občutljive za XN po štirih dneh tretiranja. Možno je, da je prišlo do detoksifikacije ali neencimske razgradnje XN. To kaže na različno občutljivost različnih rakavih celičnih linij. Po dovolj dolgem tretiranju je lahko prišlo do povečanega izražanja P-glikoproteinov, ki bi lahko izločali XN iz celic in bi tako celice postale odporne proti flavonoidu (Miranda in sod., 1999). Dokazali pa so tudi, da lahko določeni prenilirani flavonoidi inaktivirajo P-glikoprotein z vezavo na bližnje ATP in steroidno vezavno mesto P-glikoproteina (Conseil in sod., 1998). Če lahko hmeljevi flavonoidi tudi inhibirajo P-glikoprotein, lahko obdržijo antiproliferacijske značilnosti tudi po večih dneh (Miranda in sod., 1999). Raziskave interakcij med flavonoidi in P-glikoproteinom bodo potrebne za nadaljnje razumevanje odpornosti rakavih celic proti flavonoidom oziroma antiproliferacijskih lastnosti flavonoidov.

### **5.1.2 Vpliv ksantohumola na apoptozo**

XN s svojim delovanjem posega v določene fiziološke procese celic. Eden izmed možnih mehanizmov citotoksičnosti XN je njegov vpliv na apoptozo, kar smo preverjali tudi pri našem diplomskem delu. Stopnjo apoptoze smo določali s tremi različnimi metodami.

Vpliv XN na apoptozo smo najprej določili z diferencialnim barvanjem morfoloških sprememb celic z mešanico barvil AO/EtBr. Celična membrana je različno prepustna za barvila, kar je odvisno tudi v kateri fazi celičnega cikla se nahaja celica. Na podlagi različne obarvanosti citoplazme in jedra ter morfoloških posebnosti lahko ločimo neapoptotske celice od nekrotičnih celic ter od zgodnje in pozno apoptotskih celic (slika 17). Zgodnja apoptoza je povraten proces, saj se lahko celice ob ugodnih pogojih in odsotnosti apoptotskega dejavnika vrnejo v prvotno, nativno stanje, medtem ko pozno apoptotske celice apoptozi ne morejo več ubežati. Rezultati diferencialnega barvanja (slika

18) so tudi potrdili našo hipotezo o večji občutljivosti rakavih celic za XN, saj smo pri rakavi celični liniji po tretiranju s XN opazili več apoptotskih celic (zgodnjih in pozno apoptotskih). Delež apoptotskih celic je naraščal sorazmerno s koncentracijo XN (10 in 50  $\mu\text{M}$ ). Kontrola je predstavljala netretirane celice, ki smo jim po 24 h zamenjali izrabljeno gojišče s svežim. Pri vseh treh izbranih linijah, dvema nerakavima (NHA in HUVEC) in eni rakavi (U87), je delež apoptotskih celic pri kontroli zelo podoben, kar pomeni, da določen delež celic spontano prehaja v apoptozo. Celična kultura, podobno kot tkivo in celoten organizem iz katerega izhaja, vzdržuje homeostazo. Odstranitev odvečnih celic, takih ki so poškodovane ali potencialno nevarne, poteka na več načinov (omenjenih v uvodu), med njimi pa je najbolje poznana apoptoza. Pri celicah, ki smo jih tretirali s XN v koncentraciji 10  $\mu\text{M}$ , smo zaznali rahlo do zmerno povišanje deleža apoptotskih celic. Nerakava celična linija NHA kaže najnižjo občutljivost za XN, tako pri koncentraciji 10 kot pri 50  $\mu\text{M}$  XN. Pri koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  XN je delež apoptotskih celic pri NHA le rahlo povišan, nekoliko višji delež smo določili pri celični liniji HUVEC. Najvišji, več kot štirikrat višji od kontrole, je bil delež apoptotskih celic pri rakavi celični liniji U87. Druga izbrana koncentracija XN, 50  $\mu\text{M}$ , je bolj citotoksična in ima s tem tudi večji vpliv na prehod celic v apoptozo. Delež apoptotskih celic se pri tej koncentraciji XN pri nerakavih celičnih linijah (NHA in HUVEC) poviša za okoli 10 % v primerjavi z deležem pri koncentraciji 10  $\mu\text{M}$ . Pri U87 se delež apoptotskih celic pod vplivom 50  $\mu\text{M}$  XN poveča skoraj za dvakrat v primerjavi z deležem pri 10  $\mu\text{M}$  XN in doseže 50 %.

Začetek vstopa v proces apoptoze po notranji poti aktivacije kaspaz je pogojen z izražanjem različnih apoptotskih genov oziroma odvisen od razmerja izražanja pro- in antiapoptotskih genov. Mehanizmi, ki bi opisali kako XN vpliva na izražanje genov v literaturi niso znani. Proapoptotski proteini vplivajo na izražanje genov za izvršiteljske kaspaze, ki vodijo proces apoptoze. Določali smo izražanje genov za proapoptotski protein Bax in antiapoptotski protein Bcl-2 s kvantitativno PCR in določili razmerje med njunima stopnjema izražanja, saj smo hoteli raziskati, če XN vpliva na aktivacijo kaspaz preko notranje poti. Ker smo z rezultati citotoksičnosti ugotovili različno občutljivost U87 in NHA na XN, smo za preverjanje učinka XN na izražanje apoptotskih genov s Q-PCR uporabili različni srednji koncentraciji XN. Pri U87 smo izbrali 40 in pri NHA 50  $\mu\text{M}$  XN. Predpostavljali smo, da XN povzroča apoptozo v večji meri pri rakavih celicah v



primerjavi z nerakavimi. Z rezultati smo potrdili našo hipotezo, saj je bilo razmerje v stopnji izražanja genov *bax/bcl-2* pri vseh izbranih koncentracijah XN pri rakavi celični liniji U87 v prid proapoptotskemu genu *bax* (slika 19). Če je prišlo tudi do translacije mRNA za Bax, je prišlo do sprožitve apoptoze po notranji poti preko mitohondrija. Pri nerakavi celični NHA pa se je razmerje Bax/Bcl-2 zniževalo. Predvidevamo, da visoka koncentracija XN pri NHA sproži določen drug mehanizem celične smrti ali drugo pot apoptoze, kot pri rakavi celični liniji, kar bi bilo potrebno še raziskati. Upoštevati moramo tudi dejstvo, da mRNA genov *bax* in *bcl-2* ni merilo, pač pa sta to proteina Bax in Bcl-2. Možno je, da zaradi različnih vzrokov ne pride do translacije mRNA ali pa proteini oligomerizirajo in zato ne pride do apoptoze, kljub temu, da smo določili povečano prvo stopnjo izražanja gena *bax* – njegovo mRNA.

V zadnjem koraku smo hkrati z določanjem celične viabilnosti merili tudi aktivnost izvršiteljskih kaspaz 3 in 7 (slika 20). Pričakovali smo, da bomo izmerili povišano sintezo kaspaz 3 in 7, posebno pri U87 in ostalih rakavih celičnih linijah, pri koncentracijah XN, ki so v prejšnjem poskusu izzvale povišano izražanje proapoptotskih genov. Pri nizki koncentraciji XN (10  $\mu$ M) smo določili le rahlo povečano aktivnost kaspaz 3 in 7 pri U87 in HepG2, pri normalnih celičnih linijah pa je bila aktivnost primerljiva s kontrolo. Pri koncentraciji 50  $\mu$ M XN smo ugotovili, da se povišano razmerje v stopnji izražanja genov *bax/bcl-2* ujema s povišano indukcijo kaspaz 3 in 7 pri U87. Nivo aktivnosti kaspaz 3 in 7 se je pri tej koncentraciji XN povišal tudi pri ostalih dveh rakavih celičnih linijah MiaPaCa-2 in HepG2, medtem ko se aktivnost kaspaz 3 in 7 v celični liniji NHA in HUVEC tudi pri koncentraciji 50  $\mu$ M XN ni dosti spremenila. Malce višjo aktivnost smo določili pri celični liniji HUVEC, a je le-ta še vedno zanemarljiva, glede na povišanje pri rakavih celicah. Vzroke za citotoksično delovanje XN so raziskovali tudi Pan in sod. (2005). Zanimalo jih je, če XN sodeluje pri aktivaciji kaspaz po poti receptorja smrti in/ali po notranji poti preko mitohondrija. Analizirali so aktivacijo iniciatorske kaspaze 8 (aktivira se po poti preko receptorja smrti) ter izražanje pro- in antiapoptotskih članov družine genov Bcl-2 (notranja pot) z metodo »Western blotting«. Ugotovili so, da XN v koncentracijah 5-15  $\mu$ M v času 48-72 h aktivira apoptozo po obeh poteh aktivacije kaspaz. Vpliv XN na sprožitev apoptoze po notranji poti so potrdili z določitvijo povišane koncentracije aktivirane kaspaze 9, ki nato aktivira prokaspazi 3 in 7 ter zmanjšane

koncentracije antiapoptotskega proteina Bcl-2. Povečan delež kaspaze 8 pa je potrdil aktivacijo apoptoze po poti preko receptorja smrti. Mi smo uporabili višje koncentracije XN in krajši čas inkubacije ter potrdili aktivacijo kaspaz le preko notranje poti pri rakavih celičnih linijah.

Naši rezultati kažejo, da je XN selektivno citotoksičen nekje med izbranimi koncentracijama 10 in 50  $\mu\text{M}$ . Ta pri nerakavih celičnih linijah še ne povzroča apoptoze v veliki meri, medtem ko je že precej citotoksična za rakave celice in zviša delež celic, ki gredo v apoptozo. Previsoka koncentracija bi lahko v preveliki meri poškodovala normalne zdrave celice, nižja pa ne bi bila dovolj učinkovita za uničenje rakavih celic.

Tudi naši rezultati podajajo dodaten dokaz, da je XN lahko učinkovita protirakava substanca, vendar je še vedno premalo znanega o delovanju XN v organizmu, še posebno v tako visokih koncentracijah kot smo jih mi uporabili pri diplomskem delu. Znano je, da je absorpcija XN slaba, metabolizem XN hiter in prehajanje XN v celice še slabo raziskano (Yilmazer in sod., 2001a; Pang in Nikolic, 2007; Avula in sod., 2004). Mnogi znanstveniki raziskujejo mehanizme delovanja XN in predvideva se, da bi lahko XN deloval zunaj celic, torej da sploh ne vstopa vanje, možno je, da blokira prenos genotoksičnih substanc v celice in jih tako zaščiti pred razvojem raka ali pa se veže na te škodljive molekule v organizmu in jih inaktivira, žal pa tega do sedaj ni še nihče potrdil. XN bi lahko vplival tudi na popraviljanje DNA, kot so to že potrdili za flavonoid iz citrusov naringenin, ki vpliva na izražanje treh genov za encime vpletene v popraviljanje DNA z izrezovanjem baz (Gao in sod., 2006).

Veliko testiranj in raziskav bo še potrebnih tako *in vitro* kot tudi *in vivo*, ki bodo razjasnili delovanje XN in tako potrdili ali zavrnili pozitivne učinke XN, kot protirakavega sredstva.

## 5.2 SKLEPI

- XN je v območju koncentracij med 10 in 100  $\mu\text{M}$  selektivno bolj toksičen za rakave kot za nerakave celične linije. Mejna citotoksična koncentracija XN za rakave U87 je 30  $\mu\text{M}$  in 50  $\mu\text{M}$  za nerakave celice NHA. Ker obe celični liniji izvirata iz možganskega tkiva, je primerjava najboljša.
- Pokazali smo, da je apoptoza, ki se sproži z aktivacijo kaspaz preko notranje poti, eden od možnih mehanizmov citotoksičnega delovanja XN.
- XN v koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  ne izzove sprememb v izražanju proapoptotskega gena *bax* in antiapoptotskega gena *bcl-2* pri celicah NHA in niti ne pri celicah U87. Pod vplivom višjih koncentracij XN (40 in 70  $\mu\text{M}$ ) je izražanje apoptotskih genov v prid proapoptotskim, torej se razmerje v stopnji izražanja genov *bax/bcl-2* poveča pri rakavih celicah U87, pri nerakavi celični liniji NHA pa se to razmerje precej zmanjša tako pri 50 kot pri 70  $\mu\text{M}$  XN. Torej je prisoten ali drug mehanizem celične smrti ali poteka apoptoza po drugi poti.
- Izražanje proapoptotskih genov korelira z aktivnostjo izvršiteljskih kaspaz 3 in 7, ki vodijo apoptozo, posebno pri rakavih celicah.
- Aktivnost kaspaz 3 in 7 pri U87 se rahlo poveča že pri koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  XN, pri 50  $\mu\text{M}$  pa skokovito naraste (podoben skok smo zaznali tudi pri ostalih treh rakavih celičnih linijah, pri nerakavih pa ne).
- Kljub temu, da mehanizmi delovanja XN še niso razjasnjeni, tudi naši rezultati kažejo, da XN v večji meri škodi rakavim celicam. Upamo lahko, da bodo nadaljnje raziskave potrdile uvrstitev XN med nove protirakave učinkovine.

### 5.3 SMERNICE ZA PRIHODNOST

Potrebno bi bilo preveriti delovanje XN na večjem številu celičnih linij enakega izvora. Še boljše izbira od celičnih linij je izbor svežih tkivnih rezin, pri katerih je metabolna aktivnost bolje ohranjena, prisotnih je več celičnih skupin, ki vplivajo na viabilnost in pravilno delovanje večinske populacije celic. V jetrnih rezinah so poleg hepatocitov prisotne tudi sinusoidne endotelijske in Kupfferjeve celice, ki pozitivno vplivajo na rast hepatocitov (Olinga in sod., 1997). Celične linije pa lahko izgubijo pomembne encime, prisotne v metabolizmu določenih učinkovin, na primer kakšen encim iz družine citokrom P450. Prednost celičnih linij pa je lažje gojenje in boljše ponovljivost poskusov.

Rezultati izražanja genov *bax* in *bcl-2* ter merjenja aktivnosti izvršiteljskih kaspaz 3 in 7 so zaenkrat še preliminarni, zato bi bilo v prihodnje potrebnih še več ponovitev in primerjav različnih celičnih linij.

Smotrno bi bilo tudi preveriti vpliv XN na izražanje tumor supresorskega gena *p53* in gena *p21*, ki kodira od ciklina odvisen kinazni inhibitor, regulator napredovanja celičnega cikla v točki G1. Protein p53 kontrolira izražanje gena *p21*.

## 6 POVZETEK

Ksantohumol (XN) je naravna substanca, ki izvira iz hmelja. Kemijsko je XN polifenolna molekula, preniliran flavonoid. Izloča se skupaj z grenkimi kislinami (grenčinami) in eteričnimi olji v žleznihi trihomah, ki so na površini storžnih listov in na spodnji površini mladih zelenih listov ženskega dela rastline hmelja (*Humulus lupulus* L.). Hmelj se kot začimba dodaja med varjenjem piva, saj pivu oplemeniti okus, stabilizira peno in doda grenkobo.

XN je učinkovina, ki bi lahko predstavljala novo protirakavo substanco, saj mnoge študije kažejo na njegovo pomembno vlogo pri zaviranju nastanka, napredovanja in pri zdravljenju raka. Dokazali so, da lahko XN deluje kot antioksidant, protivnetni dejavnik, inhibira metabolno aktivacijo prokarcinogenov, vpliva na razgrajevanje kancerogenih snovi, zavira genotoksične učinke kancerogenov na sesalske celice in posledično lahko tako inhibira razvoj raka.

Vzdrževanje populacije celic je pomembno za razvoj in homeostazo evkariontskega organizma. Odstranjevanje celic, ki so ali poškodovane ali potencialno nevarne za organizem, poteka na več načinov. V primeru, da so ti mehanizmi inaktivirani in celice niso podvržene procesu celične smrti, lahko pride do razvoja raka in drugih hiperproliferativnih bolezni. Nenadzorovana delitev celic je posledica poškodbe DNA oziroma mutacije nekaterih vitalnih genov, ki med drugim nadzorujejo delitev celic. Napredek v razumevanju procesa karcinogeneze na celičnem in molekularnem nivoju bo omogočal bolj ciljane kemopreventivne ukrepe.

V diplomski nalogi smo z dvema testoma (MTT in MTS) določali mejne citotoksične vrednosti XN za različne celice – nerakave (NHA, HUVEC, NC-NC in MCF 10A) ter za rakave celične linije (U87, MiaPaCa-2, HepG2, NCI H1299). Rezultati teh testov so bili ključni za izbiro ustreznih koncentracij XN, s katerimi smo ponovno tretirali celice in z različnimi testi preverjali mehanizme citotoksičnosti XN. Kot eden izmed možnih mehanizmov delovanja je vpliv XN na apoptozo. Z diferencialnim barvanjem morfoloških sprememb celic z mešanico barvil AO/EtBr smo pod fluorescenčnim mikroskopom

določili delež apoptotskih celic (zgodnje in pozno apoptotske). Nato smo preučili stopnjo izražanja genov za proapoptotski protein Bax in antiapoptotski protein Bcl-2 s Q-PCR. S testom »ApoONE« pa smo merili aktivnost izvršiteljskih kaspaz 3 in 7, ki sta ključni v procesu apoptoze in se aktivirata kot posledica delovanja proteina Bax.

Ugotovili smo, da pri koncentraciji 60  $\mu\text{M}$  XN preživi približno polovica nerakavih celičnih linij, za razliko od rakavih, na katere ima XN zelo toksičen vpliv že pri koncentraciji 40  $\mu\text{M}$  XN. Viabilnost celic se je pri nerakavih celičnih linijah začela zmanjševati pri koncentraciji 40  $\mu\text{M}$  XN, za razliko od rakavih, kjer smo zmanjšanje števila živih celic zaznali že pri koncentraciji 20  $\mu\text{M}$  XN. Rezultati vseh treh različnih testov vpliva XN na fiziološke procese se zelo dobro ujemajo med seboj. Sklepamo, da je apoptoza vsaj eden izmed možnih mehanizmov citotoksičnosti XN, saj pri koncentracijah, ki še niso zelo toksične za nerakave celice, XN poviša nivo apoptoze pri rakavih celicah in ne pri nerakavih. V nerakavih celicah se tudi pri visokih, že toksičnih koncentracijah, ni sprožil proces apoptoze, zato sklepamo, da je prisoten drug mehanizem celične smrti. Pri rakavi celični liniji U87 je bilo izražanje gena *bax* bistveno večje pri vseh treh izbranih koncentracijah XN (10, 40 in 50  $\mu\text{M}$ ) v primerjavi z nerakavo celično linijo NHA, kjer se je razmerje v stopnji izražanja genov *bax/bcl-2* celo znižalo v primerjavi s kontrolo, kar pomeni, da se je v celicah sprožil drug mehanizem celične smrti ali pa je apoptoza potekala po drugi poti. Pri koncentracijah XN, kjer smo zaznali povišano razmerje izražanja genov *bax/bcl-2* (večje izražanje proapoptotskega gena *bax*) pri celicah U87, smo nato izmerili tudi povišano aktivnost kaspaz 3 in 7, kar potrjuje, da se je v celicah sprožil proces apoptoze.

Mnogi mehanizmi delovanja XN so še nepoznani, zato bo potrebnih še mnogo raziskav, preden bomo lahko XN označili kot učinkovino, ki bo ciljano delovala na rakave celice in selektivno povzročala apoptozo.

## 7 VIRI

Abraham M.C., Shaham S. 2004. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biology*, 14, 4: 184- 191

Adams J.M., Cory S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26: 61-66

Avula B., Ganzera M., Warnick J.E., Feltenstein M.W., Sufka K.J., Khan I.A. 2004. High-performance liquid chromatographic determination of xanthohumol in rat plasma, urine and fecal samples. *Journal of Chromatographic Science*, 42: 378-382

Boatright K.M, Salvesen G.S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15: 725-731

Borner C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, 39: 615-647

Botta B., Vitali A., Menendez P., Misiti D., delle Monache G. 2005. Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 717-739

Bröker L., Kruyt F. A. E., Giaccone G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research*, 11: 3155-3162

Buckwold V.E., Wilson R.J., Nalca A., Beer B.B., Voss T.G., Turpin J.A., Buckheit R.W., Wei J., Wenzel-Mathers M., Walton E.M, Smith R.J., Pallansch M., Ward P., Wells J., Chuvala L., Sloane S., Paulman R., Russell J., Hartman T., Ptak R. 2004. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA

and RNA viruses. *Antiviral Research*, 61: 57-62

Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., and Wang X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15: 269-290

Bursch W. 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 8: 569-581

Chao D.T., Korsmeyer S.J. 1998. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology*, 16: 395- 419

Chaudhary A. and Willett K.L. 2006. Inhibition of human cytochrome CYP1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology*, 217, 2-3: 194-205

Colgate E. C., Miranda C.L., Stevens J.F., Bray T.M., Ho E. 2007. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Letters*, 246: 201–209

Conseil G., Baubichon- Cortay H., Dayan G., Jault J. M., Barron D., DiPietro A. 1998. Flavonoids: a new class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP and steroid- binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 9831–9836

Debatin K. M., Krammer P.H. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, 23: 2950-2966

Di Pietro A., Conseil G., Perez-Victoria J. M., Dayan G., Baubichon-Cortay H., Trompier D., Steinfels E., Jault J. M., deWet H., Maitrejean M., Comte G.,



Boumendjel A., Mariotte A. M., Dumontet C., McIntosh D. B., Goffeau A., Castanys S., Gamarro F., Barron D. 2002. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 307–322.

Eckelman B.P., Salvesen G.S., Scott F.L. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Reports*, 7: 988-994

Fuentes-Prior P., Salvesen G.S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, 384: 201-232

Fulda S., Debatin K.-M. 2004. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1705: 27– 41

Gao K., Henning S.M., Niu Y., Youssefian A.A., Seeram N.P., Xu T., Heber D. 2006. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 89–95

Geraets L., Moonen H.J.J., Brauers K., Gottschalk R.W.H., Wouters E.F.M., Bast A., Hageman G.J. 2007. Flavone as PARP-1 inhibitor: Its effect on lipopolysaccharide induced gene-expression. *European Journal of Pharmacology*, 573: 241–248

Gerhäuser C. 2005a. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41: 1941-1954

Gerhäuser C. 2005b. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 827-831

Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H.R., Frank N., Bartsch H., Becker H. 2002. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 11: 959-969

Goto K., Asai T., Hara S., Namatame I., Tomoda H., Ikemoto M., Oku N. 2004. Enhanced antitumor activity of xanthohumol, a diacylglycerol acyltransferase inhibitor, under hypoxia. *Cancer Letters*, 219, 2: 215-222

Hanahan D., Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57–70

Henderson L., Wolfrey A., Fedyk L., Bourner C., Windebank S. 1998. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13: 89-94.

Henderson M.C., Miranda C.L., Stevens J.F., Deinzer M.L., Buhler D.R. 2000. *In vitro* inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica*, 30, 3: 235-51

Herath W., Ferreira D., Khan S.I., Khan I.A. 2003. Identification and biological activity of microbial metabolites of xanthohumol. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 5, 11: 1237-1240

Hodek P., Trefil P., Stiborova M. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochrome P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139: 1-21.

Hollman P.C., Katan M.B. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 937-942

Hreljac I. 2004. Možna vloga katepsinov B in L v apoptozi glioblastomskih celic. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 25, 30

Huppertz B., Frank H. G., Kaufmann P. 1999. The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embryology*, 200: 1-18

Ishige K., Shubert D., Sagara Y. 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 433-446

Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347- 354

Kataoka T. 2005. The caspase-8 modulator c-FLIP. *Critical Reviews in Immunology*, 25: 31-58

Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239-257

Khosravi-Far R., Esposti M.D. 2004. Death receptors signals to mitochondria. *Cancer Biology and Therapy*, 3: 1051-1057

Kovačič J. 2005. Vpliv ksantohumola na transformirane in rakave celice. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 56 str.

Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87: 99-163

Kuo S.M, Leavitt P.S., Lin C.P. 1998. Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallonhionein level in human intestinal cells. *Biological Trace Element Research*, 62:135–153.

Lai P.B.S., Chi T.-Y., Chen G.G. 2007. Different levels of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Apoptosis*, 12: 387- 393

Luo Y., Egger A.L., Liu D., Liu G., Mesecar A.D., Van Breemen R.B. 2007. Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18, 12: 2226-2232

Lust S., Vanhoecke B., Janssens A., Philippe J., Bracke M., Offner F. 2005. Xanthohumol kills B-chronic lymphocytic leukemia cells by an apoptotic mechanism. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 844 – 850

Mathiasen I.S., Jäättelä M. 2002. Triggering caspase- independent cell death to combat cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 212-220

Miranda C.L., Aponso G.L.M, Stevens J.F, Deinzer M.L., Buhler D.R.. 2000a. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Letters*, 149: 21-29

Miranda C.L., Stevens J.F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M.L., Buhler D.R. 2000b. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 3876-3884

Miranda C. L., Yang Y.H., Henderson M.C., Stevens J.F., Santana –Rios G., Deinzer M.L., Buhler D.R. 2000c. Prenylflavonoids from hops inhibit the

metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metabolism and Disposition*, 28: 1297-1302

Miranda C.L., Stevens J.F., Helmrich A., Henderson M.C., Rodriguez R.J., Yang Y.H., Deinzer M.L., Barnes D.W., Buhler D.R. 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 5: 271- 285

Miyashita T., Reed J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell*, 80: 293-299

Moon Y.J., Wang X., Morris M.E. 2006. Dietary flavonoids: effect on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro*, 20: 187-210.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.

Okada H., Mak T.W. 2004. Pathways of apoptotic and non apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 4, 8: 592-603

Olinga P., Merema M., Hof I.H., de Jong K.P., Slooff M.J., Meijer D.K., Groothuis G.M. 1998. Effect of human liver source on the functionality of isolated hepatocytes and liver slices. *Drug Metabolism and Disposition*, 26: 5-11

Pan L., Becker H., Gerhäuser C. 2005. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 837-843

Pang Y., Nikolic D., Zhu D., Chadwick L.R., Pauli G.F., Farnsworth N.R., Van Breemen R.B. 2007. Binding of the hop (*Humulus lupulus* L.) chalcone xanthohumol to cytosolic proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 872 – 879

Parri R., Crunelli V. 2003. An astrocyte bridge from synapse to blood flow. *Nature Neuroscience*, 6, 1: 5-6

Pezutto J. M. 1997. Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology*, 53: 121-133

Plazar J., Filipič M., Groothuis G.M.M. 2008. Antigenotoxic effect of xanthohumol in rat liver slices. *Toxicology In Vitro*, 22, 2: 318-327

Plazar J., Žegura B., Lah Turenšek T., Filipič M. 2007. Protective effect of xanthohumol against genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazol[4,5-f]quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutation Research*, 632: 1-8

Piet R., Vargova L., Sykova E., Poulain D., Oliet S. 2004. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 7: 2151- 2155

Pitot H.C. 1989. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Japanese Journal of Cancer Research*, 80: 599–607

Plochmann K., Korte G., Koutsilieri E., Richling E., Riederer P., Rethwilm A., Schreirer P., Scheller C. 2007. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460: 1-9

Ponten J., Macintyre E.H. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 74: 465- 486

Power F.B., Tutin F., Rogerson H. 1913. The constituents of hops. *Journal of the Chemical Society*, 103: 1267-1292

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Review*, 23: 519-534

Rice-Evans C. 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 797-807

Salvesen G.S., Duckett C.S. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3: 401- 410

Shall S., De Murcia G. 2000. Poly ADP-ribose polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutation Research*, 460: 1–15

Stanley L.A. 1995. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. *Toxicology*, 96: 173–194

Stavri M., Schneider R., O'Donnell G., Lechner D., Bucar F., Gibbons S. 2004. The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. *Phytotherapy Research*, 18: 774-776

Stevens J.F., Miranda C.L., Frei B., Buhler D.R. 2003. Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: the alpha,beta-unsaturated keto functionality of 20-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. *Chemical Research in Toxicology*, 16: 1277–1286

Stevens J.F., Page J.E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65, 10: 1317-1330

Tabata N., Ito M., Tomoda H., Omura S. 1997. Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 46, 4: 683-687

Turk B., Stoka V. 2007. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Letters*, 581: 2761-2767

Turk B., Turk D., Salvesen G.S. 2005. Regulation cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Medicinal Chemistry Reviews*, 2: 283-297

<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/mcro>

Wunderlich S., Zurcher A., Back W. 2005. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 874-881

Yamashima T. 2004. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved "calpain-cathepsin cascade" from nematodes to primates. *Cell Calcium*, 36: 285-293

Yilmazer M., Stevens J.F., Buhler D.R. 2001a. *In vitro* glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Letters*, 49, 31: 252-256

Yilmazer M., Stevens J.F., Deinzer M.L., Buhler D.R. 2001b. *In vitro* biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 29: 223-231



Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J., Rice-Evans C.A., Abbott N.J. 2004. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 5: 592 – 604

Zhao F., Nozawa H., Daikonnya A., Kondo K., Kitanaka S. 2003. Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus Lupulus* L.). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26 : 61–65

Zhu Y., Parada L.F. 2002. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nature Reviews Cancer*, 2: 616-626

Zhu D.M., Uckun F.M. 2000. Cathepsin inhibition induces apoptotic death in human leukemia and lymphoma cells. *Leuk. Lymphoma*, 39: 343–354

Zimmermann K.C., Bonzon C., Gren D.R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology and Therapeutics*, 92: 57-70

## ZAHVALA

*Veliko ljudi je s svojimi nasveti, pomočjo, konstruktivnimi pripombami in dobrodošlimi popravki prispevalo k nastanku moje diplomske naloge.*

*Posebna zahvala gre obema mentoricama. Najprej bi se rada zahvalila prof. dr. Tamari Lah Turnšek za možnost opravljanja diplomskega dela na Nacionalnem inštitutu za biologijo, za strokovno vodenje, svetovanje in pregled diplomske naloge. Posebno se zahvaljujem tudi doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja za koristne nasvete v času opravljanja diplomskega dela, za zelo skrben pregled diplomske naloge ter za veliko pomoč pri pravilnem zapisu strokovnih izrazov.*

*Recenzentki prof. dr. Darji Žgur Bertok se zahvaljujem za končno recenzijo diplomske naloge.*

*Za uvod v moje raziskovalno delo, za vodenje in svetovanje v laboratoriju, za pomoč pri nastajanju plakata za konferenco in predvsem za trud pri prebiranju in popravljanju diplomske naloge, bi se rada zahvalila delovni mentorici dr. Ireni Zajc.*

*Hvala vsem iz Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka, s katerimi sem sodelovala, vsem, ki sem jih kdaj koli pocukala za rokav in prosila za nasvet, še posebej hvala Ireni Hreljac za pomoč pri uporabi fluorescentnega mikroskopa.*

*Vsem najbližjim hvala za podporo in razumevanje med nastajanjem diplomske naloge. Sašo, posebna zahvala (\*§) gre tudi tebi za ves čas in trud, ki si ga namenil za oblikovanje moje diplomske naloge, hvala za računalniško podporo, ko me računalnik ni ubogal.*