

# Antitumorsko djelovanje izoflavona kalikosina (calycosin) na stanice raka mokraćnog mjehura

---

**Radovniković, Paola**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:433870>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Paola Radovniković**

**ANTITUMORSKO DJELOVANJE IZOFLAVONA KALIKOSINA  
(CALYCOSIN) NA STANICE RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2024. / 2025.**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr. sc. Jelena Korać Prlić**

**Split, listopad 2024.**

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti

**Znanstveno polje:** Farmacija

**Nastavni predmet:** Molekularna biologija s genetikom

**Tema rada** je prihvaćena na 84. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 11. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 2. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Jelena Korać Prlić

## ANTITUMORSKO DJELOVANJE IZOFLAVONA KALIKOSINA (CALYCOSIN) NA STANICE RAKA MOKRAČNOG MJEHURA

Paola Radovniković, 201824

### Sažetak:

**Naslov rada:** Antitumorsko djelovanje izoflavona kalikosina (calycosin) na stanice raka mokraćnog mjehura

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja je istražiti antitumorska djelovanja izoflavona kalikosina u staničnim linijama tumora mokraćnog mjehura (T24, 5637 i MB49) ispitivanjem citotoksičnosti i utjecaja na apoptozu, staničnu proliferaciju i stanični metabolizam.

**Materijali i metode:** Istraživanje je provedeno *in vitro* na staničnim linijama tumora mokraćnog mjehura T24, 5637 i MB49. Stanice su tretirane različitim koncentracijama kalikosina. Provedena je analiza apoptoze i staničnog ciklusa metodom *western blot* i protočnom citometrijom, a analiza staničnog metabolizma provedena je metodom *western blot*.

**Rezultati:** Istraživanje je pokazalo da kalikosin ima citotoksičan učinak na stanice tumora mokraćnog mjehura T24, 5637 i MB49. Antitumorski učinak kalikosina varira ovisno o staničnoj liniji (T24, 5637 i MB49) te koncentraciji primijenjenog tretmana. Tretman kalikosinom doveo je do smanjenja stanične proliferacije i inducirao apoptozu, što je potvrđeno povećanom količinom pocijepanih proteina kaspaze-3 i PARP1 te smanjenjem količine proteina ciklina D1. Indukcija apoptoze i zaustavljanje staničnog ciklusa potvrđeni su metodom protočne citometrije. Kalikosin je smanjio izražaj proteina PKM2 što ukazuje na njegov potencijalni učinak na regulaciju staničnog metabolizma.

**Zaključci:** Kalikosin je pokazao antitumorsko djelovanje na stanične linije tumora mokraćnog mjehura T24, 5637 i MB49, inducirajući apoptozu, inhibirajući stanični ciklus i mijenjajući metabolički profil stanica. Rezultati upućuju na potencijalnu primjenu kalikosina kao terapijskog agensa u liječenju tumora mokraćnog mjehura, ali su potrebna dodatna istraživanja kako bi se precizno utvrdili mehanizmi djelovanja.

**Ključne riječi:** tumor mokraćnog mjehura, kalikosin, apoptoza, stanični ciklus, metabolizam

**Rad sadrži:** 63 stranice, 16 slika, 6 tablica, 56 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:** 1. doc. dr. sc. Marina Degoricija  
2. prof. dr. sc. Ivana Novak Nakir  
3. doc. dr. sc. Dario Leskur

**Datum obrane:** 28.10.2024

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 1.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences

**Scientific field:** Pharmacy

**Teaching subject:** Molecular biology and Medical genetics

**Thesis subject:** Was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 84. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 11. and Faculty Council of School of Medicine, session no. 2.

**Mentor:** Associate professor, Jelena Korać Prlić, PhD

### ANTITUMOR ACTIVITY OF ISOFLAVONE CALYCOSIN ON BLADDER CANCER CELLS

Paola Radovniković, 201824

#### Summary

**Title:** Antitumor activity of isoflavone calycosin on bladder cancer cells

**Objectives:** The aim of this study is to investigate the antitumor activity of the isoflavone calycosin in bladder cancer cell lines (T24, 5637, and MB49) by examining cytotoxicity and its effects on apoptosis, cell proliferation and cellular metabolism.

**Material and Methods:** The study was conducted in vitro on bladder cancer cell lines T24, 5637, and MB49. The cells were treated with different concentrations of calycosin. Apoptosis and cell cycle analysis were performed using *western blot* and flow cytometry, and cellular metabolism was analyzed by the *western blot* method.

**Results:** The study demonstrated that calycosin has a cytotoxic effect on bladder cancer cells T24, 5637, and MB49. The antitumor effect of calycosin varied depending on the cell line (T24, 5637, and MB49) and the concentration of the treatment. Treatment with calycosin led to a decrease in cell proliferation and induced apoptosis, as confirmed by increased amounts of activated caspase-3 and PARP1 proteins, and a decrease in cyclin D1 protein levels. Induction of apoptosis and cell cycle arrest were confirmed by flow cytometry. Calycosin reduced the expression of the PKM2 protein, indicating its potential effect on regulating cellular metabolism.

**Conclusions:** Calycosin showed antitumor activity on bladder cancer cell lines T24, 5637, and MB49, inducing apoptosis, inhibiting the cell cycle, and altering the metabolic profile of the cells. The results suggest the potential application of calycosin as a therapeutic agent in the treatment of bladder cancer, but further studies are needed to precisely determine the mechanisms of action.

**Keywords:** bladder cancer, calycosin, apoptosis, cell cycle, metabolism

**Thesis contains:** 63 pages, 16 pictures, 6 tables, 56 literary references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** 1. doc. dr. sc. Marina Degoricija  
2. prof. dr. sc. Ivana Novak Nakir  
3. doc. dr. sc. Dario Leskur

**Defence date:** 28.10.2024

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2

*Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Jeleni Korać Prlić  
na stručnom vodstvu, beskrajnom strpljenju i podršci,  
te što mi je svojim primjerom ukazala na vrijednosti istinskog i posvećenog znanstvenika,  
te osvijetlila put u svijet znanosti.*

*Posebnu zahvalu upućujem čitavom timu s Katedre na pruženoj potpori, suradnji i lijepim  
trenucima koji su učinili ovo iskustvo bogatijim.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na nepokolebljivoj ljubavi i podršci kroz svaki izazov  
tijekom studiranja.*

*Hvala dragim kolegama i profesorima što su studentske dane učinili lakšima i ljepšima.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Tumor mokraćnog mjehura .....	2
1.1.1. Epidemiologija .....	2
1.1.2. Etiologija .....	3
1.1.3. Klasifikacija .....	3
1.1.4. Dijagnoza i liječenje .....	5
1.2. Kalikosin.....	6
1.2.1. Antitumorski učinci.....	7
1.2.2. Farmakokinetika i sigurnost .....	8
1.3. Apoptoza.....	8
1.3.1. Unutarnji put apoptoze .....	9
1.3.2. Vanjski put apoptoze .....	12
1.3.3. Poli(ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP1) .....	14
1.3.4. Kaspaza-3 .....	15
1.4. Stanični ciklus .....	16
1.4.1. Regulacija staničnog ciklusa .....	16
1.5. Stanični metabolizam .....	18
1.5.1. Glikoliza .....	19
1.5.2. Piruvat kinaza izoenzim M2 (PKM2) .....	21
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	23
3. MATERIJALI I METODE .....	25
3.1. Kemikalije i priprava otopina .....	26
3.2. Nasađivanje i tretiranje stanica.....	30
3.3. Metoda <i>western blot</i> .....	30
3.4. Analiza apoptoze protočnom citometrijom .....	31
3.5. Analiza staničnog ciklusa protočnom citometrijom .....	32

3.6. Statistička analiza .....	32
4. REZULTATI.....	33
4.1. Citotoksični učinak kalikosina na stanice tumora mokraćnog mjehura .....	34
4.2. Kalikosin inducira apoptozu stanica tumora mokraćnog mjehura .....	36
4.2.1. <i>Western blot</i> .....	36
4.2.2. Protočna citometrija .....	38
4.3. Kalikosin zaustavlja proliferaciju stanica tumora mokraćnog mjehura .....	40
4.3.1. <i>Western blot</i> .....	40
4.3.2. Protočna citometrija .....	41
4.4. Kalikosin mijenja metaboličku aktivnost stanica tumora mokraćnog mjehura.....	43
5. RASPRAVA.....	45
6. ZAKLJUČCI.....	50
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	52
8. SAŽETAK.....	58
9. SUMMARY .....	60
10. ŽIVOTOPIS .....	62

## POPIS KRATICA

ADP - adenzin difosfat, engl. *adenosine diphosphate*

APS - amonijev persulfat, engl. *ammonium persulfate*

AMP – adenzin monofosfat, engl. *adenosine monophosphate*

BSA - albumin goveđeg seruma, engl. *Bovine Serum Albumin*

ddH<sub>2</sub>O - redestilirana voda, engl. *double distilled water*

DOC - natrijev deoksikolat, engl. *sodium deoxycholate*

DMEM - engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimetilsulfoksid, engl. *dimethyl sulfoxide*

DNA - deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*

FBS - fetalni goveđi serum, engl. *Fetal Bovine Serum*

FDA - Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država, engl. *Food and Drug Administration*

HCl – klorovodična kiselina

HRP - peroksidaza hrena, engl. *Horseradish Peroxidase*

K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - kalijev dihidrogenfosfat

KCl - kalijev klorid

NaCl - natrijev klorid

Na-azid - natrijev azid

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> - natrijev ortovanadat

NP-40 - nonidet P-40

N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - dinatrijev hidrogenfosfat

PBS - fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom, engl. *Phosphate-Buffered Saline*

PI - propidij jodid, engl. *Propidium Iodide*

PMSF - fenilmetilsulfonil fluorid, engl. *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

SDS - natrijev dodecil sulfat, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS PAGE - natrij dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TBS - tris(hidroksimetil)aminometan-puferska fiziološka otopina, engl. *Tris-Buffered Saline*

TEMED - N, N, N', N'-tetrametiletildiamin

TNM - klasifikacija tumora, engl. *Tumour, Node, Metastasis*

Tris HCl - tris(hidroksimetil)aminometan-hidroklorid

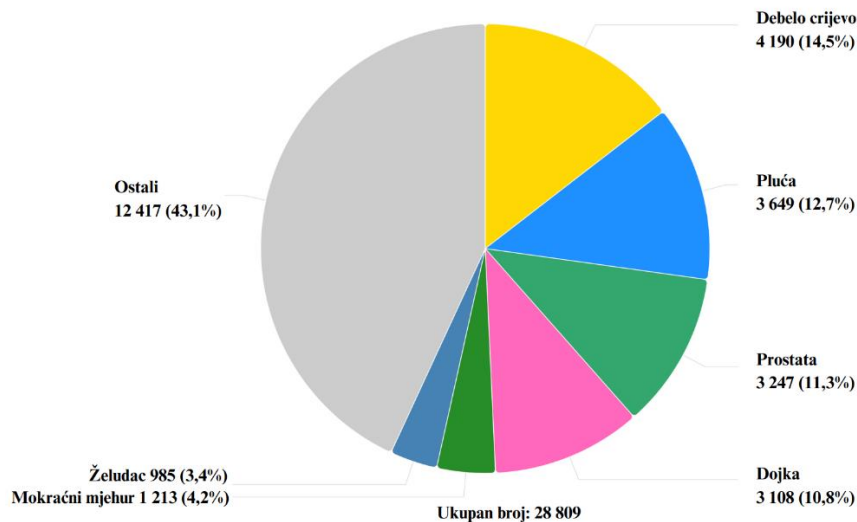


## **1. UVOD**

## 1.1. Tumor mokraćnog mjehura

### 1.1.1. Epidemiologija

Tumor mokraćnog mjehura predstavlja značajan javnozdravstveni izazov s visokom incidencijom, prevalencijom i mortalitetom diljem svijeta. Godišnje se dijagnosticira približno 573 000 novih slučajeva, što ga čini desetim najčešće dijagnosticiranim tumorom u svijetu. Svake godine uzrokuje oko 213 000 smrtnih slučajeva. Muškarci češće obolijevaju od tumora mokraćnog mjehura u usporedbi sa ženama. Za muškarce je to šesti najčešći oblik karcinoma i deveti vodeći uzrok smrti od raka (1). U Hrvatskoj je 2022. godine dijagnosticirano 1213 novih slučajeva, što ga navedene godine svrstava kao peti najčešći rak u ukupnoj populaciji te predstavlja 4,2 % od ukupnog broja novih slučajeva raka (slika 1). Od 1213 novodijagnosticiranih slučajeva, 860 su bili muškarci, a 353 su bile žene. Smrtnost raka mokraćnog mjehura je iznosila 13,6 slučajeva na 100 000 ljudi, što ga čini osmim najsmrtonosnijim oblikom raka u Hrvatskoj te godine (2).



**Slika 1.** Udio najčešćih vrsta karcinoma u ukupnom broju karcinoma kod oba spola 2022. godine u Hrvatskoj. Karcinom mokraćnog mjehura je peti najčešći karcinom u Hrvatskoj s 1213 novih slučajeva te predstavlja 4,2 % od ukupnog broja novih slučajeva raka u 2022. godini (Preuzeto i prilagođeno prema UN izvješću *Croatia factsheet Globocan 2022*).

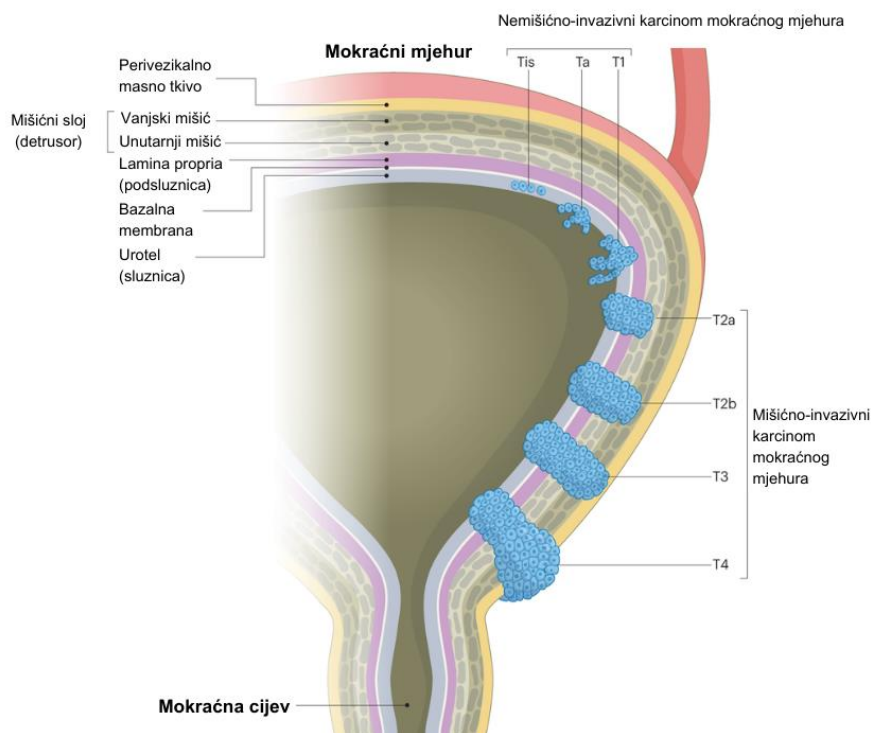
### 1.1.2. Etiologija

Međunarodna agencija za istraživanje raka navodi nekoliko ključnih čimbenika rizika za razvoj tumora mokraćnog mjehura. Pušenje duhana je najčešći čimbenik rizika, odgovoran za približno polovicu slučajeva. Rizik se povećava s trajanjem i intenzitetom pušenja, ali se smanjuje s vremenom nakon prestanka. Ipak, bivši pušači i dalje imaju veći rizik od obolijevanja čak i 30 godina nakon prestanka pušenja, u usporedbi s osobama koje nikada nisu pušile. Pasivno izlaganje duhanskom dimu također može povećati rizik kod nepušača. Profesionalna izloženost karcinogenima, poput aromatskih amina i policikličkih aromatskih ugljikovodika, predstavlja idući najčešći čimbenik rizika, posebno u industrijaliziranim zemljama. Također, određeni okolišni faktori kao što su X- i gama zračenje, arsen te infekcija šistozomom se povezuju s povećanim rizikom od razvoja karcinoma mokraćnog mjehura. Dodatno, lijekovi kao što su ciklofosfamid i klornafazin mogu biti povezani s povećanim rizikom (3).

### 1.1.3. Klasifikacija

Najčešći oblik tumora mokraćnog mjehura potječe od prijelaznog epitela i obuhvaća oko 90 % slučajeva. Ostali tipovi tumora uključuju karcinom pločastih stanica odgovoran za 1-7 % slučajeva te adenokarcinom, koji predstavlja 0,5-2 % svih karcinoma mokraćnog mjehura. Stadij tumora se određuje sukladno TNM klasifikaciji, pri čemu T označava veličinu i invazivnost tumora, N zahvaćenost limfnih čvorova, dok M označava prisutnost udaljenih metastaza (4).

Nemišićno-invazivni karcinomi mokraćnog mjehura (engl. *non-muscle invasive bladder cancer*, NMIBC) prevladavaju (70-75 %) među tumorima mokraćnog mjehura. Kao što je prikazano na slici 2, ovi tumori su ograničeni na sluznicu (Ta) ili submukozni sloj (T1) mokraćnog mjehura i nisu prodrli u mišićni sloj. Mišićno-invazivni karcinomi mokraćnog mjehura (engl. *muscle-invasive bladder cancer*, MIBC) čine manji postotak (25-30 %) slučajeva. Ovi tumori prodiru u mišićni sloj (T2) mokraćnog mjehura ili dalje, u okolno tkivo ili organe (T3 i T4) (5).



**Slika 2.** Presjek mokraćnog mjehura i različiti stupnjevi invazije tumora (Preuzeto i prilagođeno prema Hoogstraten LMC i sur., 2023).

Tradicionalni klasifikacijski sustavi ne uzimaju u obzir dovoljno heterogenost tumora, što dovodi do nepreciznog izbora terapije. Kako bi terapija bila prilagođena specifičnim obilježjima pojedinih tumora, potrebno je primjenjivati klasifikaciju na temelju njihovih molekularnih obilježja (6).

Tumori bez invazije mišićnog sloja svrstavaju se u dva glavna molekularna podtipa: luminalni i bazalni. Luminalni podtip pokazuje veći izražaj ranih regulatora staničnog ciklusa, poput ciklina D1 i mutacije receptora 3 za čimbenik rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*, FGFR3) te se povezuje s povoljnom prognozom. Tumori koji pripadaju luminalnom podtipu, ali pokazuju znakove progresije, karakterizirani su povećanim izražajem kasnih regulatora staničnog ciklusa, transkripcijskih faktora povezanih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) i prekomjernim izražajem receptora 2 za epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor 2*, ERBB2) te su povezani s većim rizikom od progresije u mišićno-invazivni tip. Bazalni podtip ima mutiran FGFR3 i povezan je s lošim kliničkim ishodima (6).

Tumori s invazijom u mišićni sloj se pak mogu klasificirati u nekoliko molekularnih podtipova, uključujući luminalni papilarni (engl. *luminal papillary*, LumP), luminalno nespecificirani (engl. *luminal non-specified*, LumNS), luminalno nestabilni (engl. *luminal unstable*, LumU), bogati stromom, bazalni/skvamozni (engl. *basal/squamous*, Ba/Sq) i neuroendokrini tip (engl. *neuroendocrine-like*, NE-like). Tumori LumP karakterizirani su aktivacijom FGFR3 i imaju povoljnu prognozu. Tumori LumNS pokazuju mutacije regulatornih faktora i povezani su s nižim stopama preživljenja. Tumori LumU su genomski nestabilni sa smanjenim izražajem tumor supresorskog proteina 53 (engl. *tumor suppressor protein p53*, TP53) i povećanim izražajem ERBB2. Tumori Ba/Sq pokazuju bazalnu i skvamoznu diferencijaciju, često s mutacijama receptora za epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), proteina povezanog s retinoblastomom (engl. *retinoblastoma-associated protein*, RB1) i TP53 te su povezani s lošom prognozom. Tumori NE-like, najrjeđi podtip, karakterizirani su markerima neuroendokrine diferencijacije i mutacijama u genima TP53 i RB1, a odlikuju se agresivnim ponašanjem (6).

#### **1.1.4. Dijagnoza i liječenje**

Temeljna dijagnostička procedura je cistoskopija s transuretralnom resekcijom tumora (TUR), gdje se kroz mokraćnu cijev u mokraćni mjehur umetne cistoskop opremljen kamerom u svrhu vizualizacije unutrašnjosti mjehura i uklanjanja tumora ili uzimanja uzoraka tkiva za biopsiju (7).

Tumor koji ne prodire u mišićni sloj se uz TUR liječi i intravezikalnom terapijom. Niskorizični bolesnici se liječe neposrednom intravezikalnom kemoterapijom, obično gemcitabinom ili mitomicinom. Adjuvantna intravezikalna imunoterapija BCG-om (*Bacillus Calmette-Guérin*) se koristi kod bolesnika sa srednjim i visokim rizikom od povratka bolesti. Bolesnicima visokog rizika od recidiva bolesti se dodatno primjenjuje intravezikalna imunoterapija održavanja BCG-om tijekom tri godine nakon TUR-a. Radikalna cistektomija se vrši kod bolesnika s visokim rizikom od progresije bolesti ili kod tumora koji ne reagiraju na intravezikalnu terapiju (7).

Terapijski pristup tumorima koji prodiru u mišićni sloj ovisi o kliničkom stanju pacijenta i stadiju bolesti. Radikalna cistektomija, koja uključuje potpuno uklanjanje mokraćnog mjehura i susjednih struktura poput prostate kod muškaraca ili maternice kod žena, predstavlja zlatni standard kirurškog liječenja tumora koji prodire u mišićni sloj. Neoadjuvantna kemoterapija, uglavnom temeljena na cisplatinu, može se koristiti prije radikalne cistektomije kako bi se

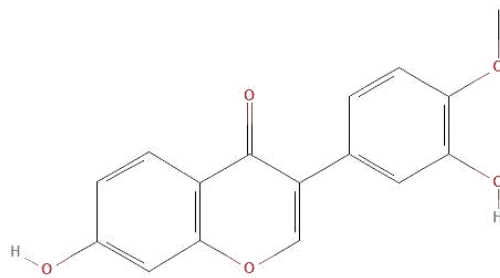
smanjila veličina tumora i poboljšalo kirurško liječenje. S druge strane, trimodalni pristup omogućuje očuvanje mokraćnog mjehura, a uključuje TUR i kombiniranu kemoradioterapiju (7).

Tumor mokraćnog mjehura je kandidat za liječenje imunoterapijom s obzirom na to da sadrži jedinstveni tumorski mikrookoliš s obiljem imunoloških stanica, citokina i specifičnih obrazaca

ekspresije imunoloških gena. Prilikom aktivacije, T-stanice povećavaju ekspresiju ko-inhibitornih molekula na svojoj površini, poput proteina pridruženog citotoksičnim T-limfocitima 4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CTLA-4) i proteina programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed cell death protein 1*, PD-1). Ligandi za ove ko-inhibitorne molekule, poput liganda programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed death-ligand 1*, PD-L1), izraženi su na normalnim stanicama i tkivima, kao i na regulatornim T-stanicama kako bi se ograničio opseg upale i izbjeglo oštećenje zdravih tkiva. Međutim, maligne stanice također mogu izraziti ligande za aktiviranje ko-inhibitornih molekula na T-stanicama što rezultira smanjenjem imunološkog odgovora na tumor. Monoklonska protutijela anti-PD-1 i anti-PD-L1, poznata kao inhibitori kontrolnih točaka, mogu spriječiti interakciju liganda i receptora te tako vratiti osjetljivost tumora na imunološki sustav. FDA je odobrila pet inhibitora kontrolnih točaka za liječenje tumora mokraćnog mjehura; atezolizumab, pembrolizumab, nivolumab, durvalumab i avelumab (8).

## 1.2. Kalikosin

Kalikosin, poznat pod IUPAC nazivom 7-hidroksi-3-(3-hidroksi-4-metoksifenil)krom-4-on, je fitoestrogen koji pripada skupini izoflavona (Slika 3) (9). Potječe iz različitih biljaka unutar obitelji mahunarki (*Fabaceae*). Kalikosin je po svom terapijskom potencijalu prepoznat još u području tradicionalne kineske medicine. Kroz tisućljetnu povijest tradicionalne kineske medicine, opsežno su se koristile biljke bogate kalikosinom poput astragalusa (*Astragalus membranaceus*). Suvremena istraživanja potvrđuju ljekovite učinke kalikosina, uključujući antitumorska, protuupalna, antioksidativna, neuroprotektivna, kardioprotektivna i hepatoprotektivna djelovanja (10–12).



**Slika 3.** Strukturni prikaz kalikosina. (Preuzeto i prilagođeno prema *National Center for Biotechnology Information*).

### 1.2.1. Antitumorski učinci

Mehanizmi antitumorskih djelovanja kalikosina proučavani su u različitim tumorskim vrstama putem molekularnog modeliranja te prekliničkih i kliničkih studija. Kalikosin potiče apoptozu smanjujući ekspresiju antiapoptotskih proteina (poput Bcl-2) i povećavajući ekspresiju proapoptotskih proteina (Bax, Bak, kaspaze). Zaustavlja stanični ciklus i proliferaciju stanica inhibirajući ekspresiju i aktivnost ciklina (A1, D1, E) i kinaza ovisnih o ciklinu (2, 4, 6), ili povećavajući ekspresiju inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu (p21, p27, p53). Potiskuje metastazu i angiogenezu (MMP-2 i 9, Wnt/-katena), upalu (TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B kinaza, IL-1 $\beta$ , fosfo-Akt, fosfor-p65) te regulira stanično signaliziranje (NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt, MAPK/ERK, fosfo-mTO) (11).

Kada se kalikosin kombinira s konvencionalnim kemoterapijskim lijekovima, kao što su temozolomid i cisplatin, pokazuje sinergizam u antitumorskom djelovanju kroz inhibiranje stanične proliferacije i poticanje stanične smrti. Otpornost na antitumorske lijekove (engl. *multidrug resistance*, MDR) značajna je prepreka u liječenju tumora. Rezistencija na liječenje se može pojaviti kroz različite mehanizme, kao što su smanjena apsorpcija lijekova, povećano izbacivanje lijekova iz stanice, aktivacija sustava detoksifikacije i dr. Utvrđeno je da kalikosin, kada se koristi u kombinaciji s nekim kemoterapeutcima smanjuje otpornost tumora na terapiju (11).

### 1.2.2. Farmakokinetika i sigurnost

Farmakokinetika kalikosina još uvijek nije potpuno razjašnjena. Nakon oralne primjene, distribucija u tkivima štakora pokazuje varijabilne koncentracije. Istraživanja su pokazala da se u humanim jetrenim staničnim linijama uglavnom metabolizira glukuronidacijom i sulfatacijom. Međutim, postoji ograničenje u postizanju terapijskih koncentracija u plazmi zbog brze glukuronidacije u stanicama crijevnog epitela. Također, provedena su *in silico* istraživanja farmakokinetike kalikosina koristeći različite alate. Dobiveni podaci o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu, eliminaciji i toksičnosti predviđaju povoljan farmakološki profil kalikosina, uključujući visoku apsorpciju i brzu eliminaciju. Međutim, potrebno je provesti eksperimentalna istraživanja kako bi se ova saznanja potvrdila, te kako bi se ostvario cjelovit uvid u farmakokinetiku, sigurnost primjene i učinkovitost u kliničkim uvjetima (11–13).

### 1.3. Apoptoza

Apoptoza je precizno regulirani stanični proces nužan za razvoj organizma i održavanje homeostaze stanica. Predstavlja oblik programirane stanične smrti u kojem stanica, uz potrošnju energije, pokreće proces samouništenja kao dio fiziologije organizma ili kao odgovor na patološke uvjete. Apoptoza sudjeluje u pravilnom razvoju i funkcioniranju imunološkog sustava, embrionalnom razvoju, regulaciji ciklusa stanične obnove te uklanjanju oštećenih ili zaraženih stanica poput prekanceroznih ili virusom zaraženih stanica (14). Apoptozom se kontrolirano uklanjaju oštećene stanice bez izazivanja upale kroz niz karakterističnih morfoloških i biokemijskih promjena. Stanica postupno smanjuje svoju veličinu, a u jezgri dolazi do kondenzacije kromatina i tamnjenja jezgre (piknoza). Kromatin se potom fragmentira, a jezgra se razgrađuje na manje dijelove (karioreksija). Dolazi do izdvajanja dijelova stanične membrane i odvajanja staničnih fragmenata u apoptotska tjelešca. Apoptotska tjelešca se prema tome, sastoje od fragmenata organela i jezgre te su okružena cjelovitom staničnom membranom. Tjelešca potom fagocitiraju susjedne stanice ili makrofagi (15).

Ovisno o mehanizmu kojim se apoptoza pokreće, razlikujemo vanjski put pokretanja apoptoze ili put receptora smrti te unutrašnji put pokretanja apoptoze ili mitohondrijski put (16).



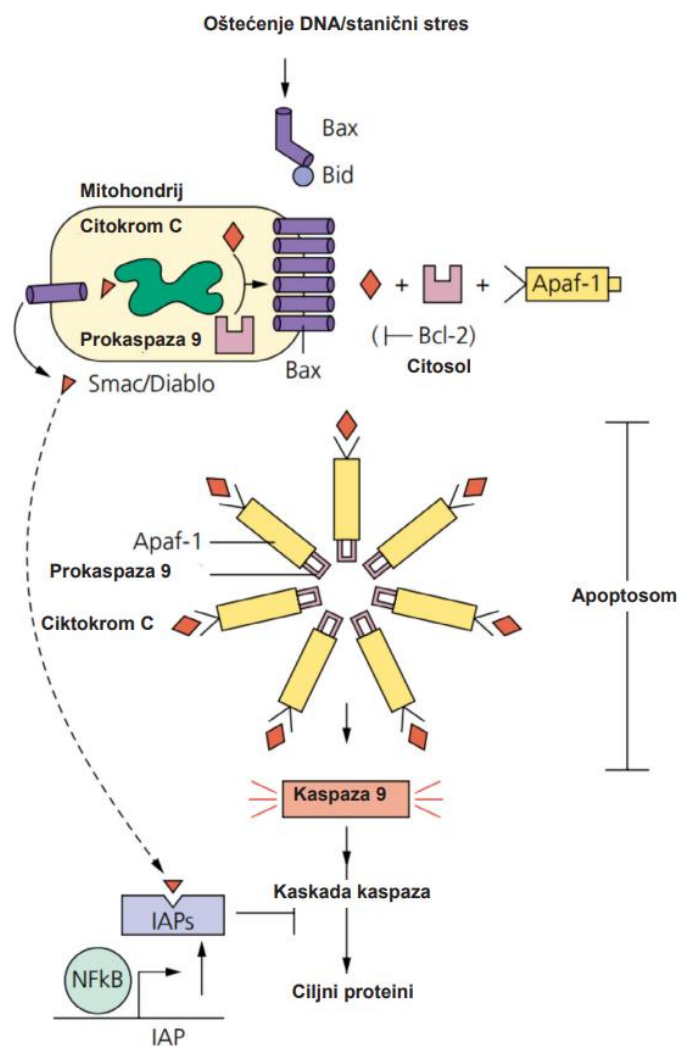
### 1.3.1. Unutarnji put apoptoze

Unutarstanični stresni podražaji, kao što su oštećenje DNA ili oksidativni stres, pokreću unutarnji put apoptoze s pomoću obitelji proteina Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*). Porodica proteina Bcl-2 sastoji se od približno 25 članova, od kojih neki potiču staničnu smrt, dok drugi djeluju kao inhibitori apoptoze. Svi članovi porodice sadrže najmanje jednu Bcl-2 homolognu (BH) domenu, dok većina njih sadrži tri ili četiri BH domene. Putem BH homolognih domena, članovi ove obitelji mogu uspostavljati međusobne interakcije, pri čemu ishod, bilo apoptoza ili preživljenje stanice, ovisi o relativnoj zastupljenosti tih interakcija. Unutar skupine proapoptotskih proteina nalazi se podskup koji se naziva samo BH3 proteinima (engl. *BH3-only members*) jer dijele samo jednu BH domenu, BH3. Samo BH3 proapoptotski proteini potiču aktivnost proapoptotskih proteina ili vežu i inhibiraju antiapoptotske proteine Bcl-2. Proapoptotski članovi obitelji Bcl-2, kao što su Bax (engl. *Bcl-2-associated X protein*) i Bak (engl. *Bcl-2 homologous antagonist/killer*), djeluju formirajući pore u vanjskoj mitohondrijskoj membrani. S druge strane, antiapoptotski članovi obitelji Bcl-2, kao što su Bcl-2 i Mcl-1 (engl. *myeloid cell leukemia 1*), vežu proapoptotske proteine kako bi inhibirali apoptozu (17).

Nakon aktivacije apoptotskim signalom, samo BH3 proteini, Bid (engl. *BH3 interacting-domain death agonist*) i Bim (engl. *Bcl-2-like protein 11*), vežu i aktiviraju Bax. Ova interakcija izaziva konformacijsku promjenu u Baxu, koji se translocira iz citoplazme u vanjsku mitohondrijsku membranu gdje oligomerizira i uzrokuje promjene u vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Ovim procesom, poznatim kao permeabilizacija vanjske mitohondrijske membrane (engl. *mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) se povećava propusnost vanjske mitohondrijske membrane i formiraju membranske pore što omogućuje oslobađanje apoptotskih medijatora. Kao što je prikazano na slici 4, citokrom C i prokaspaza-9 se oslobađaju iz mitohondrija u citoplazmu i s proteinom Apaf-1 (engl. *apoptotic protease-activating factor-1*), sastavljaju kompleks apoptosom. Kaspaza-9 je inicijatorska kaspaza koja cijepa i aktivira nizvodne kaspaze-3, -6 i -7. Izvršne kaspaze potom dovode do fragmentacije jezgre i raspadanja stanice u apoptotska tjelešca (17).

Permeabilizacijom vanjske mitohondrijske membrane se oslobađaju i drugi medijatori apoptoze uključujući Smac/DIABLO (engl. *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI*), Omi/HtrA2 (engl. *high-temperature requirement protein A2*), AIF (engl. *apoptosis-inducing factor*) i endonukleazu G. Apoptoza je regulirana porodicom proteina nazvanim inhibitori proteina apoptoze (engl. *inhibitors of apoptosis proteins*, IAP). Primjerice XIAP (engl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*), član

IAP obitelji se izravno veže i inhibira aktivnost kaspaze-3, -7 i -9. Transkripcijski faktor nazvan NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) snažan je inhibitor apoptoze jer potiče transkripciju IAP-ova. Fiziološka mitohondrijska funkcija Smac/DIABLO nije poznata. Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 neizravno potiču aktivaciju kaspaza neutraliziranjem IAP-ova. HtrA2/OMI također doprinosi smrti stanica zahvaljujući proteaznoj aktivnosti, izravno cijepajući IAP-ove. Nadalje, AIF i endonukleaza G oslobađaju se iz mitohondrija nakon permeabilizacije vanjske mitohondrijske membrane i translociraju u jezgru kako bi doprinijeli kondenzaciji nuklearnog kromatina i fragmentaciji DNA. Dakle, postoji dinamička ravnoteža između molekula pro- i anti- apoptotskog učinka, što omogućuje stanici da se nosi s manjim mitohondrijskim oštećenjem, u kojem slučaju IAP-ovi mogu adekvatno blokirati aktivaciju kaspaza započetu malom količinom oslobođenog citokroma c. Međutim, u okolnostima u kojima se događa opsežnije mitohondrijsko oštećenje, antiapoptotsko djelovanje IAP-ova se može prevladati većom koncentracijom njihovih antagonista Smac/DIABLO i HtrA2/ OMI (18).



**Slika 4.** Prikaz unutarnjeg puta apoptoze. Stanični stres pokreće samo BH3 protein koji aktivira Bax. Bax prolazi kroz konformacijsku promjenu, umeće se u vanjsku mitohondrijsku membranu i oligomerizira. Važni regulatori oslobađaju se iz intermembranskog prostora. Citokrom c, Apaf-1 i prokaspaza-9 tvore apoptosom. Kaspaza-9 se aktivira i cijepa nizvodne kaspaze. Smac/DIABLO, također oslobođen iz mitohondrija, inhibira IAP-ove koji blokiraju djelovanje kaspaza (Preuzeto i prilagođeno prema Pecorino i sur., 2016).

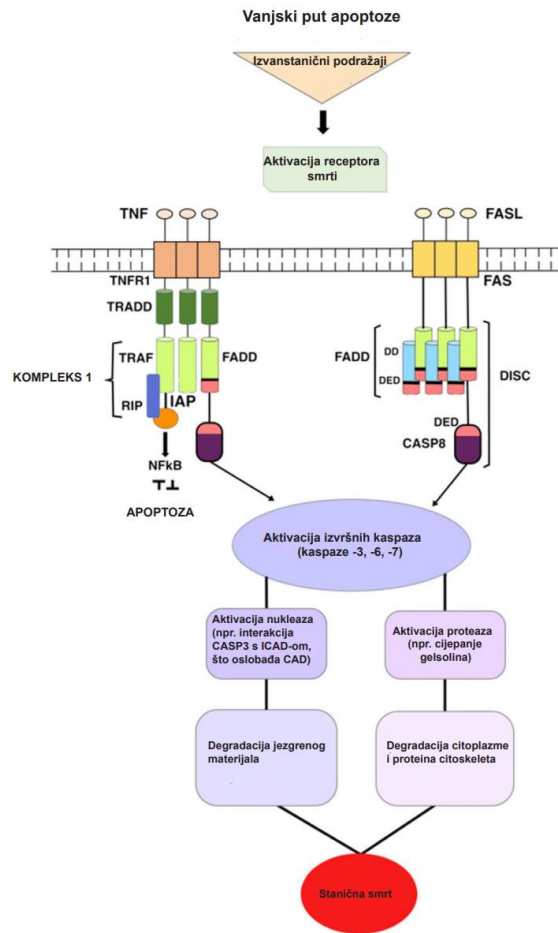
### 1.3.2. Vanjski put apoptoze

Vanjski put apoptoze se pokreće vezivanjem liganda na receptor smrti (engl. *death receptor*, DR). Receptori smrti pripadaju porodici receptora čimbenika nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor receptors*, TNFR). Sadrže izvanstanične domene bogate cisteinom i citoplazmatske domene smrti (engl. *death domain*, DD) koje prenose signale izvana prema unutrašnjosti stanice. Postoji osam vrsta receptora smrti, koji se mogu podijeliti u dvije skupine ovisno o adaptornim proteinima (19).

Prva skupina uključuje receptore Fas (engl. *Fas cell surface death receptor*), TRAILR1, i TRAILR2 (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors 1 and 2*), koje može aktivirati Fas ligand (engl. *Fas ligand*, FasL) i ligand koji izaziva apoptozu povezan s čimbenikom nekroze tumora (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL). Vezanjem liganda na receptore stvara se signalni kompleks koji izaziva smrt (engl. *Death-inducing signaling complex*, DISC). DISC se sastoji od adaptorskog proteina FAS-a povezanog putem domene smrti (engl. *Fas-associated protein with death domain*, FADD) i prokaspaze-8 (19).

Druga skupina uključuje receptore TNFR1 (engl. *tumor necrosis factor receptor 1*), TRAMP (engl. *TNF receptor-associated protein*), DR6 (engl. *death receptor 6*) i EDAR (engl. *ectodysplasin A receptor*). Ovi receptori smrti regrutiraju protein domene smrti povezanog s receptorom čimbenika nekroze tumora tipa 1 (engl. *tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein*, TRADD) kao adaptorski protein te se vežu na čimbenike povezane s TNF-2,5 receptorima (engl. *TNF-2,5 receptor-associated factors*, TRAF2,5), proteinsku kinazu u interakciji receptora (engl. *receptor-interacting protein kinase*, RIP1 ili RIPK1) i na stanične inhibitore proteina apoptoze (engl. *cellular inhibitors of apoptosis proteins*, cIAP). TRADD, TRAF2,5, RIP1/RIPK1 i cIAP tvore signalni Komplex 1 koji vrši transdukciju signala apoptoze i preživljavanja stanica (slika 5). TNFR1 može neizravno izazvati apoptozu ovisnu o FADD-u i kaspazi-8. Receptor TNFR1 regrutira TRADD i potom FADD, koji djeluje kao posrednik aktivacije apoptoze aktivacijom kaspaze-8. Nasuprot tome, TRADD može regrutirati TRAF2 (u kompleksu TRAF2/cIAP) i RIP, što na kraju dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B i JNK/AP-1 (engl. *c-Jun N-terminal kinase/activator protein 1*) signalnih putova i staničnog preživljenja (19).

Aktivirana kaspaza-8 cijepa izvršnu kaspazu-3. Aktivirana kaspaza-8 može cijepati i proapoptotski samo BH-3 protein BID koji oslobađa citokrom C iz mitohondrija, što dovodi do aktivacije kaspaze-9, koja zauzvrat cijepa kaspazu-3 (16,20).



**Slika 5.** Prikaz vanjskog puta apoptoze. Signali smrti, TNF i FasL, aktiviraju svoje receptore smrti, TNF receptor (TNFR) i Fas receptor (FasR). Vežanjem signala smrti dolazi do trimerizacije receptora. Adaptorski proteini TRADD i FADD prepoznaju aktivirane receptore i aktiviraju kaspazu-8. Ova inicijatorska kaspaza pokreće aktivaciju efektorskih kaspaza (17). Kaspaza-3 aktivira CAD endonukleazu (engl. *Caspase-activated DNase*, CAD) koja razgrađuje kromosomsku DNA. Kaspaza-3 cijepa gelsolin, protein koji veže aktin. Pocijepani fragmenti proteina gelsolina potom cijepaju filamente aktina. Apoptotski proces se može pod utjecajem IAP proteina prekinuti na različitim točkama NF- $\kappa$ B puta koji podržava stanično preživljenje. S druge strane, proces apoptoze može blokirati signalni put NF- $\kappa$ B cijepanjem s pomoću kaspaza. Primjerice, receptor TNFR1, ključan za aktivaciju NF- $\kappa$ B, također može posredno potaknuti apoptozu. Kada se TNFR1 aktivira, on regrutira TRADD a potom i FADD, pokretački protein koji potiče apoptozu aktivirajući kaspazu-8. Međutim, TRADD može regrutirati i druge proteine poput TRAF2, IAP i RIP, što dovodi do aktivacije antiapoptotskih signalnih putova NF- $\kappa$ B i JNK/AP-1. Ova složena interakcija između apoptoze i aktivacije NF- $\kappa$ B pridonosi održavanju ravnoteže između stanične smrti i preživljavanja u organizmu (Preuzeto i prilagođeno prema Cavalcante i sur., 2019).

### 1.3.3. Poli(ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP1)

Poli ADP-riboza polimeraze čine obitelj od 17 enzima koji su uglavnom smješteni u staničnoj jezgri i odgovorni za kataliziranje reakcije ADP-ribozilacije. PARP1 je najzastupljenija i dobro proučena proteaza u obitelji PARP, koja ima značajnu ulogu u apoptozi i popravku DNA. Poli-ADP-riboza polimeraza 1 sastoji se od N-terminalne DNA vezujuće domene (engl. *DNA binding domain*, DBD), automodifikacijske domene (engl. *automodification domain*, AMD) i C-terminalne katalitičke domene. DNA vezujuća domena sadrži strukture cinkovih prstiju za prepoznavanje oštećenja DNA i signal za nuklearnu lokalizaciju (engl. *nuclear localization signal*, NLS). Automodifikacijska domena sintetizira lance poli-ADP riboze. Katalitička domena katalizira PAR sintezu i sadrži veze za nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) (21).

Aktivacija PARP1 prvenstveno je uzrokovana oštećenjem DNA. U prisutnosti blagog oštećenja DNA, aktivacija PARP1 će popraviti lom DNA. U prisutnosti umjerenih oštećenja, kaspaze cijepaju PARP1 kako bi pokrenuli staničnu apoptozu. Međutim, kada je DNA značajno oštećena, PARP1 će se previše aktivirati i koristiti višak unutarstaničnog NAD<sup>+</sup>, što će rezultirati iscrpljivanjem NAD<sup>+</sup> i smanjenom razinom ATP-a te na kraju dovesti do nekroze stanica (21).

PARP1 je supstrat kaspaza-3 i -7, koje ga razgrađuju na N-terminalni 24 kDa i C-terminalni 89 kDa fragment. Fragment od 24 kDa sadrži DNA vezujuću domenu i NLS, dok fragment od 89 kDa sadrži automodifikacijsku domenu i katalitički aktivnu domenu. Fragment od 24 kDa nepovratno se veže na oštećenu DNA sprječavajući vezanje netaknutog PARP1 što znači da popravak DNA ne može započeti. Fragmenti od 89 kDa, s kovalentno vezanim PAR polimerima, premještaju se iz jezgre u citoplazmu. PAR polimeri se vežu za AIF usidren na mitohondrijsku membranu što uzrokuje oslobađanje u citoplazmu. Kako AIF ima NLS domenu, premješta se u jezgru i povezuje se s DNazom, što dovodi do fragmentacije DNA (22).

### 1.3.4. Kaspaza-3

Kaspaza-3 je endoproteaza građena od dvije podjedinice od 12 kDa i 17 kDa. Kaspazu-3 aktiviraju inicijatorske kaspaze -9, -8 i -10 putem unutarnjeg i vanjskog puta apoptoze. Kaspaza-3 također može samostalno aktivirati kaspaze -6, -7 i -9, uspostavljajući povratnu vezu koja dodatno potiče apoptozu (20).

Kaspaza-3 je ključni izvršitelj apoptoze. Aktivirana kaspaza-3 razgrađuje  $\alpha$ -fodrin, protein važan za održavanje integriteta citoskeleta, kao i gelsolin, što rezultira fragmentacijom aktinskih filamenata i karakterističnim promjenama oblika stanica tijekom apoptoze. Kaspaza-3 cijepa ICAD/DFP-45 (engl. *inhibitor of caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 45*), zbog čega dolazi do oslobađanja inhibicijskog učinka na CAD, endonukleazu koja je odgovorna za fragmentaciju DNA (23).

Kaspaza-3 također posreduje u proliferaciji izazvanoj apoptozom (engl. *apoptosis-induced proliferation*). Naime, apoptotska stanica oslobađajući mitogene potiče proliferaciju susjednih stanica, što doprinosi zacjeljivanju i regeneraciji tkiva. Utvrđeno je da osim što sudjeluje u mehanizmima apoptoze, ima ulogu u staničnim procesima koji nisu povezani sa staničnom smrću. Primjerice, blaga aktivacija kaspaze-3 regulira napredovanje kroz stanični ciklus i proliferaciju neovisno o apoptozi. Nadalje, aktivacija kaspaze-3 utječe na diferencijaciju i sazrijevanje različitih tipova stanica poput skeletnog mišića, osteogenih stanica i pluripotentnih matičnih stanica. Konačno, niska razina aktivnosti kaspaze-3 može u blagim stresnim uvjetima promicati preživljavanje stanica aktivacijom signalnih putova kao što je Akt (engl. *protein kinase B*) (24).

## 1.4. Stanični ciklus

Stanični ciklus je složen i temeljito reguliran mehanizam koji rezultira udvostručavanjem eukariotske stanice. Stanični ciklus tvore četiri faze: G1, S, G2 i M. G1, S i G2 zajednički se nazivaju interfaza. U odraslih većina stanica nije u procesu stanične diobe, već se nalaze u fazi G0 ili fazi mirovanja, gdje stanica može trajno i ostati. Međutim, mitogeni ili faktori rasta mogu potaknuti stanice koje se nalaze u fazi G0 da se dijele. Stanice mogu ući u fazu G1 iz faze M ili iz faze G0. U G1 fazi se stanica priprema za S fazu tako što vrši sintezu mnogih proteina i povećava broj organela poput ribosoma i mitohondrija. S faza, također nazvana fazom sinteze DNA, obilježena je replikacijom genetskog materijala i proizvodnjom histona. Završetkom S faze, započinje faza G2, tijekom koje se sintetiziraju proteini, lipidi i stanica raste kako bi se pripremila za mitozu. M faza se sastoji od mitoze, tijekom koje se jezgra stanice dijeli, i citokineze, tijekom koje se citoplazma stanice dijeli na dvije stanice kćeri. Mitoza se sastoji od pet podfaza: profaza, prometafaža, metafaza, anafaza i telofaza (25).

Ispravno napredovanje stanice kroz stanični ciklus nadziru kontrolne točke. Naime, precizno regulirana diobe svake stanice neophodna je za očuvanje stabilnosti genoma u stanica kćeri. Stanica ne nastavlja s diobom dok se, ako je moguće, ne popravi bilo kakvo stanično oštećenje. Kontrolna točka G1/S, poznata kao restriksijska točka zaustavlja stanični ciklus ako je prisutno oštećenje DNA, što osigurava da se oštećena DNA ne replicira tijekom S faze. Kontrolna točka G2/M onemogućava ulazak stanice u M fazu ako je DNA nepotpuno replicirana ili oštećena. Kontrolna točka sastavljanja diobenog vretena (engl. *spindle assembly checkpoint*, SAC) zaustavlja razdvajanje kromosoma ako svi kromosomi nisu pravilno poravnati na metafaznoj ploči ili ako sve kinteohore nisu pričvršćene za niti diobenog vretena na suprotnim polovima stanice (17).

### 1.4.1. Regulacija staničnog ciklusa

Napredovanje kroz stanični ciklus je usklađeno skupinom proteina poznatih kao ciklini i kinaze ovisne o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinases*, Cdk). Kinaze ovisne o ciklinu su serin/treonin kinaze čije su katalitičke aktivnosti regulirane interakcijama sa ciklinima i Cdk inhibitorima (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitors*, Cki). Proliferativni signali potiču aktivaciju ciklin/Cdk kompleksa. Nasuprot tome, oštećenje DNA aktivira kontrolne točke staničnog ciklusa i inhibira aktivnost ciklin/Cdk kompleksa. U ljudskim stanicama je do danas identificirano 20 Cdk-a i 29 ciklina. Ekspresija određenog tipa ciklina oscilira tijekom staničnog ciklusa zahvaljujući regulaciji na razini transkripcije gena i ubikvitinaciji proteina (26).



Ciklini D (D1, D2 i D3) reguliraju napredovanje staničnog ciklusa kroz G1 fazu. Ciklin D1 se smatra ključnom poveznicom između mitogenih signala i prolaska kroz restriksijsku točku staničnog ciklusa. Utvrđeno je da je ciklin D1 također prekomjerno izražen u mnogim tipovima tumorima. Ciklini D2 i D3 također imaju ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, međutim njihova ekspresija je manje uobičajena u ljudskim tumorima (27).

Faktori rasta preko EGF (engl. *epidermal growth factor*) signalnog puta induciraju sintezu ciklina D koji zajedno sa Cdk 4/6, potiče napredovanje kroz restriksijsku točku G1 faze. Međutim, ako su signali rasta odsutni, sinteza ciklina D izostaje i stanica ne može napredovati u S fazu već ulazi u fazu mirovanja G0. Protein RB je supstrat kompleksa ciklin D-Cdk 4/6. RB regulira aktivnost E2F transkripcijskih faktora, ključnih za ekspresiju gena potrebnih za odvijanje S faze. Aktivnost RB-a reguliraju uzastopni događaji fosforilacije od strane ciklin-cdk kompleksa. U odsutnosti signala rasta, RB je u hipofosforiliranom stanju vezan za E2F transkripcijski faktor i histonske deacetilaze (engl. *histone deacetylase*, HDAC). Vežući se za E2F, RB sakriva njegovu transaktivacijsku domenu. RB također inhibira ekspresiju E2F ciljanih gena regrutirajući HDAC, enzime koji deacetiliraju histone i povećavaju kondenzaciju kromatina što suprimira transkripciju. U prisutnosti signala rasta, ciklin D/Cdk4 fosforilira karboksilne terminalne ostatke RB-a što uzrokuje konformacijsku promjenu i oslobađanje HDAC, ali ne i E2F. Oslobađanjem HDAC-a, gen za ciklin E postaje izražen, ali ne i drugi ciljni geni E2F. E2F stimulira sintezu ciklina E koji zajedno sa Cdk2 dodatno fosforilira aminokiselinske ostatke RB-a, što rezultira konformacijskom promjenom pri kojoj se oslobađa i E2F. Konačno dolazi do ekspresije gena koji su važni za S fazu poput ciklina A, timidilat sintaze i dihidrofolat reduktaze (17). Pri kraju S faze, ciklin E se razgrađuje, a ciklin A tvori kompleks s Cdk2. Kompleks ciklina A/Cdk2 završava S fazu fosforilacijom CDC6 (engl. *cell division cycle 6*) i E2F1 što potiče prijelaz staničnog ciklusa u fazu G2 (26). U fazi G2, dolazi do sinteze ciklina B, koji s Cdk1 tvori kompleks. Kompleks ciklin B/Cdk1 potiče niz promjena u stanici koje pokreću M fazu staničnog ciklusa, kao što su kondenzacija kromatina, raspad jezgrine ovojnice i formiranje diobenog vretena. Prihvaćanjem svih kromosoma na niti diobenog vretena u metafaznoj ploči, stanični proces prelazi u anafazu, označavajući kraj mitoze. Napredovanje do anafaze potiče aktivacija anafaznog promovirajućeg kompleksa/ciklosoma (engl. *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*, APC/C) koji označava ciklin B za ubikvitinaciju. Razgradnjom ciklina B, Cdk1 postaje neaktivan, što dovodi do završetka mitoze, nakon čega slijedi citokineza i povratak stanice u interfazu (28).

## 1.5. Stanični metabolizam

Metabolizam kroji složena mreža biokemijskih reakcija koje se odvijaju u svrhu održavanja života stanice. Odnosi se na tri osnovna procesa: anabolički putovi, koji grade složenije molekule iz jednostavnijih, katabolički putovi, koji razgrađuju složenije molekule na jednostavnije, te amfibolični putovi, koji djeluju kao sjecišta anaboličkih i kataboličkih procesa (29).

Središnje mjesto u metabolizmu zauzima proizvodnja i iskorištavanje adenozin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP), energetske valute stanice, koja u najvećoj količini nastaje u mitohondrijima u procesu oksidativne fosforilacije. Tijekom oksidativne fosforilacije se oslobađa energija u obliku fosfata oksidacijom respiratornog lanca uz korištenje molekularnog kisika unutar mitohondrija. Također, u procesu glikolize nastaju dva ATP-a razgradnjom jedne molekule glukoze. Konačno, ciklus limunske kiseline izravno generira jedan ATP u reakciji kataliziranoj sukcinil-tiokinazom (29).

Glukoza je u središtu metabolizma ugljikohidrata jer služi kao glavni izvor energije za većinu tkiva. Glukoza se u glikolitičkom putu razgrađuje do piruvata. Osim toga, glukoza i njeni metaboliti doprinose sintezi glikogena, masnih kiselina, nukleotida i nukleinskih kiselina putem pentoza-fosfatnog puta te osiguravaju ugljikove kosture za sintezu aminokiselina i lipida. Glukoneogeneza omogućuje sintezu glukoze iz neugljikohidratnih preteča. Masne kiseline i kolesterol, dio metabolizma lipida, mogu se dobiti putem prehrane ili se mogu sintetizirati iznova u tijelu. Koriste se za stvaranje tjelesnih zaliha energije, održavanje integriteta stanica, sintezu hormona i obavljanje drugih vitalnih funkcija. Metabolizam aminokiselina je usredotočen na sintezu proteina. Također, preostali ugljikovi kosturi nakon deaminacije aminokiselina se mogu koristiti za proizvodnju energije, glukoneogenezu ili sintezu masnih kiselina. Aminokiseline su također preteče nekih hormona i neurotransmitora. Zaključno, metabolizam usklađuje potrošnju energije za sintezu potrebnih biomolekula dok istovremeno osigurava energiju potrebnu za održavanje staničnih funkcija (29).

### 1.5.1. Glikoliza

Glikoliza je osnovni metabolički put koji razgrađuje glukozu kako bi stanica dobila energiju i međuprodukte za druge metaboličke putove. Glikoliza predstavlja središnji metabolizam ugljikohidrata jer se skoro svi šećeri, bilo da dolaze iz prehrane ili iz unutarstaničnih reakcija, na kraju mogu pretvoriti u glukozu. Kao rezultat glikolize, nastaje piruvat, koji je konačni produkt u stanicama s mitohondrijama i adekvatnom opskrbom kisikom. U aerobnim uvjetima, piruvat se dalje razgrađuje oksidativnom dekarboksilacijom do acetyl-CoA (engl. *acetyl coenzyme A*), koji se potom oksidira u ciklusu limunske kiseline do CO<sub>2</sub>. Alternativno, u stanicama kojima nedostaju mitohondriji (poput eritrocita) ili u stanjima nedostatka kisika se piruvat reducira u laktat pri čemu NADH služi kao donor elektrona. U uvjetima anaerobne glikolize nastaje manje ATP-a po molekuli glukoze u usporedbi s aerobnom glikolizom (30).

Prvi korak glikolize je fosforilacija glukoze do glukoza-6-fosfata uz pomoć enzima heksokinaze i ATP-a. Reakcija fosforilacije glukoze je ireverzibilna. Glukoza-6-fosfat je supstrat u sjecištu nekoliko metaboličkih putova: glikolize, puta pentoza fosfata, glikogeneze, glukoneogeneze i glikogenolize. U glikolitičkom putu, glukoza-6-fosfat izomerizira u fruktoza-6-fosfat uz pomoć fosfoglukoze-izomeraze. Fruktozu-6-fosfat ireverzibilno fosforilira fosfofruktokinaza 1 (engl. *phosphofructokinase 1*, PFK-1) koristeći ATP do fruktoze-1,6-bisfosfata. Fosforilacija katalizirana fosfofruktokinazom 1 predstavlja ključnu reakciju u regulaciji glikolize, koja određuje brzinu odvijanja glikolize. PFK-1 je alosterički inhibiran kada su razine ATP-a visoke, signalizirajući obilje energetske rezervi u stanici. Isto tako, povišene razine citrata, intermedijara u ciklusu limunske kiseline, smanjuju aktivnost PFK-1. Nasuprot tome, PFK-1 se aktivira prisustvom visokih koncentracija AMP-a, što signalizira da su zalihe energije stanice iscrpljene. Fruktoza-1,6-bisfosfat se potom djelovanjem fruktoza-1,6-bisfosfat-aldolaze razgrađuje u gliceraldehid-3-fosfat i dihidroksiacetonfosfat. Enzim fosfotrioza izomeraza katalizira reakciju interkonverzije dihidroksiacetonfosfata i gliceraldehid-3-fosfata. Dihidroksiacetonfosfat se koristi za sintezu triacilglicerola, dok se za daljnji metabolizam glikolitičkim putem izomerizira u gliceraldehid-3-fosfat. Ovaj proces izomerizacije rezultira proizvodnjom dvije molekule gliceraldehida-3-fosfata. Gliceraldehid-3-fosfat se zatim oksidira u 1,3-bisfosfoglicerat zahvaljujući gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazi pri čemu se NAD<sup>+</sup> reducira u NADH. S obzirom na ograničene količine NAD<sup>+</sup> u stanici, nastali NADH mora biti ponovno oksidiran kako bi se proces glikolize nastavio. Dva glavna mehanizma za oksidaciju NADH u NAD<sup>+</sup> su redukcija piruvata u laktat putem enzima laktat

dehidrogenaze u anaerobnim uvjetima i lanac transporta elektrona u aerobnim uvjetima. Fosfoglicerat kinaza potom prenosi fosfatnu grupu s 1,3-bisfosfoglicerata na ADP, pri čemu nastaje ATP i 3-fosfoglicerat. Budući da iz svake molekule glukoze nastaju dvije molekule 1,3-bisfosfoglicerata, ova reakcija korigira potrošnju dvije ATP molekule tijekom prethodnog stvaranja glukoze-6-fosfata i fruktoze-1,6-bisfosfata. Fosfoglicerat mutaza reverzibilno izomerizira 3-fosfoglicerat u 2-fosfoglicerat. U sljedećem koraku se 2-fosfoglicerat reverzibilno dehidrira djelovanjem enolaze u fosfoenolpiruvat (engl. *phosphoenolpyruvate*, PEP). Piruvat kinaza potom ireverzibilno prenosi fosfatnu grupu na ADP, pa nastaju piruvat i 2 molekule ATP-a po molekuli glukoze. Piruvat kinaza (PK) se aktivira fruktoza-1,6-bisfosfatom, proizvodom reakcije kataliziranom PFK-1, a inhibiran je ATP-om. U anaerobnim uvjetima, piruvat se reducira uz pomoć laktat dehidrogenaze do laktata pri čemu NADH služi kao donor elektrona. Obnavljanjem  $\text{NAD}^+$  je omogućen još jedan ciklus oksidacije gliceraldehid-3-fosfata s pomoću gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze i daljnje odvijanje glikolize. Redukcija u laktat je glavna sudbina piruvata u slabo prokrvljenim tkivima (poput leće i rožnica oka) ili u crvenim krvnim stanicama kojima nedostaju mitohondriji. Unatoč proizvodnji ATP-a tijekom glikolize, krajnji produkt, bilo piruvat ili laktat, i dalje sadrži većinu energije izvorno sadržane u glukozi. U prisustvu kisika, piruvat se oksidativno dekarboksilira u acetyl-CoA koji zatim oksidira u ciklusu limunske kiseline koji je potreban za potpuno oslobađanje te energije. U anaerobnim uvjetima, za svaku molekulu glukoze pretvorenu u dvije molekule laktata, stvaraju se dvije molekule ATP-a, dok nema neto proizvodnje ili potrošnje NADH-a. U aerobnim uvjetima glikolize također nastaju dvije molekule ATP-a, ali se proizvode i dvije molekule NADH-a po molekuli glukoze. Kontinuirana aerobna glikoliza zahtijeva oksidaciju većine ovog NADH-a putem lanca transporta elektrona, što rezultira proizvodnjom tri ATP-a za svaku molekulu NADH-a koja ulazi u lanac (29,30).

### 1.5.2. Piruvat kinaza izoenzim M2 (PKM2)

Stanice koje se aktivno dijele pod utjecajem signala rasta prolaze odgovarajuće promjene u metaboličkim procesima kako bi podržale svoju diobu. Različiti molekularni mehanizmi djeluju kako bi osigurali tri osnovne potrebe brzo proliferirajućih stanica: brza proizvodnja ATP-a radi održavanja energetskeg statusa, povećana biosinteza makromolekula te održavanje odgovarajućeg staničnog redoks statusa. Međutim, u tumorskim stanicama, ovi procesi su značajno poremećeni. Stanice tumora stječu sposobnost da trajno, bez obzira na prisutnost fizioloških signala rasta, prilagode svoj metabolizam kako bi zadovoljile zahtjeve brze podjele i rasta. To obuhvaća promjene u metabolizmu ugljikohidrata, proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Najbolje opisani metabolički fenotip opažen u tumorskim stanicama jest Warburgov efekt. Warburgov efekt je fenomen u kojem tumorske stanice preferiraju aerobnu glikolizu umjesto oksidativne fosforilacije za proizvodnju ATP-a, čak i pod uvjetima normalne opskrbe kisikom (31).

Kao što je navedeno, zadnji korak u glikolizi katalizira piruvat kinaza pri čemu nastaju piruvat i ATP iz fosfoenolpiruvata. Poznate su četiri vrste izoenzima piruvat kinaze kod sisavaca, PKM1, PKM2, PKL i PKR. PKR je izražen u crvenim krvnim stanicama, dok se PKL nalazi isključivo u jetri, bubrezima i crijevima te ima najmanju sklonost prema fosfoenolpiruvatu. PKM1 prevladava u tkivima koja zahtijevaju opsežnu opskrbu energijom poput srca, mozga i mišića. PKM2 je izražen u embrionalnim stanicama, a kako embriogeneza napreduje, PKM2 se zamjenjuje tkivno-specifičnim PKM1, PKL ili PKR. Međutim, u slučaju tumorski promijenjenih stanica, izražavanje PKM2 se značajno povećava, dok se izražavanje tkivno specifičnih PKM1, PKL i PKR smanjuje (32).

PKM1 i PKM2 su tetramerni proteini koji se sastoje od četiri identične podjedinice. Svaka podjedinica sadrži četiri strukturne domene uključujući A, B, C i N-terminalnu domenu. Monomeri najprije dimeriziraju, a zatim se dva dimera međusobno povezuju putem dimer-dimer interakcija koje su određene C domenom monomera kako bi formirali tetramer. PKM1 i PKM2 potječu iz istog gena putem alternativnog prekrajanja primarnog transkripta mRNA. Različiti egzoni u mRNA kodiraju aminokiseline u C domeni i mijenjaju stabilnost tetramera. U fiziološkim uvjetima, PKM1 se konstitutivno organizira kao tetramer. PKM2 se nalazi u visokoaktivnom obliku tetramera i niskoaktivnom obliku dimera u zdravim tkivima. Međutim, u tumorskim stanicama, PKM2 obično postoji kao dimer s niskom katalitičkom aktivnošću (33). PKM2 se suprotstavlja Warburgovom efektu inhibirajući glikolizu i stvaranje ATP-a u tumorima. Naime, usporavanjem glikolize ovaj izoenzim omogućuje preusmjeravanje

metabolita nastalih tijekom glikolize prema drugim metaboličkim putevima za biosintezu aminokiselina, lipida i nukleotida čime nastaju molekule potrebne za podršku proliferaciji stanica, kao i reducirajući ekvivalenti poput NADPH-a (31). Prema tome, za razliku od PKM1 ili tetramernog PKM2, dimer PKM2 u tumorskim stanicama sintetizira minimalnu količinu ATP-a tijekom konverzije PEP-a u piruvat. Još uvijek nije sasvim razjašnjeno kako te stanice generiraju dovoljno energije. Literatura sugerira da kada je oksidativna fosforilacija narušena zbog disfunkcionalnih mitohondrija ili smanjene opskrbe kisikom, tumorske stanice kao glavni način proizvodnje ATP-a koriste proces zvan fosforilacija na razini supstrata u mitohondrijima (engl. *mitochondrial substrate-level phosphorylation*, mSLP). U mSLP-u sukcinat-CoA ligaza u ciklusu limunske kiseline može osigurati ATP pretvorbom sukcinil-CoA u sukcinat. Osim svoje uloge kao piruvat kinaza, PKM2 djeluje kao protein kinaza i transkripcijski koaktivator mnogih gena povezanih s rastom tumora, metastazama i staničnom smrću. Pokazano je da aktivacijom EGFR, PKM2 translocira u jezgru gdje djeluje kao protein kinaza koristeći PEP kao donator fosfata. Fosforilacijom histona H3, uklanja se HDAC3 s promotora gena za ciklin D1 i MYC što rezultira ekspresijom ovih gena, potičući progresiju staničnog ciklusa i staničnu proliferaciju (32). U uvjetima oksidativnog stresa, PKM2 se premješta u mitohondrije i fosforilira antiapoptotski protein BCL-2, čime onemogućava njegovu degradaciju. Ovaj proces inhibira indukciju apoptoze. U citosolu, PKM2 formira kompleks s MDM2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*), glavnim regulatornim proteinom proapoptotskih gena i TP53, što rezultira ubikvitinacijom TP53 i gubitkom njegove proapoptotske funkcije (34).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti mehanizme antitumorskog djelovanja kalikosina na stanične linije T24, 5637 i MB49.

Hipoteza istraživanja je da kalikodin u tumorskim staničnim linijama T24, 5637 i MB49 izaziva antitumorsko djelovanje putem indukcije apoptoze, zaustavljanja stanične proliferacije te promjene metaboličke aktivnosti stanice.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Kemikalije i priprava otopina

Tablica 1. Osnovne kemikalije

Kemikalija	Dobavljač
Akrilamid 40 %	AppliChem
Albumin iz FBS-a	Roth
APS	Sigma-Aldrich
Bromfenol plavo	Sigma-Aldrich
CH <sub>3</sub> COOH	Kemika
DMEM	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
DOC	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Fenol crveno	Sigma-Aldrich
FBS	Capricorn Scientific
Glicerol	Kemika
Glicin	Sigma-Aldrich
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kemika
Kalikosin	MedChemExpress
β-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Mlijeko u prahu	Roth
Na-azid	Kemika
NaCl	Fagron
NP-40	Sigma-Aldrich
N <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kemika
Otopina luminol i otopina vodikovog peroksida (otopina A i B)	Santa Cruz Biotechnology
Penicilin-streptomycin	Sigma-Aldrich
PonceauS	Roth
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad
2-propanol	Sigma-Aldrich
PI	Sigma-Aldrich
SDS	Roth
TBS	Roth
TEMED	Sigma-Aldrich
Tripsin-EDTA	Capricorn Scientific
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth

### **Puferi za pripremu otopina**

- 1X PBS napravljen iz 10X matične otopine (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7xH<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- RIPA pufer pH 7,5 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % DOC, 0,1 % SDS)
- 6X pufer za nanošenje proteinskih uzoraka (engl. *laemmli buffer*) (pH 6,8, 125 mM Tris-HCl, 20 % glicerol, 5,6 % SDS, 0,01 % bromfenol plavo u ddH<sub>2</sub>O, uz dodatak 5 % β-merkaptoetanol)
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za gel za sabijanje (engl. *stacking gel*), pH 6,8 (0,5 M Tris, 0,4 % SDS)
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za gel za razdvajanje (engl. *running gel*), pH 8,8 (1,5 M Tris, 0,4 % SDS)
- 1X pufer za SDS PAGE (engl. *running buffer*) pripremljen iz matične otopine 10X (250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS)
- 1X pufer za prijenos na membranu (engl. *transfer buffer*) pripremljen iz matične otopine 10X (250 mM Tris, 2 M glicin, 20 % v/v metanol)
- TBS-Tween pufer za ispiranje membrana pH 7,4 (0,05 % Tween 20 u TBS-u)
- TBS-BSA pufer za blokiranje pH 7,4 (5 % BSA, 0,1 % Na-azid, fenol crveno u sterilnom TBS-u)
- 1X TBS pufer pripremljen iz matične otopine pH 7,5 10X TBS (500 mM Tris, 1,5 M NaCl)
- 5 %-tna otopina mlijeka u prahu pripravljena u 1X TBS puferu
- PonceauS otopina (10 % v/v koncentrirana CH<sub>3</sub>COOH, 0,5 % v/v Ponceau S)

### **Priprema gela za razdvajanje**

- 8 %-tni gel: 1 ml 40 %-tne otopine akrilamida, 1,25 ml 4X Tris-HCl/SDS pufera za razdvajanje (pH 8,8, 1,5 M Tris, 0,4 % SDS), 2,75 ml autoklavirane H<sub>2</sub>O, 25 μl APS (10 %), 5 μl TEMED
- 12 %-tni gel: 1,5 ml 40 %-tne otopine akrilamida, 1,25 ml 4X Tris-HCl/SDS pufera za razdvajanje (pH 8,8, 1,5 M Tris, 0,4 % SDS), 2,25 ml autoklavirane H<sub>2</sub>O, 25 μl APS (10 %), 5 μl TEMED

### **Priprema gela za sabijanje**

- 4 %-tni gel: 0,25 ml 40 %-tne otopine akrilamida, 0,42 ml 4X Tris-HCl/SDS pufera za sabijanje (pH 6,8, 0,5 M Tris, 0,4 % SDS), 1,25 ml autoklavirane H<sub>2</sub>O, 25 µl APS (10 %), 5 µl TEMED

### **Protutijela**

- Ciklin D1 protutijelo (1:1000, Dako)
- PARP1 protutijelo (1:5000, Cell Signaling Technology)
- Cijepana kaspaza-3 protutijelo (1:1000, Cell Signaling Technology)
- PKM2 protutijelo (1:1000, Cell Signaling Technology)
- Tubulin protutijelo (1:1000, Sigma-Aldrich)
- HRP mišje protutijelo (1:5000, Dako)
- HRP zečje protutijelo (1:5000, Dako)

### **Proteazni inhibitori**

- Aprotinin, koncentracija matične otopine 10 mg/mL, 1000X (Sigma-Aldrich)
- PMSF, koncentracija matične otopine 100 mM, 200X (Roth)
- Leupeptin, koncentracija matične otopine 1 mg/mL, 1000X (Roche)
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, koncentracija matične otopine 1 M, 1000X (Sigma-Aldrich)

### **Kompleti**

- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (BioLegend, kataloški broj 640914)

### **Uredaji**

- ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad)
- BD Accuri C6 (BD Biosciences)

## Stanične linije

*In vitro* istraživanje ispitivanja mehanizama antitumorskog djelovanja izoflavona kalikosina se provelo na humanim staničnim linijama tumora mokraćnog mjehura T24 i 5637 te na mišjoj staničnoj liniji tumora mokraćnog mjehura MB49. U tablicama 2, 3 i 4 se nalaze osnovne karakteristike navedenih staničnih linija.

**Tablica 2.** Karakteristike stanične linije T24 (35,36).

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	Mokraćni mjehur
Morfologija	Epitelna
Bolest	Karcinom prijelaznih stanica
Dob	81 godina
Spol	Ženski
Etnicitet	Bijela rasa
Obilježje kulture	Adherentna
Mutirani geni	HRAS, TP53

**Tablica 3.** Karakteristike stanične linije 5637 (37,38).

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	Mokraćni mjehur
Morfologija	Epitelna
Bolest	Karcinom II stupnja
Dob	68 godina
Spol	Muški
Etnicitet	Bijela rasa
Obilježje kulture	Adherentna
Mutirani geni	MAPK1, STAT3, HRAS, TP53, RB1, ERBB2, ERBB3, JAK1

**Tablica 4.** Karakteristike stanične linije MB49 (39).

Organizam	Miš
Tkivo	Mokraćni mjehur
Morfologija	Epitelna
Bolest	Karcinom prijelaznih stanica
Spol	Muški
Obilježje kulture	Adherentna

### **3.2. Nasađivanje i tretiranje stanica**

Nakon što su bile pohranjene u tekući dušik, stanice su odmrznute i nasađene u DMEM mediju koji sadrži hranjive tvari poput glukoze, aminokiselina i minerala. Mediju je dodan 10 % FBS i penicilin ( $10^4$  U/mL) - streptomycin (10 mg/mL). Stanice su zatim kultivirane u vlažnom inkubatoru za uzgoj stanica, na temperaturi od 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>. Matične otopine kalikosina koncentracije 100 mM su pripremljene otapanjem 5 g kalikosina u 176 µL DMSO, a korištene su za pripremu tretmana različitih koncentracija. Stanice su nasađivane na ploče s 12 jažica na način da na dan tretmana postignu konfluentnost od otprilike 70 %. Na dan tretmana, stanicama je uklonjen stari medij i potom dodan novi medij s određenom koncentracijom kalikosina. Stanice T24 su tretirane koncentracijama 400 µM, 600 µM, i 800 µM tijekom 24 i 48 sati. Stanice 5637 su tretirane koncentracijama 200 µM, 400 µM, 600 µM, i 800 µM tijekom 48 sati. Stanice MB49 su tretirane koncentracijama 100 µM, 250 µM, 400 µM, 500 µM, 600 µM, 750 µM i 800 µM tijekom 48 sati. Nakon tretmana, medij je odsisan, a stanice su isprane u PBS puferu. Stanicama je zatim dodan tripsin kako bi se odvojile od podloge. Nakon toga, stanice su lizirane tijekom 20 minuta na ledu pomoću RIPA pufera i proteaznih inhibitora (aprotinin, leupeptin, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, PMSF). Stanice su potom centrifugirane u trajanju od 10 min, 12 000 g na 4 °C. Supernatant je zatim odvojen u nove epruvete, a proteini su denaturirani uz pomoć 6X Laemmli pufera. Ovaj postupak se provodi u termobloku na 95 °C tijekom 5 minuta. Konačno, uzorci su čuvani na -20 °C do nanošenja na gel.

### **3.3. Metoda *western blot***

Izrađeni su 8 %-tni i 12 %-tni akrilamidni gelovi na koje su nakon polimerizacije nanoseni uzorci i markeri. Proteini u uzorcima staničnih lizata su potom razdvojeni pomoću SDS-PAGE tijekom 70 minuta na 150 V. Nakon razdvajanja, proteini su transferirani s gela na nitroceluloznu membranu tijekom 60 minuta na 200 mA. Nakon prijenosa, membrana je obojana reverzibilnom bojom PonceauS kako bi se vizualizirali transferirani proteini. Nakon što je membrana odbojana u TBS-Tween otopini 5 minuta, tretirana je otopinom TBS-BSA na sobnoj temperaturi tijekom sat vremena kako bi se smanjila nespecifična vezivanja protutijela na membranu. Primarna protutijela su razrijeđena u otopini TBS-BSA s Na-azidom prema uputama proizvođača. Membrane su inkubirane s odgovarajućim primarnim protutijelima preko noći na 4 °C. Sljedećeg jutra, primarna protutijela su uklonjena, a membrane isprane u TBS-Tweenu tri puta tijekom 30 minuta. Sekundarna protutijela, zečje i mišje konjugirana s HRP, pripremljena su razrjeđivanjem (HRP zečje protutijelo 1:6000, HRP mišje protutijelo

1:10 000) u 5 %-tnoj otopini nemasnog mlijeka u TBS-Tweenu. Membrane su zatim inkubirane u odgovarajućem sekundarnom protutijelu tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon toga, membrane su isprane u otopini TBS-Tween tri puta tijekom 30 minuta i onda jednom u otopini TBS. Membranama je dodan luminol (otopine A i B u omjeru 1:1) u svrhu vizualizacije signala kemiluminiscencijom u uređaju ChemiDoc XRS, koristeći program ImageLab 6.0 (BioRad). Za kvantifikaciju intenziteta signala je korišten program ImageJ. Tubulin je korišten kao endogena kontrola za normalizaciju intenziteta ostalih signala.

### **3.4. Analiza apoptoze protočnom citometrijom**

U živim stanicama se fosfatidilserin nalazi s unutrašnje strane stanične membrane, ali tijekom apoptoze se prebacuje na vanjsku stranu. Aneksin V, protein koji se veže na fosfolipide, visokim afinitetom veže fosfatidilserin izložen na vanjskoj površini stanice. Aneksin V se ne može vezati za žive stanice jer ne može proći kroz staničnu membranu. Propidij jodid (PI) se veže za dvolančanu DNA interkalirajući između parova baza pri čemu fluorescira. PI ne može ući u žive stanice s netaknutim membranama, ali može ući u stanice s oštećenim membranama, poput mrtvih stanica. Na temelju dvostrukog označavanja pomoću aneksina V konjugiranog s fluorescein izotiocijanatom (FITC) i PI, moguće je putem protočne citometrije razlikovati živuće stanice (Aneksin V-/PI-), stanice u ranoj fazi apoptoze (Aneksin V+/PI-) te stanice u kasnoj fazi apoptoze (Aneksin V+/PI+) (40). Na ploču s 12 jažica su nasade MB49 stanice. Kada su stanice dosegle konfluentnost od 60-70 %, tretirane su u kvadriplikatu s koncentracijama kalikosina od 600  $\mu$ M i 800  $\mu$ M, pri čemu je DMSO korišten kao kontrola. Nakon 48 sati tretmana, stanicama je odsisan medij te su potom isprane u PBS-u, tripsinom odvojene od podloge i zatim resuspendirane dodatkom medija. Stanice su s medijem prebačene u epruvete i centrifugirane tijekom 5 min na 500 g. Supernatant je uklonjen, a stanice su resuspendirane u PBS-u i potom ponovno centrifugirane tijekom 5 min na 500 g. Nakon toga je ponovno uklonjen supernatant, a stanice su resuspendirane u PBS-u i centrifugirane još 5 minuta na 500 g. Nakon posljednjeg centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a stanice su resuspendirane u 100  $\mu$ L otopine 10 %-tnog FBS-a u PBS-u. U svaku epruvetu je potom dodano 100  $\mu$ L otopine *Annexin V Binding Buffer*, 5  $\mu$ L otopine *FITC Annexin V* i 10  $\mu$ L PI (2 ng/mL, 20X). Kontrolne skupine su bile stanice kojima je dodan samo *Annexin V Binding Buffer*, odnosno samo *Annexin V Binding Buffer* i PI, te samo *Annexin V Binding Buffer* i *FITC Annexin*. Nakon 15 minuta inkubacije na tamnom mjestu, uzorcima je dodano 400  $\mu$ L otopine

*Annexin V Binding Buffer*. Uzorci su analizirani pomoću BD Accuri C6 protočnog citometra, a rezultati su obrađeni u programu FlowLogic 8.6.

### **3.5. Analiza staničnog ciklusa protočnom citometrijom**

Na ploču s 12 jažica su nasadene MB49 stanice. Kada su stanice dosegle konfluentnost od 60-70 %, tretirane su u kvadrplikatu s koncentracijama kalikosina od 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$ , pri čemu je DMSO korišten kao kontrola. Nakon 48 sati tretmana, stanicama je odsisan medij te su potom isprane u PBS-u, tripsinom odvojene od podloge i zatim resuspendirane dodatkom medija. Stanice su s medijem prebačene u epruvete i centrifugirane tijekom 5 min na 500 g. Supernatant je uklonjen, a stanice su resuspendirane u PBS-u i potom ponovno centrifugirane tijekom 5 min na 500 g. Nakon toga je ponovno uklonjen supernatant, a stanice su resuspendirane u PBS-u i centrifugirane još 5 minuta na 500 g. Nakon posljednjeg centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a stanice su resuspendirane u 50  $\mu\text{L}$  otopine 10 %-tnog FBS-a u PBS-u. Stanice su potom fiksirane dodatkom 1 mL hladnog 70 %-tnog etanola. Uzorci su pohranjeni na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 2 sata. Stanice su zatim centrifugirane tijekom 5 min na 500 g, etanol je uklonjen te su dva puta isprane u PBS-u. Stanicama je dodan propidij jodid (2 ng/mL, 20X) i PBS. Uzorci su analizirani pomoću BD Accuri C6 protočnog citometra, a rezultati su obrađeni u programu FlowLogic 8.6. Stanični ciklus je analiziran pomoću Watson improved modela.

### **3.6. Statistička analiza**

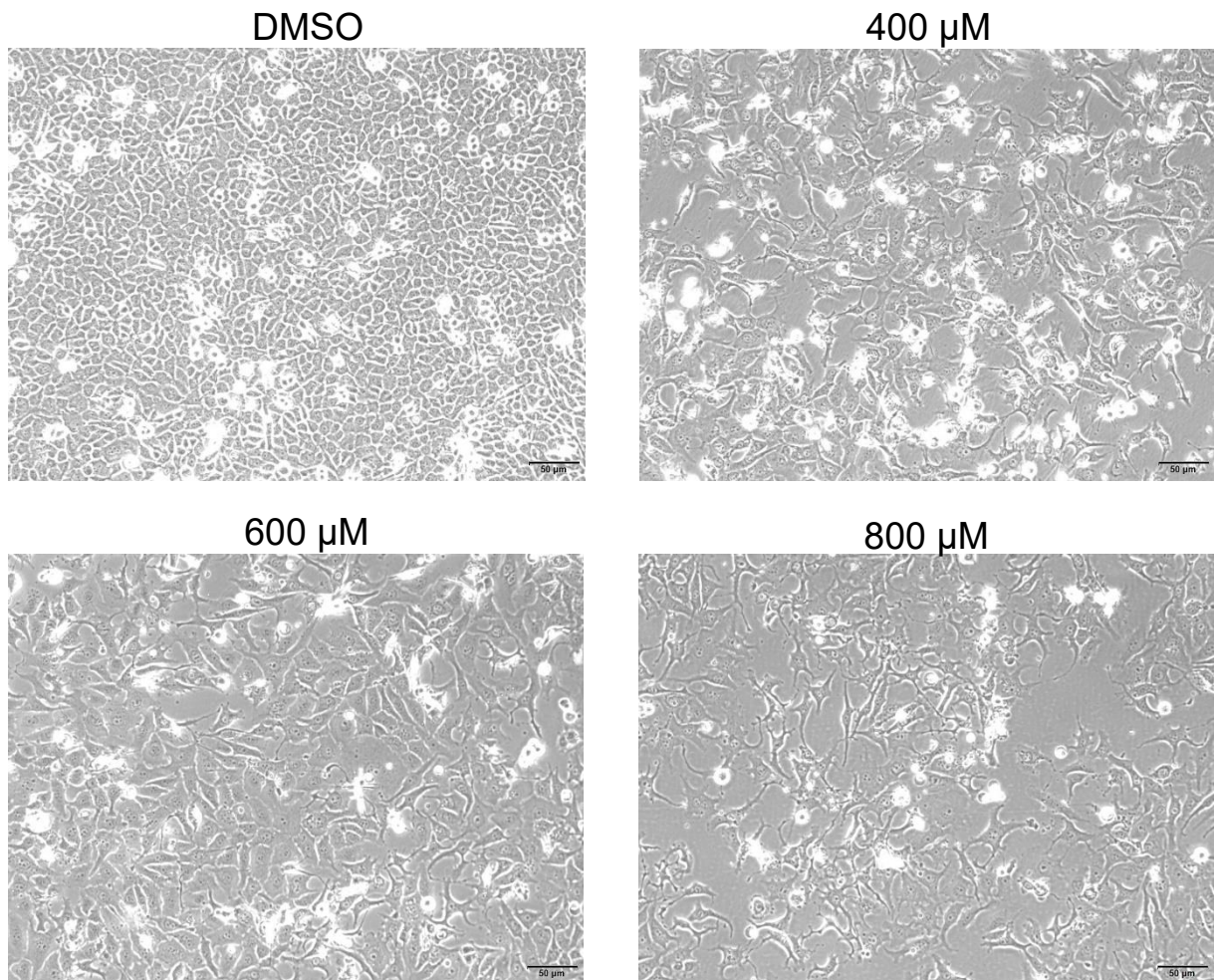
Statistička obrada podataka je provedena koristeći računalni program GraphPad Prism 10. Normalnost razdiobe uzoraka provjerena je Shapiro-Wilk testom. Rezultati staničnog ciklusa i apoptoze analizirani su metodom dvosmjerne analize varijance (2-way ANOVA), uz post hoc analizu prema Tukeyjevom testu. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistički značajna vrijednost  $P$  uzeta je kao  $P < 0.05$ , a sve vrijednosti  $P$  prikazane su na odgovarajućim grafovima.



## **4. REZULTATI**

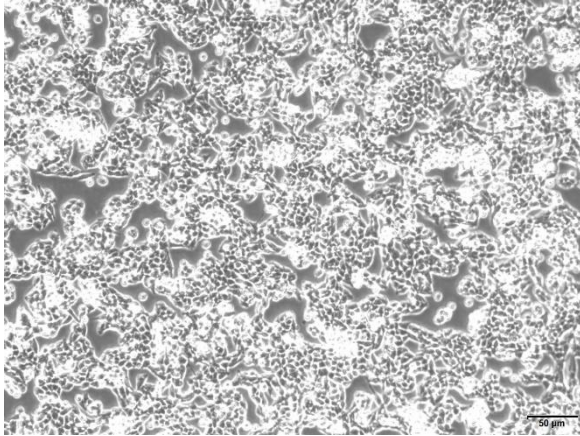
#### 4.1. Citotoksični učinak kalikosina na stanice tumora mokraćnog mjehura

Stanice T24, MB49 i 5637 su tretirane koncentracijama kalikosina 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$ . Kontrolna skupina tretirana je s DMSO. Nakon 48 sati izloženosti djelovanju kalikosina, tretirane stanice su pokazale reducirani rast u usporedbi s netretiranim, te su imale promijenjen izgled, što se može uočiti na slikama 6-8.

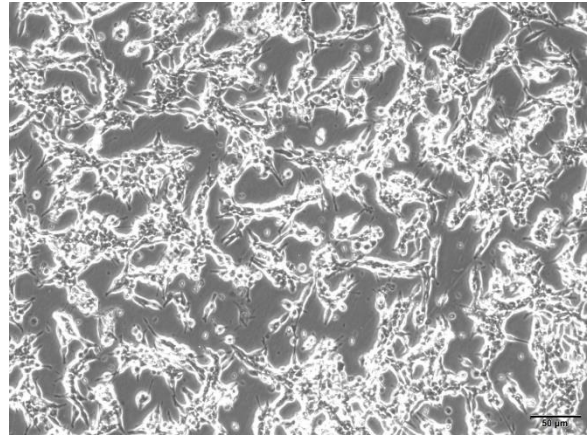


**Slika 6.** Djelovanje kalikosina na stanice T24. Stanice su tretirane koncentracijama kalikosina 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$  tijekom 48 sati. Kontrolna skupina su stanice tretirane DMSO.

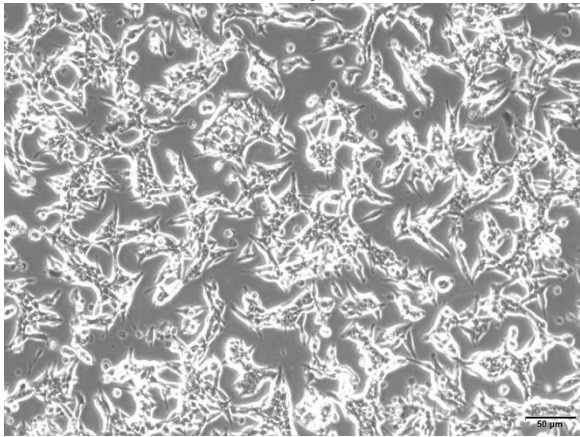
DMSO



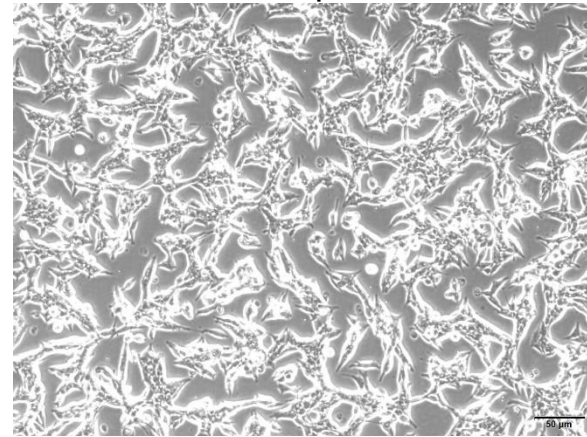
400 μM



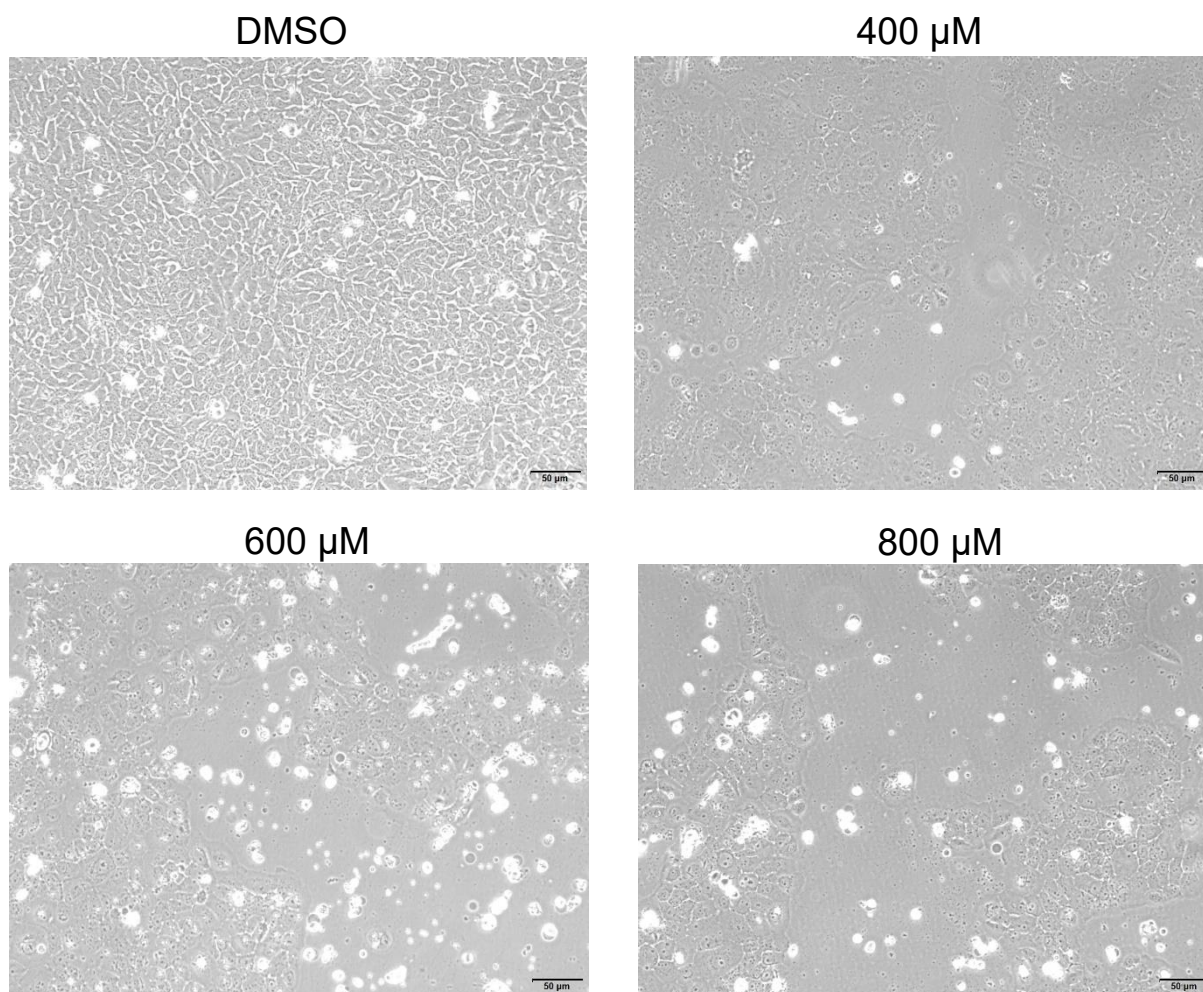
600 μM



800 μM



**Slika 7.** Djelovanje kalikosina na stanice MB49. Stanice su tretirane koncentracijama kalikosina 400 μM, 600 μM, 800 μM tijekom 48 sati. Kontrolna skupina su stanice tretirane DMSO.



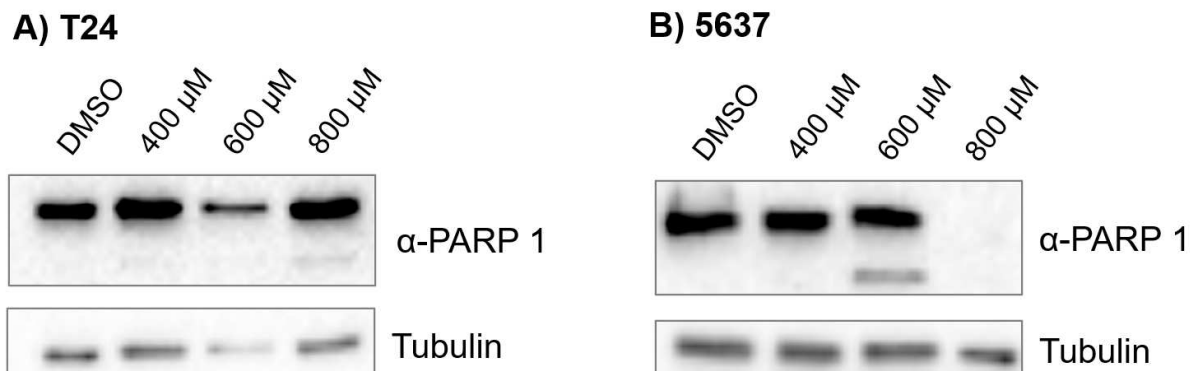
**Slika 8.** Djelovanje kalikosina na stanice 5637. Stanice su tretirane koncentracijama kalikosina 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$  tijekom 48 sati. Kontrolna skupina su stanice tretirane DMSO.

## 4.2. Kalikosin inducira apoptozu stanica tumora mokraćnog mjehura

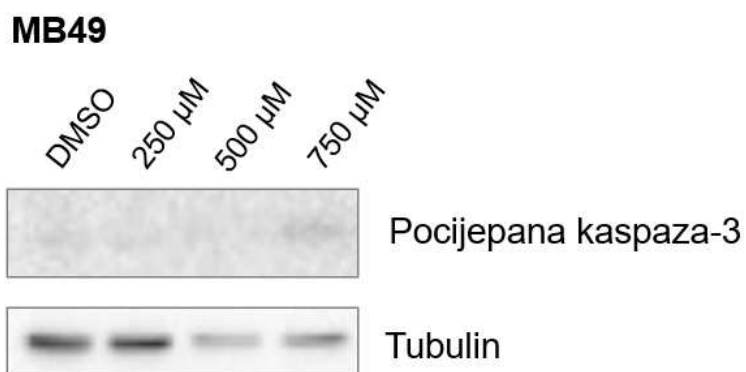
### 4.2.1. Western blot

Stanice T24, 5637 i MB49 su tretirane različitim koncentracijama kalikosina (T24 i 5637 – 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$ , MB49 – 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$ ) tijekom 48 sati. Kontrolna skupina tretirana je s DMSO. Nakon tretmana, provedena je analiza ekspresije proteina u stanicama. Stanice su lizirane, a proteini su razdvojeni SDS-PAGE metodom te detektirani *western blot* metodom. Utvrđeno je prisustvo fragmentiranog proteina PARP1 u staničnim linijama T24 i 5637. U stanicama 5637 pocijepana podjedinica je detektirana pri nižoj koncentraciji kalikosina 600  $\mu\text{M}$ , u usporedbi sa stanicama T24, gdje je detektirana pri 800  $\mu\text{M}$ . U staničnoj liniji 5637 dolazi do gubitka ekspresije proteina PARP1 pri koncentraciji 800  $\mu\text{M}$  kalikosina (slika 9).

U stanicama MB49 je utvrđeno prisustvo pocijepane kaspaze-3 pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  kalikosina (slika 10).



**Slika 9.** Indukcija apoptoze u staničnim linijama T24 (A) i 5637 (B). Analiza ekspresije pocijepanog proteina PARP1 metodom *western blot*, u stanicama T24 i 5637 nakon 48 sati tretmana 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  kalikosinom. Kontrolna skupina su stanice tretirane s DMSO. Intenzitet signala je normaliziran u odnosu na signal tubulina.



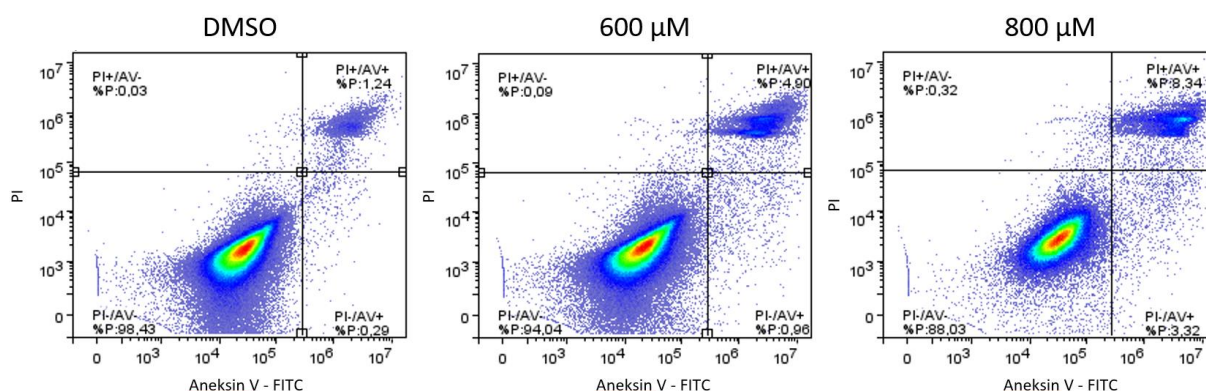
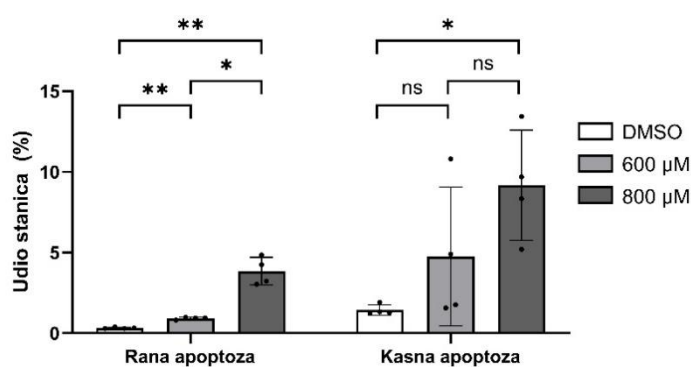
**Slika 10.** Indukcija apoptoze u staničnoj liniji MB49. Analiza ekspresije pocijepanog proteina kaspaze-3 metodom *western blot* u stanicama MB49 nakon 48 sati tretmana 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  i 750  $\mu\text{M}$  kalikosinom. Kontrolna skupina su stanice tretirane s DMSO. Intenzitet signala je normaliziran u odnosu na signal tubulina.

#### 4.2.2. Protočna citometrija

Stanice MB49 su tretirane koncentracijama kalikosina 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  tijekom 48 sati, dok je kontrolna skupina tretirana s DMSO. Nakon tretmana, stanice su označene s aneksin V-FITC i PI te analizirane protočnom citometrijom. Aneksin V detektira fosfatidilserin, fosfolipid koji se tijekom rane apoptoze premješta na vanjsku stranu stanične membrane, dok PI prodire unutar stanica kada je membrana oštećena, što je karakteristično za kasnu apoptozu.

Rezultati protočne citometrije prikazani su u obliku točkastog dijagrama, gdje su stanice kategorizirane prema prisutnosti ili odsutnosti aneksin V i PI bojenja. U kontrolnoj skupini tretiranoj s DMSO je 0,32 % stanica bilo u ranoj apoptozi, a 1,44 % u kasnoj apoptozi. U uzorcima tretiranim sa 600  $\mu\text{M}$  kalikosina, postotak stanica u ranoj apoptozi se povećao na 0,93 % i u kasnoj apoptozi na 4,76 %. U uzorcima tretiranim s 800  $\mu\text{M}$  kalikosina, postotak stanica u ranoj apoptozi je dodatno porastao na 3,85 %, a u kasnoj apoptozi na 9,17 % (slika 11A, tablica 5). Udio stanica u ranoj i kasnoj apoptozi u kontrolnoj skupini (DMSO) te nakon tretmana kalikosinom (600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$ ) prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

Frekvencijski dijagram prikazuje udio apoptotskih stanica u ranoj i kasnoj apoptozi u odnosu na ukupni broj stanica. Rezultati statističke analize pokazuju da je tretman sa 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  kalikosinom značajno povećao broj stanica u ranoj apoptozi u usporedbi s DMSO kontrolom (\*\*  $P < 0,01$ ). U kasnoj apoptozi, tretman s 800  $\mu\text{M}$  kalikosinom također je pokazao značajno povećanje (\*  $P < 0,05$ ) u odnosu na DMSO kontrolu, dok tretman sa 600  $\mu\text{M}$  nije pokazao statistički značajnu promjenu. Razlika između tretmana sa 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  kalikosinom je u ranoj apoptozi bila statistički značajna (\*  $P < 0,05$ ), dok u kasnoj apoptozi nije bila statistički značajna (slika 11B).

**A)****B)**

**Slika 11. (A)** Točkasti dijagram analize stanica u apoptozi. Prikazan je udio apoptotskih stanica MB49 nakon tretmana s kalikosinom (600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$ ) tijekom 48 sati, u usporedbi s kontrolnom skupinom (DMSO). U svakom dijagramu, donji lijevi kvadrant (PI-/AV-) predstavlja žive stanice koje nisu u apoptozi. Donji desni kvadrant (PI-/AV+) sadrži stanice u ranoj apoptozi, a gornji desni kvadrant (PI+/AV+) prikazuje stanice u kasnoj apoptozi. **(B)** Frekvencijski dijagram analize stanica u apoptozi. Prikazan je udio stanica (%) u ranoj i kasnoj apoptozi u odnosu na ukupni broj stanica u kontrolnoj skupini (DMSO) te u skupinama tretiranim sa 600 i 800  $\mu\text{M}$  kalikosina. Statistička obrada podataka provedena je korištenjem softvera GraphPad Prism 10, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n=4$ ). Statistička značajnost prikazana je zvjezdicama ( $P < 0,05$  označeno \*;  $P < 0,01$  označeno \*\*), dok oznaka ns označava statistički neznačajnu razliku.

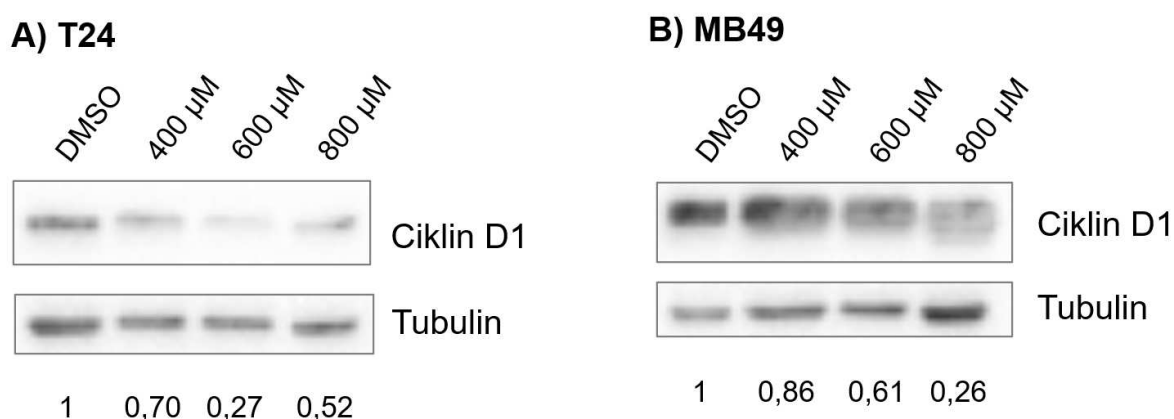
**Tablica 5.** Udio apoptotskih stanica u ranoj i kasnoj apoptozi tretmana s kalikosinom (600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$ ) tijekom 48 sati i u kontrolnoj skupini (DMSO). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 4).

	DMSO		600 $\mu\text{M}$		800 $\mu\text{M}$	
	rana	kasna	rana	kasna	rana	kasna
<b>Srednja vrijednost (%)</b>	0,325	1,443	0,9276	4,76	3,85	9,17
<b>Standardna devijacija</b>	0,04509	0,3205	0,07455	4,306	0,8588	3,418

### 4.3. Kalikosin zaustavlja proliferaciju stanica tumora mokraćnog mjehura

#### 4.3.1. Western blot

Stanice T24 i MB49 su tretirane koncentracijama kalikosina od 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  tijekom 48 sati. Nakon toga, provedena je analiza ekspresije proteina u stanicama. Stanice su lizirane, a proteini su razdvojeni SDS-PAGE metodom te detektirani *western blot* metodom. Analizirana je ekspresija proteina ciklin D1. S porastom koncentracije kalikosina, u obje stanične linije dolazi do smanjenja ekspresije proteina ciklin D1 već pri koncentraciji 400  $\mu\text{M}$  (slika 11).



**Slika 12.** Zaustavljanje staničnog ciklusa u staničnim linijama T24 (A) i MB49 (B). Analiza ekspresije proteina ciklina D1 metodom *western blot*, u stanicama T24 i MB49 nakon 48 sati tretmana 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  kalikosinom. Kontrolna skupina su stanice tretirane s DMSO. Program ImageJ je korišten za kvantifikaciju intenziteta signala ciklin D1. Intenzitet signala je normaliziran u odnosu na signal tubulina.



### 4.3.2. Protočna citometrija

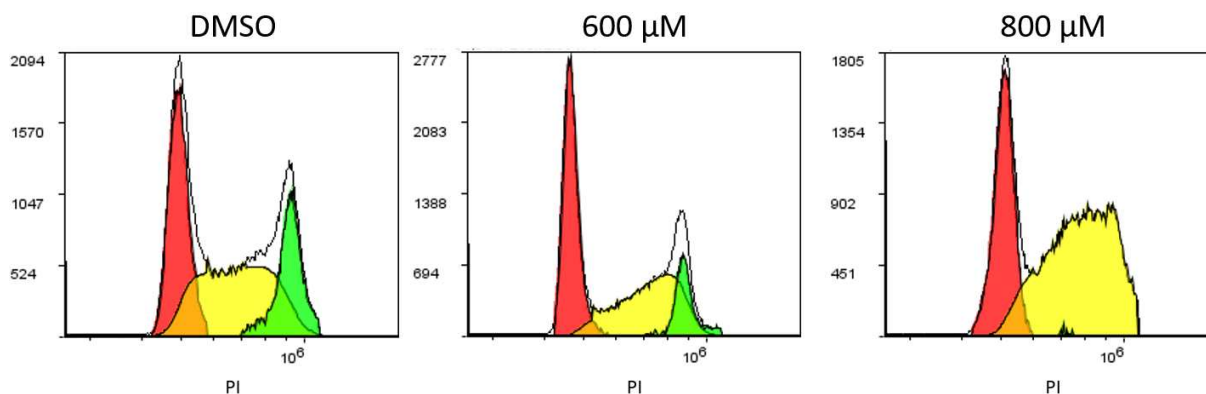
Stanice MB49 su tretirane s koncentracijama kalikosina 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  tijekom 48 sati, dok je kontrolna skupina tretirana s DMSO. Nakon tretmana, stanice su fiksirane s etanolom, označene s propidijevim jodidom te analizirane protočnom citometrijom.

Rezultati protočne citometrije prikazani su histogramima koji prikazuju raspodjelu stanica unutar pojedinih faza staničnog ciklusa, ovisno o intenzitetu fluorescencije propidij jodida. U kontrolnoj skupini tretiranoj s DMSO, 26,23 % stanica se nalazilo u G0/G1 fazi staničnog ciklusa, 44,3 % stanica u S fazi, te 11,84 % stanica u G2/M fazi. Tretman sa 600  $\mu\text{M}$  kalikosina uzrokovao je značajno povećanje udjela stanica u G0/G1 fazi (42,74 %) te smanjenje udjela stanica u S fazi (39,36 %) i G2/M fazi (4,93 %) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Kod tretmana s 800  $\mu\text{M}$  kalikosina, primijećeno je također povećanje udjela stanica u G0/G1 fazi (30,95 %), ali i značajno povećanje udjela stanica u S fazi (62,94 %), dok je udio stanica u G2/M fazi bio vrlo nizak (0,01 %) u usporedbi s kontrolom (slika 13A, tablica 6). Podaci o udjelu stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

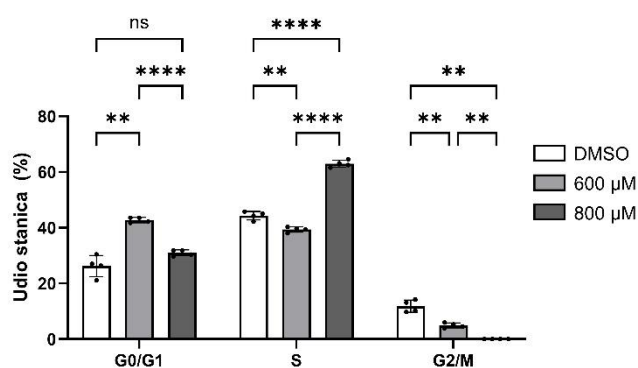
Frekvencijski dijagram prikazuje udio stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa (G0/G1, S i G2/M) u odnosu na ukupni broj stanica. Rezultati statističke analize pokazuju da tretman sa 600  $\mu\text{M}$  kalikosina značajno povećava udio stanica u G0/G1 fazi u usporedbi s DMSO kontrolom (\*\*  $P < 0,01$ ). S druge strane, tretman s 800  $\mu\text{M}$  kalikosina nije pokazao statistički značajnu promjenu u G0/G1 fazi u usporedbi s DMSO kontrolom (ns). Ovo sugerira da pri nižim koncentracijama kalikosina (600  $\mu\text{M}$ ) dolazi do zadržavanja stanica u G0/G1 fazi, dok se pri višim koncentracijama (800  $\mu\text{M}$ ) efekt smanjuje, vjerojatno zbog akumulacije stanica u S fazi. Razlika između tretmana sa 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  je statistički značajna (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ ). U S fazi, tretmani sa 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  kalikosina rezultirali su značajnim smanjenjem (\*\*  $P < 0,01$ ), odnosno povećanjem (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ ) udjela stanica u usporedbi s DMSO kontrolom. Smanjenje udjela stanica u S fazi pri tretmanu sa 600  $\mu\text{M}$  kalikosina može ukazivati na blokadu u prethodnoj (G0/G1) fazi, čime je spriječen prijelaz stanica u S fazu. Nasuprot tome, povećanje udjela stanica u S fazi pri tretmanu s 800  $\mu\text{M}$  kalikosina sugerira da viša koncentracija uzrokuje akumulaciju stanica u S fazi, inhibirajući daljnji napredak kroz stanični ciklus. Razlika između tretmana sa 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  kalikosina u ovoj fazi također je statistički značajna (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ ). U G2/M fazi primijećeno je značajno smanjenje udjela stanica pri tretmanu s obje

koncentracije kalikosina (\*\*  $P < 0,01$ ), što ukazuje na inhibiciju prelaska u G2/M fazu (slika 13B).

**A)**



**B)**



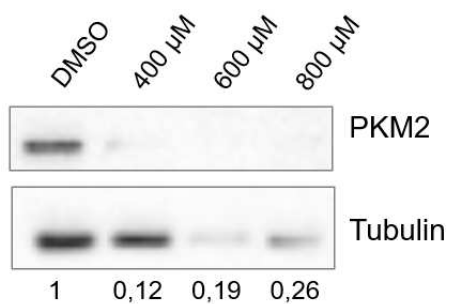
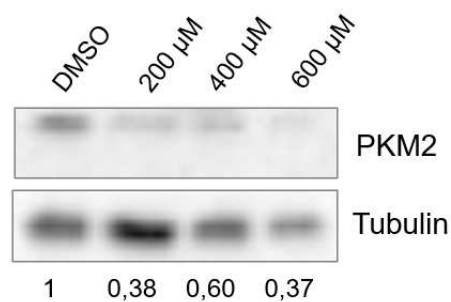
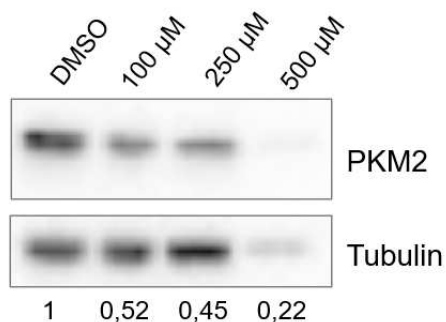
**Slika 13.** (A) Histogrami analize staničnog ciklusa stanica. Prikazan je udio stanica MB49 nakon tretmana s kalikosinom (600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$ ) tijekom 48 sati, u usporedbi s kontrolnom skupinom (DMSO). Raspodjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa prikazana je crvenom (G0/G1 faza), žutom (S faza) i zelenom bojom (G2/M faza), ovisno o intenzitetu fluorescencije PI, koji se veže na DNA proporcionalno njenoj količini. (B) Stupčasti dijagram prikazuje udio stanica (%) u G0/G1, S i G2/M fazi u kontrolnoj skupini (DMSO) te u skupinama tretiranim sa 600 i 800  $\mu\text{M}$  kalikosina. Statistička obrada podataka provedena je korištenjem softvera GraphPad Prism 10, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). Statistička značajnost prikazana je zvjezdicama ( $P < 0,01$  označeno \*\*;  $P < 0,0001$  označeno \*\*\*\*), dok oznaka ns označava statistički neznačajnu razliku između uspoređivanih skupina.

**Tablica 6.** Udio stanica u G0/G1, S i G2/M fazama staničnog ciklusa nakon tretmana s kalikosinom (600  $\mu$ M i 800  $\mu$ M) tijekom 48 sati i u kontrolnoj skupini (DMSO). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 4).

	DMSO			600 $\mu$ M			800 $\mu$ M		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
<b>Srednja vrijednost (%)</b>	26,23	44,3	11,84	42,74	39,36	4,933	30,95	62,94	0,01
<b>Standardna devijacija</b>	3,832	1,516	2,192	0,973	0,9584	0,8832	1,075	1,265	0,02

#### 4.4. Kalikosin mijenja metaboličku aktivnost stanica tumora mokraćnog mjehura

Stanice T24, 5637 i MB49 su tretirane različitim koncentracijama kalikosina (T24 – 400  $\mu$ M, 600  $\mu$ M, 800  $\mu$ M, 5637 – 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 600  $\mu$ M, MB49 – 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M) tijekom 48 sati. Nakon toga, provedena je analiza ekspresije proteina u stanicama. Stanice su lizirane, a proteini su razdvojeni SDS-PAGE metodom te detektirani *western blot* metodom. Analizirana je ekspresija proteina PKM2. S porastom koncentracije kalikosina, u svim staničnim linijama dolazi do smanjenja ekspresije proteina PKM2 ( T24 već pri 400  $\mu$ M, 5637 već pri 200  $\mu$ M, MB49 već pri 100  $\mu$ M) (slika 12).

**A) T24****B) 5637****C) MB49**

**Slika 16.** Promjena metaboličke aktivnosti u staničnim linijama T24 (A), 5637 (B) i MB49 (C). Analiza ekspresije proteina PKM2 metodom *western blot*, nakon 48 sati tretmana kalikosinom u stanicama T24 (400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$ ), 5637 (200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ ), i MB49 (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ ). Kontrolna skupina su stanice tretirane s DMSO. Program ImageJ je korišten za kvantifikaciju intenziteta signala PKM2. Intenzitet signala je normaliziran u odnosu na signal tubulina.

## **5. RASPRAVA**

Tumor mokraćnog mjehura predstavlja značajan klinički izazov zbog visokih stopa recidiva i progresije te ograničenja trenutnih terapijskih opcija. Naime, do 80 % slučajeva nemišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura ponovno se javlja nakon liječenja, a približno 50 % tih pacijenata napreduje do mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura (41). Transuretralna resekcija mokraćnog mjehura, iako standardna metoda za liječenje nemišićno-invazivnog karcinoma, ima ograničenja jer značajan broj pacijenata (50-70 %) razvija recidiv nakon zahvata, što zahtijeva ponovljene postupke i dodatne terapije. Iako se intravezikalna terapija *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) smatra jednim od najuspješnijih tretmana za smanjenje rizika od recidiva, kod gotovo polovice pacijenata terapija ne uspijeva. Radikalna cistektomija postaje terapija izbora kada intravezikalne terapije nisu učinkovite. Zahvat uključuje uklanjanje mokraćnog mjehura, okolnih organa (npr. prostate i sjemenih mjehurića kod muškaraca, te dijela ženskih reproduktivnih organa) i regionalnih limfnih čvorova. Iako je zahvat učinkovit u uklanjanju invazivnog tumora, povezan je s visokim stopama komplikacija koje se procjenjuju između 30 % i 70 %, te značajno smanjuje kvalitetu života pacijenata (42). S obzirom na neadekvatne odgovore na postojeće terapije i zdravstvene rizike, postoji potreba za istraživanjem novih, manje invazivnih terapijskih pristupa koji bi smanjili potrebu za radikalnom cistektomijom i ponudili pacijentima bolje ishode liječenja. Novi pristupi uključuju kombinaciju imunoterapije i ciljane terapije, te napredne intravezikalne sustave (43). Istraživanje novih terapijskih opcija potrebno je kako bi se preciznije usmjerile na specifične molekularne karakteristike tumora.

Kalikosin, fitoestrogen iz skupine izoflavona, prepoznat je zbog svojih antitumorskih, protuupalnih, antioksidativnih i imunomodulacijskih svojstava. Brojna istraživanja ukazuju na njegov potencijal u liječenju različitih vrsta karcinoma, zahvaljujući sposobnosti inhibicije proliferacije tumorskih stanica, indukcije apoptoze, te regulacije staničnog ciklusa i metastaza putem modulacije signalnih putova i regulacije proteina (11). Iako učinak kalikosina na stanice tumora mokraćnog mjehura do sada nije ispitan, izoflavon formononetin, koji je također izoliran iz biljke *Astragalus membranaceus*, pokazao je antiproliferativne i proapoptotske učinke na T24 tumorsku staničnu liniju. Strukturno, formononetin i kalikosin se razlikuju samo po prisutnosti dodatne hidroksilne skupine na položaju C3' kod kalikosina, dok formononetin ima metoksi grupu na položaju C7 (44). Općenito, u kontekstu tumora mokraćnog mjehura, izoflavoni su pokazali učinak na smanjenje invazivnosti tumorskih stanica, zaustavljanje staničnog ciklusa i induciranje apoptoze (45). Također, epidemiološke studije sugeriraju da

povećani unos izoflavona putem prehrane može biti povezan s manjim rizikom od razvoja tumora mokraćnog mjehura (46).

Različite stanične linije tumora mokraćnog mjehura (T24, 5637 i MB49) pokazuju različitu osjetljivost na tretman kalikosinom, što se može pripisati genetskim i epigenetskim razlikama među njima. Naime, svaka linija posjeduje specifične mutacije u onkogenima i tumorsupresorskim genima koje određuju njihovu osjetljivost na antitumorske agense. Nadalje, razlike u ekspresiji ciljnih proteina uključenih u regulaciju stanične smrti, staničnog metabolizma i staničnog ciklusa također doprinose varijacijama u odgovoru na tretman. Osim toga, signalni putevi mogu biti drugačije regulirani u različitim linijama, što utječe na procese apoptoze, metabolizma i staničnog ciklusa. Mišja linija MB49 ima manje mutacija u ključnim onkogenima i tumorsupresorskim genima u usporedbi s ljudskim staničnim linijama, što može objasniti veću osjetljivost na tretman kalikosinom.

Općenito, u ovom radu su korištene veće koncentracije kalikosina kako bi se inducirala apoptoza i zaustavio stanični ciklus u usporedbi s istraživanjima provedenima na drugim tumorskim staničnim linijama. Vjerojatan razlog navedenog može biti problem kristalizacije kalikosina u DMEM mediju tijekom tretiranja stanica, što smanjuje dostupnost aktivne koncentracije spoja unutar stanica.

Brojna dosadašnja istraživanja dokazuju da kalikosin inducira apoptozu u mnogim različitim vrstama karcinoma. U istraživanjima su korištene koncentracije kalikosina između 25 i 100  $\mu\text{M}$ , pri čemu je apoptoza detektirana povećanjem ekspresije podjedinica cijepane kaspaze-3 i PARP1, te povećanjem omjera Bax/Bcl-2. Aktivacija apoptoze ovisila je o različitim signalnim putevima poput PI3K/Akt/mTOR, Sestrin2/AMPK/mTOR i unutarnjeg mitohondrijskog puta, čime se potvrđuje široki antitumorski potencijal kalikosina (47–51).

U skladu s prethodnim istraživanjima, kalikosin je dosljedno pokazao sposobnost induciranja apoptoze stanica tumora mokraćnog mjehura (T24, 5637 i MB49) ovisno o primijenjenoj koncentraciji i staničnoj liniji. Cijepana podjedinica PARP1 je zabilježena u T24 stanicama pri koncentraciji od 800  $\mu\text{M}$ , dok je u 5637 stanicama zabilježena pri nižoj koncentraciji od 600  $\mu\text{M}$ . Također, cijepana kaspaza-3 je zabilježena u MB49 stanicama pri koncentraciji od 500  $\mu\text{M}$ , što sugerira različitu osjetljivost staničnih linija na tretman kalikosinom. Analiza protočnom citometrijom dodatno potvrđuje da je tretman kalikosinom pri 600  $\mu\text{M}$  i 800  $\mu\text{M}$  značajno povećao udio stanica u ranoj apoptozi u usporedbi s DMSO kontrolom, dok je u kasnoj

apoptozi značajno povećanje zabilježeno samo pri koncentraciji od 800  $\mu\text{M}$ . Nedostatak statistički značajnih razlika između tretmana različitim koncentracijama ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se postigla pouzdanost eksperimentalnih rezultata te istražili uzroci ove varijabilnosti u rezultatima.

U literaturi je poznato da kalikosin uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi stanica hepatocelularnog karcinoma pri koncentraciji od 246  $\mu\text{M}$  (52). Nadalje, pokazano je da pri koncentracijama između 50  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$  kalikosin smanjuje razinu ekspresije proteina ciklina D1 u stanicama raka pluća rezistentnim na gemcitabin (53). Uz to, u stanicama raka želuca kalikosin inducira zaustavljanje ciklusa u G0/G1 fazi pri koncentraciji od 47  $\mu\text{M}$  putem smanjenja ekspresije ciklina D1 (54). U skladu s dosadašnjim saznanjima, primjena kalikosina rezultirala je smanjenjem ekspresije ciklina D1 u staničnim linijama T24 i MB49. Rezultati analize protočnom citometrijom su pokazali da primjena kalikosina u koncentraciji od 600  $\mu\text{M}$  uzrokuje zadržavanje stanica MB49 u G0/G1 fazi, dok je primjena veće koncentracije (800  $\mu\text{M}$ ) rezultirala akumulacijom stanica u S fazi. Razlike u odgovoru MB49 stanica na ove dvije koncentracije kalikosina se možda mogu pripisati složenim promjenama u regulaciji staničnog ciklusa, te indukciji apoptoze putem mitohondrijskog puta pri višim koncentracijama, što zahtijeva daljnja istraživanja kako bi se utvrdili precizni mehanizmi djelovanja kalikosina na stanični ciklus stanica MB49.

Primjena kalikosina dovela je do smanjenja ekspresije PKM2 u sve tri stanične linije tumora mokraćnog mjehura, uključujući 5637, T24 i MB49. U literaturi je prethodno dokazano kako PKM2 nije nužan za inicijaciju tumora mokraćnog mjehura, ali je ključan za rast i održavanje tumora, osobito u stanicama koje nose mutirani HRAS (engl. *harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*). Mutirani HRAS, koji je prisutan u stanicama T24 i 5637, potiče glikolizu i aktivira PKM2, čime omogućava tumorskim stanicama preživljavanje i proliferaciju unatoč stresu i nedostatku hranjivih tvari. Odsutnost PKM2 u takvim tumorskim modelima mokraćnog mjehura rezultira smanjenjem rasta tumora, čime se potvrđuje njegova uloga u metaboličkom reprogramiranju koji podržava maligni fenotip stanica. Nadalje, dokazano je da PKM2 stupa u interakciju sa STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) te omogućuje njegovu nuklearnu translokaciju i aktivaciju transkripcije gena uključenih u preživljavanje stanica i angiogenezu, uključujući HIF1a (engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*) i VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) (55). Interakcije dobivene putem molekuskog modeliranja (engl. *molecular docking*) sugeriraju da kalikosin može djelovati kao



specifičan inhibitor PKM2 putem destabilizacije njegove strukture ili sprječavanjem njegove interakcije sa signalnim molekulama kao što su HIF1a i STAT3. Ova inhibicija dovodi do smanjenja preživljavanja tumorskih stanica želuca, inhibicije glikolize i ograničavanja tumorske progresije (56). Na temelju ovih nalaza, može se pretpostaviti da kalikosin inhibira ekspresiju PKM2 i sprječava njegovu interakciju s molekulama koje podržavaju preživljavanje tumorskih stanica mokraćnog mjehura, čime se smanjuje angiogeneza i progresija tumora. Međutim, daljnja istraživanja su potrebna kako bi se te utvrdili specifični mehanizmi njegove interakcije s PKM2 i signalnim putovima u tumorskim modelima mokraćnog mjehura.

Ovi rezultati ističu kalikosin kao potencijalno terapijsko sredstvo u liječenju tumora mokraćnog mjehura. Međutim, daljnja istraživanja su nužna kako bi se detaljno razjasnili molekularni mehanizmi njegova djelovanja i potvrdila njegova klinička primjena.

## **6. ZAKLJUČCI**

Kalikosin inducira apoptozu u tumorskim staničnim linijama T24 pri koncentraciji od 800  $\mu\text{M}$ , 5637 pri koncentraciji od 600  $\mu\text{M}$  i MB49 pri koncentraciji od 500  $\mu\text{M}$ .

Kalikosin zaustavlja stanični ciklus u tumorskim staničnim linijama T24 i MB49 pri koncentraciji od 400  $\mu\text{M}$ .

Kalikosin mijenja metabolički profil u tumorskim staničnim linijama T24 pri koncentraciji od 400  $\mu\text{M}$ , 5637 pri koncentraciji od 200  $\mu\text{M}$  i MB49 pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$ .

Kalikosin pokazuje potencijal kao terapijsko sredstvo u liječenju tumora mokraćnog mjehura.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2024 Oct 22]. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/en>
3. Jubber I, Ong S, Bukavina L, Black PC, Compérat E, Kamat AM, i sur. Epidemiology of Bladder Cancer in 2023: A Systematic Review of Risk Factors. *Eur Urol.* 2023;84(2):176–90.
4. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):106–19.
5. van Hoogstraten LMC, Vrieling A, van der Heijden AG, Kogevinas M, Richters A, Kiemeneij LA. Global trends in the epidemiology of bladder cancer: challenges for public health and clinical practice. *Nat Rev Clin Oncol.* 2023;20(5):287–304.
6. Minoli M, Kiener M, Thalmann GN, Julio MK De, Seiler R. Evolution of Urothelial Bladder Cancer in the Context of Molecular Classifications. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):1–25.
7. Jazvić M, Ružić B, Krušlin B, Šitum M, Pisac VP, Omrčen T, i sur. Clinical recommendations for diagnosis, treatment and monitoring of patients with bladder cancer. *Lijec Vjesn.* 2019;141(11):326–35.
8. Ward Grados DF, Ahmadi H, Griffith TS, Warlick CA. Immunotherapy for Bladder Cancer: Latest Advances and Ongoing Clinical Trials. *Immunol Invest.* 2022;51(8):2226–51.
9. Calycosin | C16H12O5 | CID 5280448 - PubChem [Internet]. [cited 2024 Oct 22]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calycosin>
10. Wang P, Wang Z, Zhang Z, Cao H, Kong L, Ma W, i sur. A review of the botany, phytochemistry, traditional uses, pharmacology, toxicology, and quality control of the *Astragalus memranaceus*. *Front Pharmacol.* 2023;14:1242318.
11. Sohel M, Zahra Shova FT, shuvo S, Mahjabin T, Mojnu Mia M, Halder D, i sur. Unveiling the potential anti-cancer activity of calycosin against multivarious cancers with molecular insights: A promising frontier in cancer research. *Cancer Med.* 2024;13(3).

12. Deng M, Chen H, Long J, Song J, Xie L, Li X. Calycosin: a Review of its Pharmacological Effects and Application Prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021;19(7):911–25.
13. Gong G, Zheng Y, Yang Y, Sui Y, Wen Z. Pharmaceutical Values of Calycosin: One Type of Flavonoid Isolated from Astragalus. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021;2021:9952578.
14. Žlender V. Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2003;54(4):267–74.
15. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol.* 2016;37(7):8471–86.
16. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
17. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer Mechanism, Target, and Therapeutics.* 4. izdanje. Oxford: Oxford University Press; 2016. str. 109-77
18. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25(34):4798–811.
19. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-Da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, i sur. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17).
20. Kashyap D, Garg VK, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2021;125:73–120.
21. Li R, Luo R, Luo Y, Hou Y, Wang J, Zhang Q, i sur. Biological function, mediate cell death pathway and their potential regulated mechanisms for post-mortem muscle tenderization of PARP1: A review. *Front Nutr.* 2022;9.
22. Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, i sur. The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2021;296.
23. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):99–104.
24. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol.* 2022;221(6).

25. Wang Z. Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2022;2579:3–23.
26. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, i sur. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6).
27. Mullany LK, White P, Hanse EA, Nelsen CJ, Goggin MM, Mullany JE, i sur. Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle.* 2008;7(14):2215–24.
28. Ray S. *The Cell: A Molecular Approach.* Yale J Biol Med. 2014;87(4):603.
29. Murray RK, Granner DK, Davis JC, Mayes PA, Rodwell VW, York N, i sur. *Harper's Illustrated Biochemistry.* 26. izdanje. New York: McGraw-Hill; 2003. str. 80
30. Harvey R, Ferrier D, Harvey RA, Ferrier DR. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry.* 5. izdanje. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. str. 91
31. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85–95.
32. Zahra K, Dey T, Ashish, Mishra SP, Pandey U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front Oncol.* 2020;10.
33. Hsu MC, Hung WC. Pyruvate kinase M2 fuels multiple aspects of cancer cells: from cellular metabolism, transcriptional regulation to extracellular signaling. *Mol Cancer.* 2018;17(1):35.
34. Puckett DL, Alquraishi M, Chowanadisai W, Bettaieb A. The Role of PKM2 in Metabolic Reprogramming: Insights into the Regulatory Roles of Non-Coding RNAs. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1–55.
35. T24 - HTB-4 | ATCC [Internet]. [cited 2024 Oct 22]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/htb-4#related-products>.
36. Sample overview for 724812 [Internet]. [cited 2024 Oct 22]. Dostupno na: [https://cancer.sanger.ac.uk/cell\\_lines/sample/overview?id=724812](https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/sample/overview?id=724812)
37. 5637 - HTB-9 | ATCC [Internet]. [cited 2024 Oct 22]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/htb-9>
38. Sample overview for 687452 [Internet]. [cited 2024 Oct 22]. Dostupno na: [https://cancer.sanger.ac.uk/cell\\_lines/sample/overview?id=687452](https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/sample/overview?id=687452)

39. MB49 Mouse Bladder Carcinoma Cell Line Millipore [Internet]. [cited 2024 Oct 22]. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/scc148>
40. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998;31(1):1–9.
41. Marchenko I V., Trushina DB. Local Drug Delivery in Bladder Cancer: Advances of Nano/Micro/Macro-Scale Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2023;15(12).
42. Winnicka A, Brzeszczyńska J, Saluk J, Wigner-Jeziorska P. Nanomedicine in Bladder Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2024;25(19).
43. Liu Q, Guan Y, Li S. Programmed death receptor (PD-)1/PD-ligand (L)1 in urological cancers: the “all-around warrior” in immunotherapy. *Molecular Cancer* 2024 23:1. 2024;23(1):1–26.
44. Wu Y, Zhang X, Li Z, Yan H, Qin J, Li T. Formononetin inhibits human bladder cancer cell proliferation and invasiveness via regulation of miR-21 and PTEN. *Food Funct*. 2017;8(3):1061–6.
45. Lv Y, Liu Z, Jia H, Xiu Y, Liu Z, Deng L. Properties of flavonoids in the treatment of bladder cancer (Review). *Exp Ther Med*. 2022;24(5).
46. Rossi M, Strikoudi P, Spei ME, Parpinel M, Serraino D, Montella M, i sur. Flavonoids and bladder cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2019;30(5):527–35.
47. Zhou Y, Liu QH, Liu CL, Lin L. Calycosin induces apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 cells by activating caspases and Bcl-2 family proteins. *Tumour Biol*. 2015;36(7):5333–9.
48. Sun H, Yin M, Qian W, Yin H. Calycosin, a Phytoestrogen Isoflavone, Induces Apoptosis of Estrogen Receptor-Positive MG-63 Osteosarcoma Cells via the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway. *Med Sci Monit*. 2018;24:6178–86.
49. Li Y, Hu S, Chen Y, Zhang X, Gao H, Tian J, i sur. Calycosin inhibits triple-negative breast cancer progression through down-regulation of the novel estrogen receptor- $\alpha$  splice variant ER- $\alpha$ 30-mediated PI3K/AKT signaling pathway. *Phytomedicine*. 2023;118.



50. Qu N, Qu J, Huang N, Zhang K, Ye T, Shi J, i sur. Calycosin induces autophagy and apoptosis via Sestrin2/AMPK/mTOR in human papillary thyroid cancer cells. *Front Pharmacol.* 2022;13.
51. El-kott AF, Al-kahtani MA, Shati AA. Calycosin induces apoptosis in adenocarcinoma HT29 cells by inducing cytotoxic autophagy mediated by SIRT1/AMPK-induced inhibition of Akt/mTOR. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2019;46(10):944–54.
52. Zhang D, Wang S, Zhu L, Tian Y, Wang H, Zhuang Y, i sur. Profiling of Hepatocellular Carcinoma Cell Cycle Regulating Genes Targeted by Calycosin. *Biomed Res Int.* 2013;2013:317926.
53. Li CC, Lu CY, Hsu CH, Hsieh D, Wang TF, Ho TJ, i sur. Calycosin inhibits gemcitabine-resistant lung cancer cells proliferation through modulation of the LDOC1/GNL3L/NF $\kappa$ B. *Chin J Physiol.* 2023;66(4):189–99.
54. Zhang Y, Zhang JQ, Zhang T, Xue H, Zuo WB, Li YN, i sur. Calycosin Induces Gastric Cancer Cell Apoptosis via the ROS-Mediated MAPK/STAT3/NF- $\kappa$ B Pathway. *Onco Targets Ther.* 2021;14:2505.
55. Xia Y, Wang X, Liu Y, Shapiro E, Lepor H, Tang MS, i sur. PKM2 Is Essential for Bladder Cancer Growth and Maintenance. *Cancer Res.* 2022;82(4):571–85.
56. Sun Q, Yuan M, Wang H, Zhang X, Zhang R, Wang H, i sur. PKM2 Is the Target of a Multi-Herb-Combined Decoction During the Inhibition of Gastric Cancer Progression. *Front Oncol.* 2021;11:767116.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja je ispitati antitumorsko djelovanje izoflavona kalikosina u staničnim linijama tumora mokraćnog mjehura (T24, 5637 i MB49) ispitivanjem citotoksičnosti, indukcije apoptoze te utjecaja na staničnu proliferaciju i stanični metabolizam.

**Materijali i metode:** Istraživanje je provedeno in vitro na staničnim linijama tumora mokraćnog mjehura T24, 5637 i MB49. Stanice su tretirane različitim koncentracijama kalikosina. Provedena je analiza apoptoze i staničnog ciklusa metodom *western blot* i protočnom citometrijom, a analiza staničnog metabolizma provedena je metodom *western blot*.

**Rezultati:** Istraživanje je pokazalo da kalikodin ima citotoksičan učinak na stanice tumora mokraćnog mjehura T24, 5637 i MB49. Antitumorski učinak kalikosina varira ovisno o staničnoj liniji (T24, 5637 i MB49) te koncentraciji primijenjenog tretmana. Tretman kalikodinom doveo je do smanjenja stanične proliferacije i inducirao apoptozu, što je potvrđeno povećanom količinom aktiviranih proteina kaspaze-3 i PARP1 te smanjenjem količine proteina ciklina D1. Indukcija apoptoze i zaustavljanje staničnog ciklusa potvrđeni su metodom protočne citometrije. Kalikodin je smanjio izražaj proteina PKM2 što ukazuje na njegov potencijalni učinak na regulaciju staničnog metabolizma.

**Zaključci:** Kalikodin je pokazao antitumorsko djelovanje na stanične linije tumora mokraćnog mjehura T24, 5637 i MB49, inducirajući apoptozu, inhibirajući stanični ciklus i mijenjajući metabolički profil stanica. Rezultati upućuju na potencijalnu primjenu kalikosina kao terapijskog agensa u liječenju tumora mokraćnog mjehura, ali su potrebna dodatna istraživanja kako bi se precizno utvrdili mehanizmi djelovanja.

**Ključne riječi:** tumor mokraćnog mjehura, kalikodin, apoptoza, stanični ciklus, metabolizam

## **9. SUMMARY**

**Objectives:** The aim of this study is to investigate the antitumor activity of the isoflavone calycosin in bladder cancer cell lines (T24, 5637, and MB49) by examining cytotoxicity, induction of apoptosis, and its effects on cell proliferation and cellular metabolism.

**Material and Methods:** The study was conducted in vitro on bladder cancer cell lines T24, 5637, and MB49. The cells were treated with different concentrations of calycosin. Apoptosis and cell cycle analysis were performed using western blot and flow cytometry, and cellular metabolism was analyzed by the western blot method.

**Results:** The study demonstrated that calycosin has a cytotoxic effect on bladder cancer cells T24, 5637, and MB49. The antitumor effect of calycosin varied depending on the cell line (T24, 5637, and MB49) and the concentration of the treatment. Treatment with calycosin led to a decrease in cell proliferation and induced apoptosis, as confirmed by increased amounts of activated caspase-3 and PARP1 proteins, and a decrease in cyclin D1 protein levels. Induction of apoptosis and cell cycle arrest were confirmed by flow cytometry. Calycosin reduced the expression of the PKM2 protein, indicating its potential effect on regulating cellular metabolism.

**Conclusions:** Calycosin showed antitumor activity on bladder cancer cell lines T24, 5637, and MB49, inducing apoptosis, inhibiting the cell cycle, and altering the metabolic profile of the cells. The results suggest the potential application of calycosin as a therapeutic agent in the treatment of bladder cancer, but further studies are needed to precisely determine the mechanisms of action.

**Keywords:** bladder cancer, calycosin, apoptosis, cell cycle, metabolism

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podaci:**

- Ime i prezime: Paola Radovniković
- Datum rođenja: 07.06.1999.
- Državljanstvo: hrvatsko

**Obrazovanje:**

- 2006. – 2014. Osnovna škola „Skalice“, Split
- 2014. – 2018. Gimnazija „Vladimir Nazor“, opća gimnazija, Split
- 2018. – 2024. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

**Radno iskustvo:**

- 20.2.2023 – 25.8.2023 Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Spinut te u Galenskom i Analitičkom laboratoriju Ljekarni Splitsko – dalmatinske županije

**Posebne vještine:**

- Rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000
- Strani jezici: engleski – izvrsno, talijanski – osnovno
- Vozačka dozvola: B kategorija