

# Antitumorsko djelovanje odabranih vitamina

---

Perčić, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:825139>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Laura Perčić**

# **Antitumorsko djelovanje odabranih vitamina**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Lovorke Vujić.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Lovorki Vujić, na velikoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala svim prijateljima i Andreasu što su mi uljepšali studentske dane.*

*Najveća zahvala ide najboljim roditeljima te baki i djedu na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog studija.*

## KRATICE

AI (eng. *adequate intake*) – adekvatni unos

AP1 (eng. *activator protein 1*) – aktivator proteina 1

APAF-1 (eng. *apoptotic protease activating factor 1*) - aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze

APL (eng. *acute promyelocytic leukemia*) – akutna promijelocitna leukemija

ATP (eng. *adenosine triphosphate*) – adenzin trifosfat

BAD (eng. *bcl-2 associated death promoter*) – bcl-2 vezan promotor smrti

BAX (eng. *bcl-2 associated X protein*) – bcl-2 vezan X protein

BMP6 (eng. *bone morphogenic protein 6*) – morfogenetski koštani protein 6

CAMs (eng. *cell adhesion molecules*) – stanične adhezijske molekule

CAT (eng. *catalase*) – katalaza

CDK (eng. *cyclin-dependent kinase*) – ciklin-ovisna kinaza

COX-2 (eng. *cyclooxygenase-2*) – ciklooksigenaza 2

CRBP (eng. *cellular retinol-binding protein*) – celularni protein koji veže retinol

CRP (eng. *C-reactive protein*) – C-reaktivni protein

DHA (eng. *dehydroascorbic acid*) – dehidroaskorbinska kiselina

DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleinska kiselina

EGF (eng. *epidermal growth factor*) – epidermalni faktor rasta

EGFR (eng. *epidermal growth factor receptor*) – receptor epidermalnog faktora rasta

EMT (eng. *epithelial-mesenchymal transition*) – epitelno-mezenhimalna tranzicija

ERK (eng. *extracellular signal-regulated kinase*) – kinaza regulirana izvanstaničnim signalima

GLUT (eng. *glucose transporter*) – transporter glukoze

GPx (eng. *glutathione peroxidase*) – glutation peroksidaza

GR (eng. *glutathione reductase*) – glutation reduktaza

GSH (eng. *glutathione*) – glutation

GSSG (eng. *glutathione disulfide*) – glutation disulfid

HAT (eng. *histone acetyltransferase*) – histon acetiltransferaza

HDAC (eng. *histone deacetylase*) – histon deacetilaza

HER2 (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*) – humani receptor epidermalnog faktora rasta 2

HIF-1 $\alpha$  (eng. *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* ) – hipoksija inducibilni faktor 1-alfa

HNE (eng. *4-hydroxynonenal*) – 4-hidroksinonenal

IGF-1 (eng. *insuline-like growth factor 1*) – inzulinu sličan faktor rasta-1

IGFBP3 (eng. *IGF-binding protein 3*) – IGF-vezajući protein 3

IL (eng. *interleukin*) – interleukin

IU (eng. *international units*) – internacionalne jedinice

JNK (eng. *c-Jun N-terminal kinase*) – c-Jun N-terminalna kinaza

LDL (eng. *low-density lipoprotein*) – lipoproteini niske gustoće

LRAT (eng. *lecithin retinol acyltransferase*) – lecitin retinol aciltransferaza

MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*) – protein kinaza aktivirana mitogenom

MDA (eng. *malondialdehyde*) – malonildialdehid

MKP5 (eng. *mitogen-activated protein kinase phosphatase 5*) – fosfataza 5 MAP kinaze

MMPs (eng. *matrix metalloproteinases*) – metaloproteinaze matriksa

mTOR (eng. *mechanistic target of rapamycin*) - ciljna molekula rapamicina

NAD(P)H (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)*) – nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)

NcoR (eng. *nuclear receptor corepressor*) – nuklearni receptor korepresor

NF- $\kappa$ B (eng. *nuclear factor kappa B*) – nuklearni faktor kapa B

NK stanice (eng. *natural killer cells*) – stanice prirodne ubojice

PARP (eng. *polyADP-ribose polymerase*) – poliADP-riboza polimeraza

PDGF (eng. *platelet-derived growth factor*) –trombocitni čimbenik rasta

PG (eng. *prostaglandin*) - prostaglandin

PGE2 (eng. *prostaglandin E2*) – prostaglandin E2

PI3K (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase*) – fosfatidilinozitol 3-kinaza

PKC (eng. *protein kinase C*) – protein kinaza C

PML (eng. *promyelocytic leukemia protein*) – protein promijelocitne leukemije

PPA2 (eng. *protein phosphatase A2*) – protein fosfataza A2

PRX (eng. *peroxiredoxin*) – peroksiredoksin

PSA (eng. *prostate-specific antigen*) – prostata-specifični antigen

PUFAs (eng. *polyunsaturated fatty acids*) – višestruko nezasićene masne kiseline

RA (eng. *retinoic acid*) – retinoična kiselina

RAE (eng. *retinol activity equivalents*) – ekvivalenti aktivnosti retinola

RAR (eng. *retinoid acid receptor*) – receptor retinoične kiseline

RAREs (eng. *retinoic acid response elements*) – elementi odgovora retinoične kiseline

RBP (eng. *retinol binding protein*) – protein koji veže retinol

RDA (eng. *recommended dietary allowances*) – preporučeni dnevni unos

RNS (eng. *reactive nitrogen species*) – reaktivni dušikovi spojevi

ROS (eng. *reactive oxygen species*) – reaktivni kisikovi spojevi

RXR (eng. *retinoic x receptor*) – retinoidni x receptor

RXREs (eng. *retinoic x receptor response elements*) – elementi odgovora retinoidnih x receptora

SMRT (eng. *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor*) – posrednik utišavanja za receptore retinoida ili tiroidnih hormona

SOD (eng. *superoxide dismutase*) – superoksid dismutaza

STRA6 (eng. *stimulated by retinoic acid 6*) - protein stimuliran retinoičnom kiselinom 6

SVTC (eng. *sodium-dependent vitamin C transporter*) – transporter vitamina C ovisan o natriju

TGF- $\alpha$ , - $\beta$  (eng. *transforming growth factor- $\alpha$ , - $\beta$* ) – transformirajući faktor rasta – alfa, - beta

TNF- $\alpha$  (eng. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) – tumorski faktor nekroze - alfa

tPA (eng. *tissue plasminogen activator*) – tkivni aktivator plazminogena

TR (eng. *thioredoxin reductase*) – tioredoksin reduktaza

TRAIL (eng. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) – ligand koji inducira apoptozu povezan s tumorskim faktorom nekroze

TTR (eng. *transthyretin*) – transtiretin

uPA (eng. *urokinase*) - urokinaza

VDR (eng. *vitamin D receptor*) – receptor vitamina D

VDREs (eng. *vitamin D response elements*) – elementi odgovora vitamina D

VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*) – vaskularni endotelni faktor rasta

VLDL (eng. *very-low-density lipoprotein*) – lipoproteini vrlo niske gustoće

$\alpha$ -TOS (eng.  *$\alpha$ -tocopheryl succinate*) – alfa-tokoferil sukcinat

$\alpha$ -TPP (eng.  *$\alpha$ -tocopherol transfer protein*) – alfa-tokoferol transportni protein

1,25(OH)<sub>2</sub>D (eng. *1,25-dihydroxyvitamin D, calcitriol*) – 1,25-dihidroksivitamin D, kalcitriol

25(OH)D (eng. *25-hydroxyvitamin D*) – 25-hidroksivitamin D

4-HPR (eng. *4-hydroxy(phenyl)retinamide, fenretinide*) – 4-hidroksi(fenil)retinamid, fenretinid

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. UZROCI NASTANKA TUMORA .....	1
1.2. KARCINOGENEZA .....	3
1.2.1. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI .....	4
1.2.2. SVOJSTVA TUMORSKIH STANICA .....	4
1.3. ANGIOGENEZA TUMORA .....	5
1.4. METASTAZIRANJE TUMORA .....	6
1.5. LIJEČENJE TUMORA .....	8
1.6. OKSIDATIVNI STRES .....	9
1.6.1. OKSIDATIVNI STRES I NASTANAK RAKA .....	11
1.6.2. ANTIOKSIDANSI .....	12
1.7. INCIDENCIJA RAKA U HRVATSKOJ .....	14
1.8. VITAMINI .....	15
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>22</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>23</b>
4.1. VITAMIN A .....	23
4.1.1. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA A .....	24
4.1.1.1. REGULACIJA GENSKE TRANSKRIPCije .....	24
4.1.1.2. RAR- $\beta$ 2 U TUMORIMA .....	25
4.1.1.3. DJELOVANJE VITAMINA A NA STANIČNU PROLIFERACIJU .....	25
4.1.1.4. DJELOVANJE VITAMINA A NA INDUKCIJU APOPTOZE .....	26
4.1.1.5. BLOKIRANJE PROMOCIJE TUMORA INHIBICIJOM AP1 .....	27
4.1.2. KAROTENOIDI KAO ANTIOKSIDANSI .....	27
4.1.3. VITAMIN A U AKUTNOJ PROMIJELOCITNOJ LEUKEMIJU .....	27
4.1.4. SINTETSKI RETINOIDI .....	28
4.2. VITAMIN D .....	30
4.2.1. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA D .....	32
4.2.2. ISTRAŽIVANJA DJELOVANJA VITAMINA D NA RAK .....	37
4.3. VITAMIN E .....	39
4.3.1. MEHNIZMI ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA E .....	39
4.3.1.1. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE VITAMINA E .....	40

4.3.1.2. NE-ANTIOKSIDATIVNI MEHANIZMI DJELOVANJA .....	42
4.3.1.3. MODULACIJA IMUNOSNOG SUSTAVA .....	43
4.3.2. ISTRAŽIVANJA ANTITUMORSKOG UČINKA VITAMINA E .....	44
4.4. VITAMIN C .....	46
4.4.1. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA C .....	47
4.4.1.1. VITAMIN C KAO ANTIOKSIDANS .....	47
4.4.1.2. VITAMIN C KAO PROOKSIDANS .....	49
4.4.1.3. VITAMIN C KAO IMUNOMODULATOR .....	51
4.4.1.4. DJELOVANJE VITAMINA C NA ANGIOGENEZU .....	52
4.4.2. ISTRAŽIVANJA ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA C .....	52
4.5. PREHRANA U PREVENCIJI RAKA .....	55
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>57</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>59</b>
<b>7. SAŽETAK / SUMMARY .....</b>	<b>68</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	



# 1. UVOD

Stanice tumora karakterizira poremećaj osnovnih staničnih regulacijskih mehanizama, a posljedica toga je njihova nenormalna proliferacija, nekontrolirani rast i dioba. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u organizmu, dok se pojam rak odnosi na zloćudne tumore. Dobročudni (benigni) tumori se ne šire, već ostaju ograničeni na mjesto gdje su nastali, dok se zloćudni (maligni) premještaju s primarnog mjesta nastanka na susjedna, normalna tkiva. Ukoliko se krvožilnim ili limfnim sustavom prošire na drugi dio tijela, kažemo da su metastazirali (Cooper i Hausman, 2004). Normalne, zdrave stanice mogu se pod utjecajem različitih čimbenika preobraziti u zloćudne novotvorine koje se nekontrolirano dijele (Mintas, 2013). Tumori se klasificiraju prema vrsti stanica iz kojih nastaju, najčešće u tri glavne skupine: karcinome, sarkome, leukemije ili limfome. Karcinomi su zloćudne bolesti epitelnog tkiva, sarkomi tumori vezivnog ili potpornog tkiva, a leukemije i limfomi nastaju iz krvotvornih stanica i stanica imunološkog sustava (Cooper i Hausman, 2004).

## 1.1. UZROCI NASTANKA TUMORA

Tvari koje su odgovorne za nastanak tumora nazivaju se karcinogeni, a kako je razvoj tumora kompleksan i složen proces, smatra se da više čimbenika utječe na njihov nastanak (Cooper i Hausman, 2004). Možemo ih podijeliti na fizičke, kemijske i biološke faktore.

- FIZIČKI FAKTORI

U fizičke faktore kao uzročnike tumora ubrajamo zračenja koja mogu dovesti do oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Izvori zračenja mogu biti prirodni, poput sunčeve svjetlosti, UV zračenja, zračenja radioaktivnih izotopa iz vode i tla, ili umjetni, iz medicinskih ili industrijskih uređaja (Vrdoljak, 2013). U ionizirajuće zračenje spadaju rentgenske, radioaktivne (alfa-, beta- i gama-) zrake te čestice poput neutrona i pozitrona. Djelovanjem ionizirajućeg zračenja iz atoma ili molekule mogu nastati oksidativni radikali s nesparenim brojem elektrona koji uzrokuju mutaciju DNA ili promjenu konformacije proteina (Bešlija i Vrbanec, 2014). Sunčeva svjetlost sadrži ultraljubičaste zrake (UV-A, UV-B i UV-C), od kojih su UVB-zrake odgovorne za nastanak raka kože. Stvaraju se dimeri pirimidinskih baza na način da se fotoni UV zraka apsorbiraju u molekuli DNA, povećavaju energiju

elektrona i uzrokuju pomicanje dvostrukih veza. Stvara se prsten između dviju susjednih baza i ukoliko nema popravka ekscizijom (isijecanjem) nastaje mutacija. Primjer bolesti s poremećajem ekscizijskog popravka DNA je *xeroderma pigmentosum* (Vrdoljak, 2013).

- KEMIJSKI FAKTORI

Za kemijske tvari kažemo da su karcinogeni ako direktno ili indirektno sudjeluju u povećanju broja mutacija ili dovode do grešaka u staničnom metabolizmu pa posljedično izazivaju zloćudnu preobrazbu stanice (Bešlija i Vrbanec, 2014; Vrdoljak i sur., 2013). U kemijske uzročnike raka spadaju produkti industrijske proizvodnje, produkti pirolize (nastali izgaranjem cigarete, pečenjem na otvorenom ognjištu), proizvodi različitih organizama poput mikotoksina te prirodni spojevi iz okoliša (Vrdoljak i sur., 2013). Karcinogeni iz duhanskog dima (npr. benzo( $\alpha$ )piren, spojevi nikla, dimetilnitrozamin) važni su uzročnici raka, a za pušenje se smatra da uzrokuje čak 80-90% svih slučajeva raka pluća (Cooper i Hausman, 2004). Spojevi aromatskih ugljikovodika s benzenskim prstenom poput benzena, toluena, ksilena i etilbenzena smatraju se karcinogenima prve grupe, odnosno dokazanim karcinogenima za ljude. Benzen se u stanici oksidira u epoksid koji se polako odstranjuje i veže za DNA, stvarajući pritom kromosomske aberacije i kidanje DNA uzvojnice (Bešlija i Vrbanec, 2014). Sljedeći važni kemijski karcinogeni su nitrozamini koji mogu nastati u želucu iz nitrita i amina unesenih hranom te mikotoksin aflatoksin B1 koji povećava rizik od hepatocelularnog raka (Vrdoljak i sur., 2013).

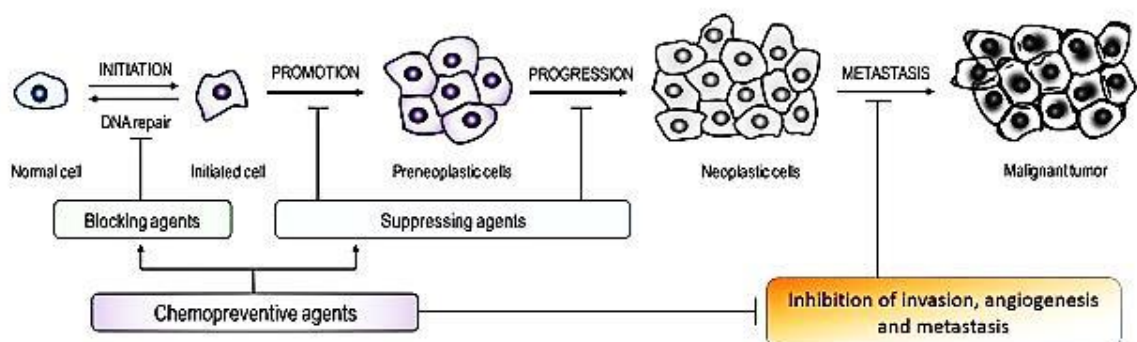
- BIOLOŠKI FAKTORI

Od bioloških agensa kao uzročnika tumora, poznati su virusi koji mogu regulirati stanični ciklus ili programiranu smrt stanica (Bešlija i Vrbanec, 2014). Oni koji najčešće uzrokuju rak su virusi hepatitisa B i C (rak jetre), Epstein-Barr virus (Burkittov limfom), herpesvirus (Kaposijev sarkom) i papilomavirus (rak grlića maternice) (Cooper i Hausman, 2004). Osim virusa kao vanjskih faktora, postoje i unutarnji faktori iz mikrookoliša same stanice koji oštećuju DNA putem oksidacijskog stresa, onkogeni ili nekog nepoznatog razloga (Bešlija i Vrbanec, 2014).

## 1.2. KARCINOGENEZA

Karcinogeneza je proces kojim iz zdravog tkiva nastaje rak u više koraka (Vrdoljak i sur., 2013). Nastanak i razvoj tumora zapravo je dugotrajan proces koji može trajati godinama, a tijekom kojeg se zdrave stanice transformiraju u maligne. U početnoj fazi stvaranja raka stanice su izložene nekoj karcinogenoj tvari koja može, primjerice, oštetiti DNA i uzrokovati mutaciju. Takve promijenjene stanice imaju potencijal stvaranja tumora ukoliko se nastavi izlaganje toksičnim agensima i pritom nakupljaju nove mutacije (Beliveau i Gringras, 2007). Tumori nastaju iz jedne jedine stanice koja počinje nenormalno proliferirati, a to se svojstvo naziva klonalnost. Primjer toga je rak debelog crijeva, čija se učestalost značajno povećava sa starenjem zbog nakupljanja poremećaja tijekom godina (Cooper i Hausman, 2004).

Faze karcinogeneze (slika 1) su: inicijacija, promocija, progresija i metastaziranje. Prvi korak u nastanku tumora je inicijacija. Spontano ili zbog izlaganja nekom karcinogenom agensu dolazi do genske promjene koja rezultira abnormalnom proliferacijom stanice. U fazi promocije proliferirajuće preneoplastične stanice se akumuliraju i to je stadij između premaligne lezije i razvoja u invazivni tumor. Progresija je završni korak neoplastične transformacije. Dolazi do nakupljanja mutacija i brzog povećanja tumorske mase, što doprinosi invazivnosti tumora. Naposljetku, kad se tumor proširi u udaljena tkiva, kažemo da je metastazirao (Siddiqui i sur., 2015).



Slika 1. Karcinogeneza (Siddiqui i sur., 2015)

### 1.2.1. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI

Onkogeni su geni koji imaju vrlo važnu ulogu u nastanku raka, a promijenjena su inačica protoonkogeni koji sudjeluju u regulaciji stanične diferencijacije i proliferacije. Aktivacija onkogeni dovodi do nekontrolirane diobe i rasta stanica, a posljedično do razvoja raka. Mogu se aktivirati zbog mutacija u samom genu, kao posljedica genske amplifikacije (povećanja broja kopija gena) ili zbog kromosomske translokacije (Vrdoljak i sur., 2013). Onkogeni imaju ulogu u nastanku gotovo 20% humanih malignih bolesti. Od odgovarajućeg protoonkogeni razlikuju se po zamjenama pojedinačnih aminokiselina, a promjenu protoonkogeni u onkogeni mogu inducirati kemijski karcinogeni. Do aktivacije *c-myc* onkogeni dolazi zbog kromosomske translokacije, primjerice, kod Burkittovog limfoma *c-myc* kodira transkripcijski faktor čija nenormalna ekspresija dovodi do izrazite proliferacije i nastanka tumora. Amplifikacija gena, kojom se pojačava genska ekspresija, često se pojavljuje u tumorskim stanicama i uzrokuje brži rast i agresivnost tumora. Primjer amplifikacije onkogeni je *N-myc* u neuroblastomima.

Tumorsupresorski geni normalno inhibiraju staničnu proliferaciju i nastanak tumora, a u tumorskim ih stanicama nema ili su inaktivirani (Cooper i Hausman, 2004). Prvi otkriveni tumorsupresorski gen bio je *Rb* kod retinoblastoma. Danas se nekako najviše zna o tumorsupresorskom genu *p53* koji je najčešće mutiran kod ljudi koji boluju od raka. Aktivira se zbog oštećenja DNA ili drugih poremećaja povezanih sa staničnim stresom. Djeluje tako da zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak prije nego što se tako oštećena DNA dalje replicira. Ako se oštećenje ne uspije popraviti, *p53* potiče apoptozu u svrhu sprječavanja mogućeg razvoja raka (Vrdoljak i sur., 2013).

### 1.2.2. SVOJSTVA TUMORSKIH STANICA

Douglas Hanahan i Robert A. Weinberg 2000. godine su predstavili model prema kojem se rak razlikuje od zdravog tkiva, a 2011. godine dodano je još nekoliko obilježja:

1. samodostatnost s obzirom na signale rasta
2. neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast
3. izbjegavanje apoptoze
4. neograničeni potencijal umnažanja
5. angiogeneza
6. sposobnost tkivne invazije i presađivanja

7. poremećen metabolizam
8. izbjegavanje imunskog odgovora
9. genomska nestabilnost
10. upala

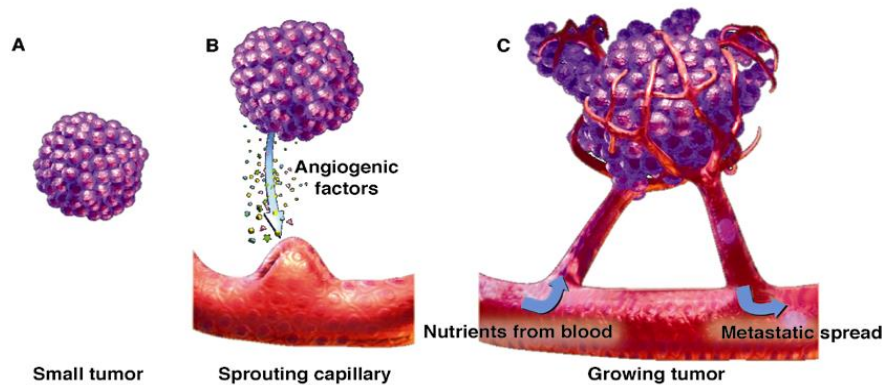
(Vrdoljak i sur., 2013).

Tumorske stanice sposobne su same stvarati faktore rasta potrebne za proliferaciju što rezultira autokrinom stimulacijom. Za razliku od normalnih stanica, koje proliferiraju dok ne dosegnu odgovarajuću gustoću, one nisu osjetljive na inhibiciju ovisnu o gustoći. Ne zaustavljaju se u G<sub>0</sub> fazi staničnog ciklusa već nastavljaju nekontrolirano proliferirati. Stanice raka nisu osjetljive na dodirnu inhibiciju, pa suprotno od normalnih stanica, ne prestaju migrirati kad dođu u dodir sa susjednim stanicama već se nastavljaju kretati jedne preko drugih i rastu u više neurednih slojeva. Jedno od svojstva tumorskih stanica je izostanak normalne stanične diferencijacije. Primjer su leukemije gdje stanice, tijekom diferencijacije iz matičnih stanica u koštanoj srži, ostaju zaglavljene u ranoj fazi diferencijacije kad se još dijele i umnažaju za razliku od zdravih stanica gdje dioba prestaje kada one posve sazriju. Sljedeće bitno svojstvo tumorskih stanica je izbjegavanje programirane stanične smrti, apoptoze. To je bitno za sam nastanak tumora, ali i za preživljavanje i rast metastaza te povećanje otpornosti na citostatike i zračenje koji oštećuju DNA (Cooper i Hausman, 2004). Upala može biti rizik za stvaranje zloćudnih tumora. Kronična upala trajno potiče rast stanica, a time se u tkivu može nakupljati sve veći broj mutacija. Molekule i procesi uključeni u cijeljenje rana stimuliraju diobu i rast stanica pa su ujedno i tumorski promotori. Luče se i citokini koji mogu utjecati na stvaranje oksidativnih radikala što povećava mogućnost nastanka mutacija (Bešlija i Vrbanec, 2014).

### **1.3. ANGIOGENEZA TUMORA**

Angiogeneza tumora (slika 2) je proces stvaranja novih krvnih žila kao odgovor na faktore rasta koje luče tumorske stanice (Cooper i Hausman, 2004). Brzo-proliferirajuće tumorske stanice veće od 2 mm<sup>3</sup> imaju povećanu potrebu za kisikom i hranjivim tvarima. Kako bi mogle rasti i metastazirati trebaju imati pristup krvnim žilama. Tumorska angiogeneza sastoji se od više koraka uključujući oštećenje bazalne membrane, migraciju i proliferaciju endotelnih stanica. Poznati angiogenetski faktori su: VEGF (vaskularni endotelni faktor rasta), angiogenin, TNF- $\alpha$  (tumorski faktor nekroze- $\alpha$ ), IL-8 (interleukin-8), TGF  $\alpha$  i  $\beta$

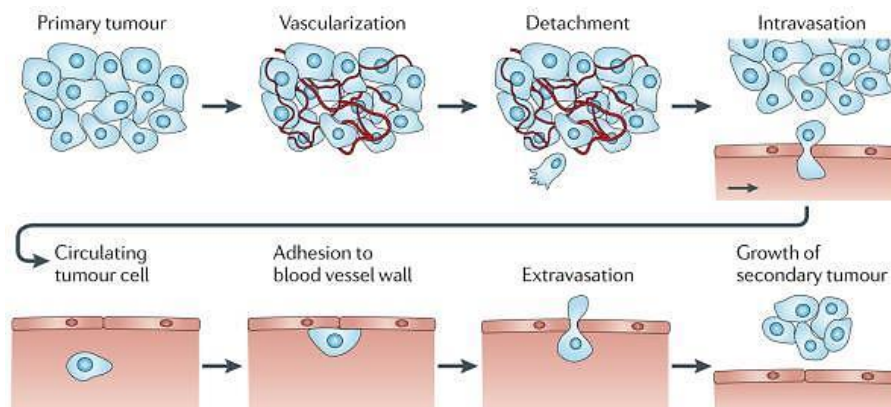
(transformirajući faktor rasta  $\alpha$  i  $\beta$ ), PDGF (trombocitni čimbenik rasta), EGF (epidermalni faktor rasta) i drugi. Povećana potreba za kisikom dovodi do hipoksije koja putem hipoksija inducibilnog faktora 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) inducira ekspresiju VEGF i receptora. Endotelne stanice aktivirane s VEGF stvaraju MMPs (metaloproteinaze matriksa) koje kidaju ekstracelularni matriks i dopuštaju migraciju endotelnih stanica. Za stvaranje novih krvnih žila potrebni su i adhezijski faktori poput integrina  $\alpha$  i  $\beta$  te angiotenzin-1 i -2 za stabilizaciju i sazrijevanje vaskularnog rasta (Nishida i sur., 2006).



Slika 2. Angiogeneza ( <http://www.angioworld.com/DominiqueGarrel.html>)

## 1.4. METASTAZIRANJE TUMORA

Metastaziranje je proces u kojem dolazi do diseminacije stanica raka iz primarnog tumora, a odgovoran je za oko 90% smrtnih slučajeva povezanih s rakom. Uključuje invaziju stanica iz primarnog tumora, njihov ulazak u mikrovaskulaturu krvnožilnog ili limfnog sustava te širenje do udaljenih tkiva gdje formiraju sekundarne tumore (Guan, 2015; Chaffer i Weinberg, 2011).



Slika 3. Metastatski proces (Wirtz i sur., 2011)

Proces se sastoji od više faza (slika 3): odvajanja od primarnog tumora, migracije, invazije i adhezije. Za početak, kako bi došlo do lokalne invazije tumorskih stanica u okolno tkivo, mora se probiti bazalna membrana. Važnu ulogu u tome imaju MMPs koje se smatraju glavnim enzimima odgovornim za degradaciju matriksa. To je obitelj cink-ovisnih endopeptidaza sposobnih za razaranje bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa. Stvaraju ih endotelne stanice, stanice tumora, leukociti, makrofagi i fibroblasti, kao inaktivne enzime koje aktiviraju druge MMPs ili serinske proteaze. Intravazacija uključuje ulazak stanica raka u lumen krvnih ili limfnih žila, a sam ulaz ovisi o strukturnim obilježjima s tumorom povezanih krvnih žila. Tumorske stanice različitim mehanizmima, poput aktivacije VEGF-a, potiču rast novih krvnih žila. Tako nastala neovaskulatura koja se stalno rekonfigurira, sklona je curenju, sa slabim interakcijama između susjednih endotelnih stanica i bez pokrivenosti pericitima, olakšava proces intravazacije. Cirkulirajuće tumorske stanice migriraju krvotokom ili limfom do udaljenih tkiva, a kad dođu do ciljnog organa adhezijom se vežu za endotel kapilara. Stanična adhezija je posredovana sa staničnim adhezijskim molekulama (CAMs) u koje spadaju kadherini, integrini i selektini, a sam proces je bitan kako bi se metastatske stanice mogle naseliti u udaljena tkiva. Kad se nađu u mikrovaskulaturi ciljnog organa, ekstravazacijom penetriraju iz lumena žile u tkivni parenhim. Pritom primarni tumor izlučuje faktore koji induciraju vaskularnu permeabilnost i pomažu procesu ekstravazacije (Guan 2015; Valastyan i Weinberg, 2011).

EMT (epitelno-mezenhimalna tranzicija) je karakteristika metastatskih stanica, pri čemu dolazi do transformacije epitelnih stanica koje su obično organizirane, polarizirane i visoko diferencirane, u izolirane, nediferencirane stanice koje imaju sposobnost migracije i veliku moć invazivnosti. Za EMT je bitno smanjenje razine E-kadherina, transmembranskih glikoproteina koji posreduju u staničnoj adheziji tako da ekstracelularnom domenom čvrsto povezuju dvije epitelne stanice, a intracelularnom domenom su povezani za citoskelet preko veznih proteina, kateninskog kompleksa. Smanjenjem razine E-kadherina ili katenina veze između stanica se olabave što dopušta diseminaciju tumora i nastanak metastaza. Za sve korake metastatske kaskade bitan je i tumorski mikrookoliš koji uključuje okolinu tumora, tumorsku stromu, izvanstanične strukture, citokine, proteaze, fibroblaste, trombocite i endotelne stanice. Te su komponente u stalnoj interakciji i komunikaciji s tumorskim stanicama te utječu na tumorski rast, angiogenezu i metastaze (Guan, 2015).

## 1.5. LIJEČENJE TUMORA

Liječenje zloćudnih bolesti provodi se primjenom zračenja, kirurškim zahvatima, kemoterapijom, imunoterapijom. Kemoterapija je terapija izbora pri sustavno prisutnoj bolesti (Francetić i sur., 2015). Dijelimo ju na primarnu, adjuvantnu i neoadjuvantnu. Adjuvantna kemoterapija primjenjuje se nakon lokalnog liječenja (najčešće kirurškog zahvata) da se spriječi moguće širenje bolesti. Neoadjuvantna kemoterapija je oblik liječenja bolesnika s lokalnom bolešću koja je inicijalno inoperabilna, s ciljem da se učini operabilnom. Bolesnici s diseminiranom bolešću ne mogu se liječiti lokalnom terapijom pa se primjenjuje primarna kemoterapija (Vrdoljak i sur., 2013).

Primjeri kemoterapeutika su antimetaboliti, citotoksični antibiotici, mitotički inhibitori i alkilirajući lijekovi. Antimetaboliti su strukturni analozi staničnih metabolita koji se ugrađuju u nukleinske kiseline umjesto prirodnih nukleozidnih baza (purina, pirimidina) i sprječavaju katalitičke funkcije određenih enzima. Posljedica je zaustavljanje diobe i umnažanja tumorskih stanica te stanična smrt. Dije se u tri skupine: analozi folne kiseline (metotreksat), analozi pirimidina (fluorouracil, citarabin, gemcitabin, kapecitabin) i analozi purina (merkaptopurin, tiogvanin). Citotoksični antibiotici inhibiraju topoizomerazu stvaranjem kompleksa topoizomeraza II-DNA te uzrokuju pucanje DNA uzvojnice. Uz to, stvaraju slobodne radikale koji oštećuju proteine. U tu skupinu spadaju doksorubicin, daunorubicin, epirubicin i idarubicin. Mitotički inhibitori djeluju tako da interferiraju sa stvaranjem mikrotubula. Mikrotubuli tvore mitotičko vreteno ključno za odvajanje kromosoma tijekom diobe, a kad je njihovo stvaranje spriječeno, zaustavlja se stanična dioba. U mitotičke inhibitore spadaju vinka alkaloidi (vinkristin, vinorelbin) i taksani (paklitaksel, docetaksel). Alkilirajući lijekovi mogu stvarati kovalentne veze s DNA, a takvu sposobnost imaju: derivati dušikovog iperita (ciklofosfamid, ifosfamid), derivati nitrozureje (karmustin) i spojevi platine (cisplatin, karboplatin).

U novije skupine lijekova spadaju inhibitori tirozin-kinaza. Imatinib je inhibitor Bcr-Abl kinaze i primjenjuje se u liječenju kronične mijeloidne leukemije, kao i nilotinib koji inhibira djelovanje Abl tirozin-kinaze Bcr-Abl onkoproteina. Selektivno sprječavaju proliferaciju i uzrokuje apoptozu *Philadelphia-kromosom* pozitivnih stanica. Gefitinib i erlotinib su inhibitori receptora tirozin kinaze za epidermalni čimbenik rasta (EGFR) i koriste se u liječenju karcinoma pluća nemalih stanica. Lapatinib inhibira djelovanje tirozin kinaze koja eksprimira EGFR i HER2 (humani receptor epidermalnog faktora rasta 2), čija se



pojačana ekspresija povezuje s razvojem raka dojke. Postoje i selektivni inhibitori višestrukih tirozin-kinaza, poput sunitiniba i sorafeniba. Temsirolimus je selektivni inhibitor mTOR, koji u tumorskim stanicama dovodi do zastoja u G<sub>1</sub> fazi staničnog ciklusa. Sljedeća skupina su inhibitori VEGF-a, koji imaju važnu ulogu u angiogenezi. Bevacizumab je humano monoklonsko protutijelo koje se selektivno veže za VEGF i sprječava njegovo vezanje za stanične receptore.

Primjeri imunoterapije su monoklonska protutijela koja se vežu za specifične antigene na površini tumorskih stanica, poput nekih proteina koji nisu prisutni u zdravim, normalnim stanicama. Neka protutijela potiču imunosni odgovor koji uništava tumorske stanice, a druga se vežu na imunokompetentne stanice sprječavajući inhibitorne signale, odnosno pojačavaju imunoreakciju protiv stanica raka. Postoje i monoklonska protutijela koja su u konjugatu vezana sa citostatikom, čime im se povećava selektivno antitumorsko djelovanje. Monoklonska protutijela koja se koriste u liječenju raka su rituksimab, trastuzumab, cetuksimab, bevacizumab i alemtuzumab (Francetić i sur., 2015; Mintas, 2013).

## **1.6. OKSIDATIVNI STRES**

Oksidativni stres nastaje zbog disbalansa oksidativnih i antioksidativnih mehanizama, u korist oksidacije. Povezuje se sa starenjem i doprinosi brojnim patološkim stanjima poput ateroskleroze, hipertenzije, ishemije/perfuzije, dijabetesa, karcinoma, neuroloških poremećaja i bolesti pluća. Postoje slučajevi u kojima su oksidativni mehanizmi korisni, na primjer, omogućuju našem imunosnom sustavu uklanjanje mikroorganizama. Međutim, kad je količina reaktivnih kisikovih spojeva veća od mogućnosti antioksidativne obrane organizma, dolazimo do stanja oksidativnog stresa.

Reaktivni kisikovi spojevi stvaraju se normalnim staničnim mehanizmom, a u organizmu postoje enzimski i neenzimatski antioksidativni mehanizmi, koji se bore protiv štetnih učinaka oksidativnog stresa (Birben i sur., 2012). Visoko reaktivne molekule mogu oduzeti elektron molekulama koje su prije bile stabilne, odnosno oksidirati ih. Posljedično nastaju nestabilne molekule, kao što su slobodni radikali. ROS (reaktivni kisikovi spojevi) (tablica 1) i RNS (reaktivni dušikovi spojevi) (tablica 2) mogu direktno djelovati na DNA, lipide i proteine, što dovodi do kidanja veza, mutacija, oksidacije LDL-a (lipoproteina niske gustoće) te promjena u enzimskoj aktivnosti i signalnim putevima (Heber i sur., 2006).

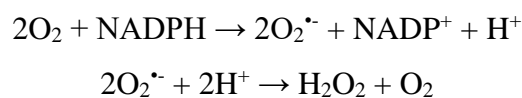
Tablica 1. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) (Štefan i sur., 2007)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
-superoksidni anionski radikal, $O_2^{\bullet-}$	-vodikov peroksid, $H_2O_2$
-hidroksilni, $OH^{\bullet}$	-ozon, $O_3$
-peroksilni, $ROO^{\bullet}$	-singletni kisik, $^1O_2$
-hidroperoksilni, $HO_2^{\bullet}$	-hipokloritna kiselina, $HClO$
-alkoksilni, $RO^{\bullet}$	

Tablica 2. Reaktivni dušikovi spojevi (RNS) (Štefan i sur., 2007)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
-dušikov (II) oksid, $NO^{\bullet}$	- nitrozil, $NO^+$
-dušikov (IV) oksid, $NO_2^{\bullet}$	- nitritna kiselina, $HNO_2$
	- dušikov (III) oksid, $N_2O_3$
	- peroksinitrit, $ONOO^-$
	- alkilperoksinitrit, $ROONO$

Slobodni radikali su kemijske vrste s nesparenim elektronom od kojih je većina vrlo reaktivna (Heber i sur., 2006). Nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, a njihovo je stvaranje u uskoj sprezi s aerobnim metabolizmom. Male količine ROS-a stalno se stvaraju u aerobnim organizmima, a njihovo nakupljanje ili neučinkovito uklanjanje dovodi do oksidacijskog stresa. Prisutnost slobodnih radikala može uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, može potaknuti citotoksično djelovanje, inducirati mutacije, kromosomske aberacije i naposljetku dovesti do razvoja tumora (Štefan i sur., 2007). Izvori slobodnih radikala mogu biti u samom organizmu, ali i u okolišu. Neki od njih su dim cigareta, zračenje, ozon, teški metali i neki pesticidi. Također, određeni kemoterapeutici mogu proizvesti kisikove radikale u dozama koje se koriste za liječenje karcinoma (Heber i sur., 2006). Kad molekula kisika primi jedan elektron, nastaje superoksidni radikal koji protoniranjem prelazi u vodikov peroksid:



Izvori superoksidnog radikala mogu biti enzimski (NADPH oksidaza, ksantin oksidaza), stanični (respiratorni lanac, djelovanje makrofaga i leukocita) te izvori iz okruženja (X-zrake, UV-svjetlo, toksične kemikalije) (Nimse i Pal, 2015; Štefan i sur., 2007). Vodikov peroksid može u prisustvu iona željeza i bakra dati reaktivni hidroksilni radikal koji je jedan od najsnažnijih oksidansa, a nastaje Fentonovom reakcijom:

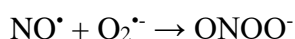


Drugi načini nastanka hidroksilnog radikala su radikalski put, odnosno dismutacija superoksidnog radikala te enzimski, odnosno neradikalski put, djelovanjem glikolat oksidaze, urat oksidaze i NADPH oksidaze (Štefan i sur., 2007).

Što se tiče RNS-a, enzim sintaza dušikovog oksida (NOS) stvara radikal dušikovog (II) oksida ( $\text{NO}^\bullet$ ) iz arginina:



Nastali  $\text{NO}^\bullet$  može zatim reagirati sa superoksidnim radikalom uz stvaranje peroksinitrita:



Peroksinitrit reagira s ostacima aromatskih aminokiselina u enzimima, pa dolazi do njihove nitracije i posljedično, inaktivacije enzima (Nimse i Pal, 2015).

### **1.6.1. OKSIDATIVNI STRES I NASTANAK RAKA**

O povezanosti raka s oksidativnim stresom i upalnim procesima piše se već dugi niz godina. Virchow je još u 19. stoljeću pretpostavio da tumori nastaju u područjima kronične upale, jer je otkrio prisutnost leukocita u malignom tkivu. U tumorskom, a i u okolnim tkivima, pronađeni su ROS, proinflamatorni citokini, kemokini, interleukini (IL-1, -6, -8) te faktori rasta koji djeluju preko NF- $\kappa$ B. Aktivacija nuklearnog faktora  $\kappa$ B može biti rezultat oksidativnog stresa.

Oštećenje bioloških molekula od strane ROS-a dovodi do pretjerane stanične proliferacije, migracije stanica i tumorske angiogeneze (Heber i sur., 2006). Reaktivni spojevi mogu oksidacijom DNA uzrokovati nastanak 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina, koji izaziva

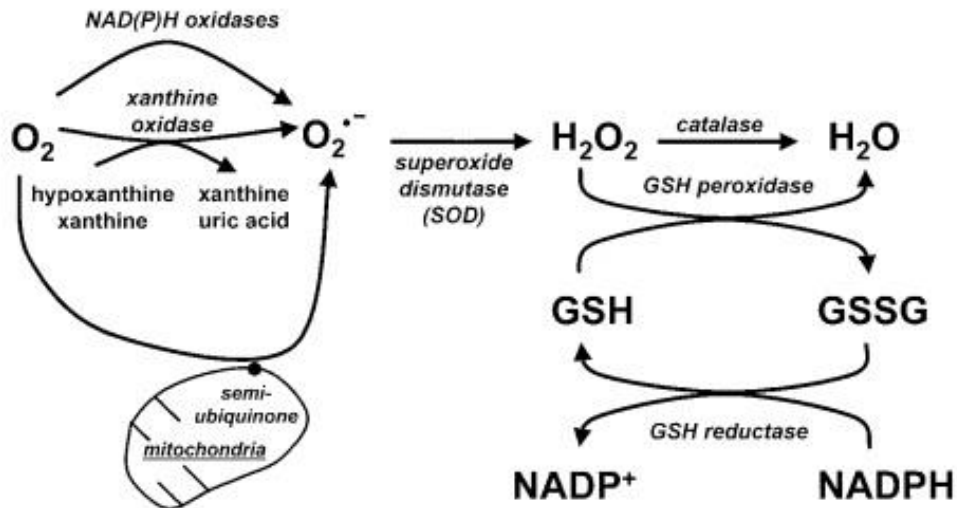
mutacije DNA, a nakupljanje takvih mutacija doprinosi karcinogenezi (Sosa i sur., 2013). Primjeri oštećenja DNA su: modifikacije DNA baza i/ili deoksiriboze koje dovode do mutacija, delecija, kidanja veza, inhibicije popravka DNA i posljedične izmjene staničnog signaliziranja. Promjena staničnog signaliziranja može se dogoditi uslijed modifikacije transkripcijskih faktora, receptora i protein kinaza/fosfataza. Sveukupno, to rezultira izmjenom staničnog rasta, diferencijacije i stanične smrti-apoptoze (Heber i sur., 2006).

ROS induciraju i lipidnu peroksidaciju te oštećuju staničnu membranu što dovodi do inaktivacije membranskih receptora i enzima te povećanja tkivne permeabilnosti. Produkti lipidne peroksidacije mogu dalje inaktivirati stanične proteine te dovesti do razvoja brojnih patoloških stanja, uključujući i rak. Osim što djeluju na DNA i lipide, ROS uzrokuju i fragmentaciju peptidnih lanaca, unakrsno povezivanje proteina, oksidaciju specifičnih aminokiselina te povećanu osjetljivost na proteolizu i posljedičnu degradaciju proteina (Birben i sur., 2012).

### 1.6.2. ANTIOKSIDANSI

Uloga antioksidansa je neutraliziranje učinaka slobodnih radikala te zaštita od njihovog štetnog djelovanja. Antioksidansi (tablica 3) u stanici djeluju tako da sprječavaju nastanak slobodnih radikala, neutraliziraju već nastale radikale, popravljaju oštećenja nastala njihovim djelovanjem te povećavaju uklanjanje oštećenih stanica (Štefan i sur., 2007). Ovisno o topljivosti, dijele se na hidrosolubilne (npr. vitamin C), koji se nalaze u citosolu, te na liposolubilne (npr. vitamin E, karotenoidi), koji se uglavnom nalaze u staničnim membranama. Postoji još jedna podjela, a to je na enzimatske i neenzimatske antioksidanse (Nimse i Pal, 2015; Pham-Huy i sur., 2008).

Enzimatski antioksidansi koji su uključeni u neutraliziranje ROS-a (slika 4) i RNS-a su: katalaza (CAT), superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR), tioredoksin reduktaza (TR) i peroksiredoksin (PRX) (Birben i sur., 2012; Pham-Huy i sur., 2008). SOD je prva linija obrane od slobodnih radikala, a katalizira pretvorbu superoksidnog anionskog radikala u vodikov peroksid i kisik:  $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . CAT i GPx kataliziraju pretvorbu vodikovog peroksida u kisik i vodu:  $2 H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$  (Pham-Huy i sur., 2008). GPx osim  $H_2O_2$  uklanja i organske perokside, a pritom oksidira reduciranu formu glutationa GSH u GSSG (Nimse i Pal, 2015; Pham-Huy i sur., 2008).



Slika 4. Putevi stvaranja i uklanjanja ROS (Dröge, 2002)

Neenzimatski antioksidansi dijele se na metaboličke i one unesene hranom. Endogeni antioksidansi koji se stvaraju metabolizmom u organizmu su glutation, koenzim Q10, lipoična kiselina, mokraćna kiselina, bilirubin i transferin. Egzogeni, koji se unose hranom su vitamin C, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi, omega-3 i omega-6 masne kiseline (Pham-Huy i sur., 2008).

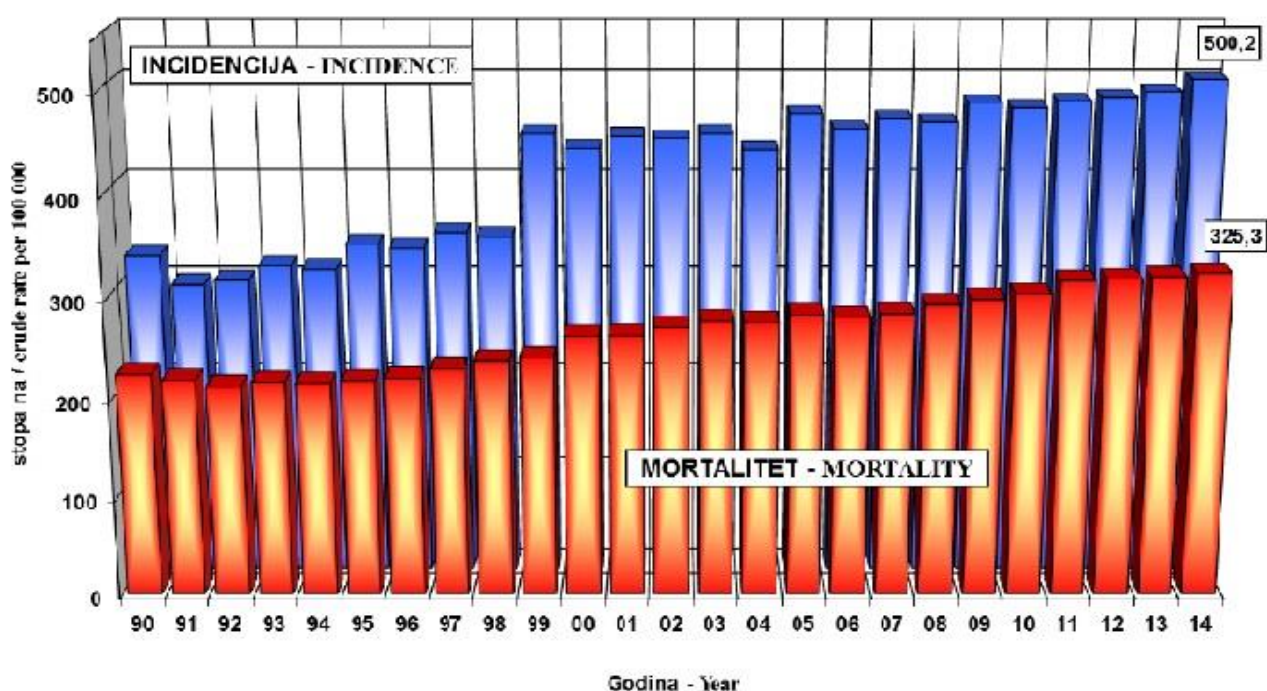
Tablica 3. Antioksidansi i njihovo djelovanje (Štefan i sur., 2007)

Antioksidans	Djelovanje
-superoksid dismutaze	-katalitički uklanjaju $O_2^{\bullet -}$
-katalaza	-uklanja $H_2O_2$ ( u velikim koncentracijama)
-glutation peroksidaze	-uklanjaju $H_2O_2$ ( u malim koncentracijama); i organske hidroperokside
-selen	-koenzim glutacion peroksidaza
-vitamin E	-kidanjem lanaca ostvaruje antioksidacijsko djelovanje
- $\beta$ -karoten	-uklanja singletni kisik i slobodne radikale
-vitamin C	-uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona
-koenzim Q	-djeluje antioksidativno u respiratornom lancu
-glutation	-uklanja radikale, koristi se za regeneraciju askorbata, te kao koenzim
-polifenoli	-uklanjaju slobodne radikale i vežu metalne ione
-transferin	-veže ione željeza
-urati	-vežu metale i uklanjaju radikale
-bilirubin	-uklanja peroksilne radikale

## 1.7. INCIDENCIJA RAKA U HRVATSKOJ

Registar za rak prikuplja podatke o osobama koje su oboljele od malignih bolesti te ih doživotno prati. Cilj je praćenje distribucije i incidencije raka u populaciji, preživljavanja i mogućih preventivnih mjera. Prikupljeni podaci u Registru za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo objavljuju se u biltenima. Rak je danas u svijetu po učestalosti drugi uzročnik smrti, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti. Prema podacima iz 2013.godine, godišnje se javlja oko 12,7 milijuna novih slučajeva, 7,6 milijuna ljudi umire od raka, dok 28 milijuna živi s rakom prvih 5 godina nakon postavljene dijagnoze. Najučestaliji su rak pluća, rak dojke i kolorektalni rak (Vrdoljak i sur., 2013).

Što se tiče Hrvatske, ukupni broj novodijagnosticiranih bolesnika 2014. godine iznosio je 21 434, od toga 11 389 muškaraca i 10 045 žena. Stopa incidencija bila je 500,2/100 000 osoba, odnosno 551,2/100 000 za muškarce i 452,8/100 000 za žene (slika 5). Od raka je 2014. godine u Hrvatskoj umrlo 13 939 osoba, 7911 muškaraca i 6028 žena. Stopa mortaliteta iznosila je 325,3/100 000. Pet najčešćih sijela raka kod muškaraca su: traheja, bronh i pluća (19%), prostata (15%), kolon (10%), rektum, rektosigma i anus (7%) i mokraćni mjehur (7%). Kod žena, najčešća sijela raka su: dojka (26%), traheja, bronh i pluća (8%), kolon (8%), tijelo maternice (6%) i štitnjača (5%) (Šekerija, 2016).



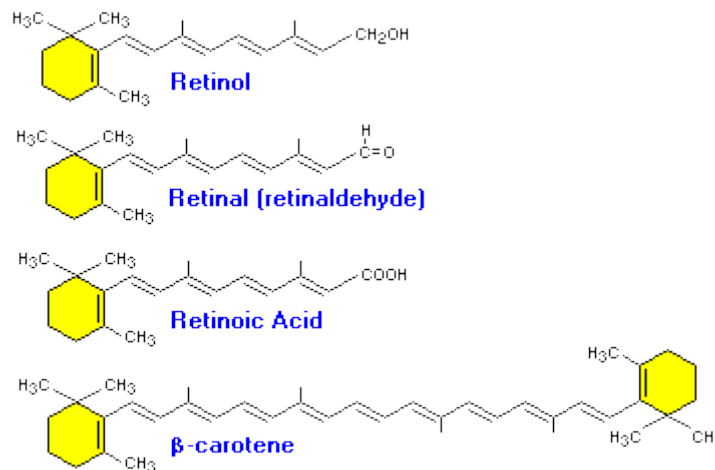
Slika 5. Stope incidencije i mortaliteta od raka u Hrvatskoj od 1990. do 2014. godine (Šekerija, 2016)

## 1.8. VITAMINI

Vitamine, esencijalne tvari neophodne za normalnu funkciju organizma, ljudi ne mogu sintetizirati u količinama dovoljnim za osiguranje fizioloških potreba pa se unose hranom. Dijele se na vitamine topljive u vodi (tiamin, riboflavin, niacin, pantotenska kiselina, piridoksin, folna kiselina, kobalamin, biotin i vitamin C) te liposolubilne vitamine topljive u mastima (vitamin A, D, E i K) (Combs, 2008).

## VITAMIN A

Vitamin A spada u skupinu liposolubilnih vitamina poznatih pod nazivom retinoidi te postoji u više oblika (slika 6): retinol (aktivni oblik), retinal, retinoična kiselina (Combs, 2008; Kedar i Che Prasad, 2004). Retinoidi se strukturno sastoje od  $\beta$ -iononskog prstena i polinezasićenog postraničnog lanca sa izoprenoidnim jedinicama (Siddikuzzaman i sur., 2011). U ovu grupu spadaju i provitamin A karotenoidi, koji se nalaze u biljkama, te daju voću i povrću žutu i narančastu boju. Najpoznatiji karotenoid je  $\beta$ -karoten, prekursor vitamina A. Karotenoidi se smatraju provitaminima A jer se u organizmu metaboliziraju u retinal, a reakciju katalizira enzim  $\beta$ -karoten-15,15'-deoksigenaza. Retinal se dalje u intestinalnoj mukozi reducira do retinola (Combs, 2008).

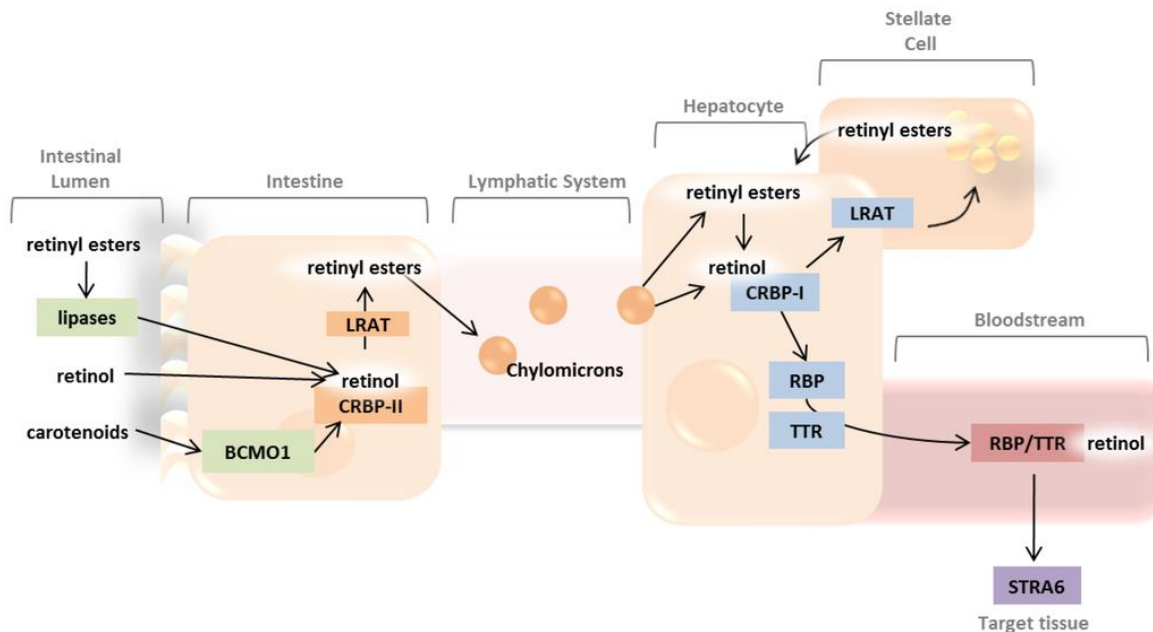


Slika 6. Struktura retinoida i  $\beta$ -karotena (<http://www.vivo.colostate.edu>)

Sisavci ne mogu sintetizirati vitamin A pa se on u obliku estera, najčešće retinil palmitata, unosi prehranom. Najbogatiji izvori su mlijeko, meso, jetra i riblje ulje. Apsorbira se u tankom crijevu, a u intestinalnom lumenu retinil esteri se hidroliziraju u retinol. Retinil esteri su hidrofobni pa je potrebna micelarna solubilizacija koja olakšava disperziju u vodeni medij i pristup hidrofobnim enzimima te omogućuje pasivnu difuziju u epitelne stanice mukoze. Retinol se veže na CRBP (celularni protein koji veže retinol), a LRAT (lecitin retinol aciltransferaza) esterificira retinol u retinil estere koji ulaze u limfu i transportiraju se uklopljeni u hilomikronime (slika 7). U jetri se apsorbiraju, hidroliziraju do retinola i pohranjuju u zvjezdastim stanicama, gdje se reesterificiraju (Combs, 2008; Tang i Gudas, 2011). Vitamin A se mobilizira iz jetre kao retinol i pomoću specifičnih proteina nosača RBP-a (protein koji veže retinol) i TTR-a (transtiretin), transportira u periferna tkiva. Vežanje



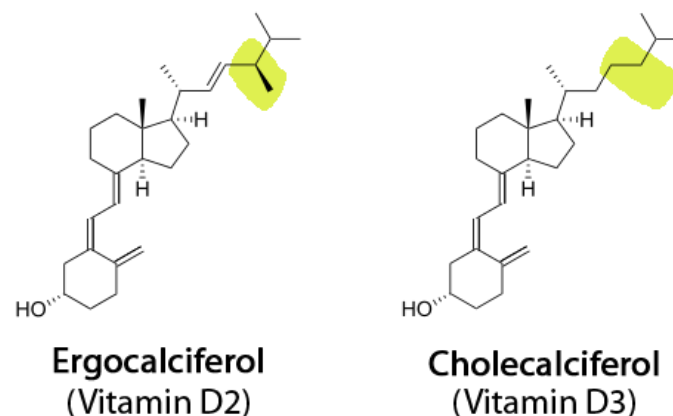
kompleksa RBP-TTR-retinol na membranski receptor STRA6 (stimuliran retinoičnom kiselinom 6) uzrokuje otpuštanje vitamina A i njegov unos u ciljnu stanicu (Perusek i Maeda, 2013).



Slika 7. Metabolizam vitamina A (Perusek i Maeda, 2013)

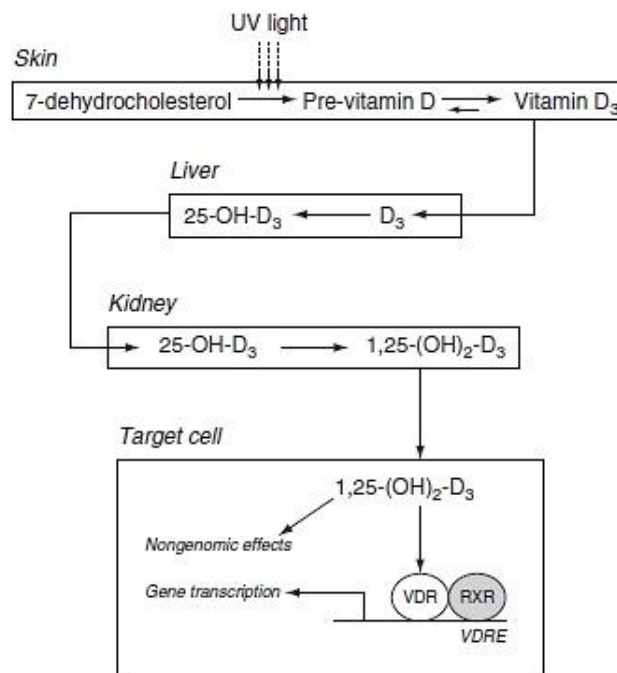
## VITAMIN D

Vitamin D naziva se još i vitaminom sunca, a zapravo je steroidni hormon koji se proizvodi u koži djelovanjem sunčevog svjetla. Međutim, kod mnogih ljudi, poput onih koji većinu vremena provode u zatvorenim prostorima ili žive u sjevernijim krajevima, količina sintetiziranog vitamina D ne zadovoljava potrebe organizma pa ga moraju unositi prehranom. Topljiv je u mastima i postoji u dvije forme, kao vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol) i D<sub>3</sub> (kolekalciferol) (slika 8).



Slika 8. Ergokalciferol i kolekalciferol (<http://clincalc.com>)

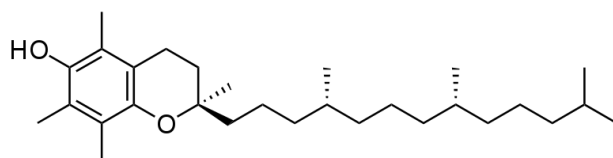
Ergokalciferol nastaje fotolizom iz sterola u biljkama, dok se kolekalciferol može sintetizirati i u koži (slika 9), pod djelovanjem UVB-zraka iz 7-dehidrokolesterola (Combs, 2008). Vitamin D koji je sintetiziran u koži ili unesen hranom cirkulacijom odlazi u jetru gdje se hidroksilira do 25(OH)D (25-hidroksivitamin D), a reakciju katalizira enzim D-25-hidroksilaza. Druga hidroksilacija događa se u proksimalnim tubulima bubrega te je katalizirana enzimom 25(OH)D-1-hidroksilaza (CYP27B1) i formira se 1,25(OH)<sub>2</sub>D (1,25-dihidroksivitamin D), aktivna forma vitamina D (Fleet i sur., 2012; Nair i Maseeh, 2012). Najviše ga ima u masnoj ribi (tuna, morski pas, losos, haringa), dok se u nekim zemljama hrana obogaćuje vitaminom D (Laktašić-Žerjavić i sur., 2011).



Slika 9. Metabolička aktivacija vitamina D (Combs, 2008)

## VITAMIN E

Vitamin E čini 8 različitih formi, 4 tokoferola (alfa, beta, gama, delta) i 4 tokotrienola (alfa, beta, gama, delta) (Constantinou i sur., 2008). Strukturno, derivat je kromana te sadrži kromanolni prsten i zasićeni fitilni pobočni lanac (tokoferoli) ili nezasićeni izoprenoidni lanac s tri dvostruke veze (tokotrienoli) (Gagic i sur.; Combs i sur., 2008). Glavni oblik vitamina E je  $\alpha$ -tokoferol (slika 10) koji je najzastupljeniji u hrani te ima najveću biodostupnost i koncentraciju u tkivima (Ren i sur., 2010).

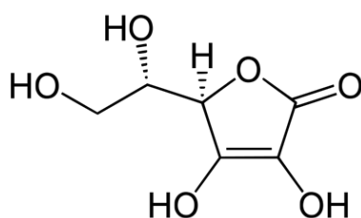


Slika 10.  $\alpha$ -tokoferol (<https://commons.wikimedia.org>)

Vitamin E sintetiziraju biljke, a njegov najbogatiji izvor su biljna ulja. Pšenične klice i suncokretovo ulje sadrže najviše  $\alpha$ -(*RRR*)-tokoferola, dok se  $\gamma$ -(*RRR*)-tokoferol pretežito nalazi u kukuruzu i sojinom ulju (Combs, 2008). Lipofilna je molekula uslijed čega je slabo topljiv u hidrofilnom mediju poput plazme, citosola i izvanstanične tekućine te se stoga tijekom apsorpcije, transporta i distribucije veže za specifične proteine i lipoproteine. Apsorbira se zajedno s mastima u tankom crijevu, ugrađuje u hilomikrone i transportira do jetre. Transportni protein  $\alpha$ -tokoferola ( $\alpha$ -TTP) je specifični protein koji u jetri selektivno veže  $\alpha$ -tokoferol, ugrađuje ga u VLDL (lipoprotein vrlo niske gustoće) i prenosi do tkiva. Ostali oblici vitamina E kraće se zadržavaju u organizmu i izlučuju putem žuči ili urina (Brigelius-Flohe i sur., 2002).

## VITAMIN C

Vitamin C (askorbinska kiselina) spada u skupinu vitamina topljivih u vodi te ima L- (slika 11) i D-enantiomer koji nije prisutan u prirodi i nema fiziološki značaj (Unlu i sur., 2016). Najvažniji izvori vitamina C su voće (limun, naranča, šipak, jagode, guava, grejp) i povrće (brokula, cvjetača, kupus, paprika, špinat, peršin) (Combs, 2008).



Slika 11. L-askorbinska kiselina ([en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org))

Može se sintetizirati u većini biljaka i životinja iz D-glukoze i D-galaktoze, no ne i u čovjeku zbog nedostatka enzima L-gulonolakton oksidaze. Iz tog razloga vitamin C treba prehranom unositi u organizam (Unlu i sur., 2016).

Apsorpcija vitamina C vrši se pasivnom difuzijom ili aktivnim transportom putem saturabilnog nosača. Učinkovitost apsorpcije fizioloških doza iznosi 80-90%, a pada kod doza većih od 1 g (Combs, 2008). Askorbinska kiselina nepromijenjena prolazi kroz glomerule i aktivno se resorbira u tubulima bubrega. Kod doza većih od 100 mg/dan dolazi do zasićenja transportnih proteina te se vitamin C dalje ne resorbira već izlučuje urinom. L-askorbinska kiselina prenosi se u stanice transporterima vitamina C ovisnim o natriju (SVTC), a L-dehidroaskorbinska kiselina (DHA) koristi transportere glukoze (GLUT) (Domitrović 2006 i Combs, 2008). Osim nepromijenjene askorbinske kiseline, urinom se izlučuju i metaboliti poput dehidroaskorbinske kiseline, diketoglukuronske kiseline, oksalata i askorbat 2-sulfata u manjim količinama (Combs, 2008).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rak je u današnje vrijeme veliki javnozdravstveni problem, a prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) oko 14% svih smrtnih slučajeva u svijetu rezultat je malignih bolesti. Rizični čimbenici za oboljevanje od raka su genetski faktori, obiteljska anamneza, faktori okoliša, pušenje, prevelika konzumacija alkohola, smanjena fizička aktivnost te nepravilna prehrana. S obzirom na očekivani rast incidencije raka za 18% do 2030. godine te činjenicu da se oko 30-40% svih slučajeva raka može prevenirati s adekvatnom prehranom, bitno je poznavati učinkovitost i mehanizam djelovanja kemoprotektivnih tvari prisutnih u hrani. Antikancerogene (kemoprotektivne) djelatne tvari mogu spriječiti razvoj tumora, smanjiti njihov rast, potaknuti smrt tumorskih stanica ili poboljšati funkciju imunološkog sustava. Vitamini su tvari koje se unose svakodnevnom prehranom, bitni su za normalnu funkciju našeg organizma, a njihovo antitumorsko djelovanje istražuje se već dugi niz godina. Najistraživaniji u tom polju su vitamini A, D, E i C te su upravo oni odabrani kao predmet ovog istraživanja.

Stoga je cilj ovog rada dati pregled najnovijih saznanja o ulozi vitamina A, D, E i C kao najučinkovitijih u prevenciji i terapiji raka te naglasiti važnost njihovog redovitog unosa putem hrane ili preko suplemenata.

### 3. MATERIJALI I METODE

Za izradu ovog diplomskog rada korištena je stručna i znanstvena literatura na temu antitumorskog djelovanja vitamina. Pritom su korištene knjige i radovi objavljeni u stručnim i znanstvenim časopisima. Pregledane knjige uglavnom su iz Nacionalne i sveučilišne knjižnice, a znanstveni članci su pronađeni online u bazama podataka. Korištene baze podataka su PubMed, ScienceDirect i Cochrane Library, a pretraživanje je provedeno po ključnim riječima: *cancer, carcinogenesis, oxidative stress, antioxidants, vitamin A, vitamin D, vitamin C, vitamin E*.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. VITAMIN A

Vitamin A ima važnu ulogu u fiziološkim procesima poput vida, reprodukcije, imunosne funkcije, embrionalnog razvoja te diferencijacije i održavanja epitelnih tkiva (tablica 4). Njegov nedostatak može uzrokovati gubitak vida, noćnu sljepoću, atrofiju testisa, skraćenje i zadebljanje kostiju te imunodeficijenciju, dok njegov suvišak može rezultirati teratogenošću (Doldo i sur., 2015).

Tablica 4. Funkcionalne forme vitamina A (Combs, 2008)

Aktivna forma:	Funkcija:
-retinol	-transport, reprodukcija (sisavci)
-retinal	-vid
-retinoična kiselina	-diferencijacija epitela
-retinil esteri	-pohrana

Jedan od mehanizama djelovanja vitamina A je regulacija genske transkripcije. Preko nuklearnih receptora, receptora retinoične kiseline (RARs) i retinoidnih X receptora (RXRs), koji se sastoje od tri podtipa ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -RAR i  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -RXR), mogu regulirati gensku ekspresiju vežući se za RAREs (elementi odgovora retinoične kiseline) i RXREs (elementi odgovora retinoidnih x receptora) u regulatornoj regiji ciljnih gena. All-trans RA i 9-cis RA aktiviraju RARs, dok samo 9-cis RA aktivira RXRs (Doldo i sur., 2015).

Kao jedinice za vitamin A koriste se RAE (ekvivalenti aktivnosti retinola) i IU (internacionalne jedinice) (tablica 5):

1 IU retinola = 0,3  $\mu$ g RAE

1 IU  $\beta$ -karotena iz dodataka prehrani = 0,15  $\mu$ g RAE

1 IU  $\beta$ -karotena iz hrane = 0,05  $\mu$ g RAE

1 IU  $\alpha$ -karotena ili  $\beta$ -kriptoksantina = 0,025  $\mu$ g RAE

Tablica 5. Preporučeni dnevni unos (RDA) za vitamin A (www.ods.od.nih.gov)

Dob	RDA ( $\mu\text{g}$ RAE)
0-6 mj.	400*
7-12 mj.	500*
djeca 1-13 god.	300-600
odrasli > 14 god.	700 žene / 900 muškarci
trudnice	770
dojilje	1300

\*AI = adekvatni unos (nema dovoljno informacija i dokaza za utvrđivanje RDA)

#### 4.1.1. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA A

Retinoidi se koriste kao antitumorski agensi zahvaljujući svom diferencijacijskom, proapoptotskom, antiproliferativnom i antioksidativnom djelovanju. Mogu inhibirati rast i razvoj različitih tipova tumora. Smanjuju incidenciju kemijski induciranih tumora, a studije na animalnim modelima i humanim staničnim linijama pokazale su zastoj rasta, apoptozu ili diferencijaciju tumorskih stanica (Doldo i sur., 2015). Pošto imaju sposobnost inhibirati progresiju stanica iz premaligne u malignu fazu, retinoidi se koriste u rutinskom tretmanu prekarcinogenih stanja, poput leukoplakije, cervikalne displazije i aktinske keratoze. Također, kod *xeroderme pigmentosum* mogu odgoditi razvoj bolesti do raka kože (Altucci i Gronemeyer, 2001).

##### 4.1.1.1. Regulacija genske transkripcije

RAR i RXR su transkripcijski faktori koji djeluju kao RAR-RXR heterodimeri, a vezanjem na RAREs u promotorskim regijama potiču transkripciju ciljnih gena te djeluju na brojne signalne puteve. RARs reguliraju transkripciju ulazeći u interakciju s korepresorskim ili koaktivatorskim proteinima. Glavni korepresori su NcoR (nuklearni receptor korepresor) i SMRT (posrednik utišavanja za receptore retinoida ili tiroidnih hormona), a korepresorski kompleks sadrži i histon deacetilazu (HDAC). Vezanjem korepresora dolazi do deacetilacije histona, zbijanja kromatina, utišavanja promotorske regije ciljnih gena što rezultira represijom transkripcije (Altucci i Gronemeyer, 2001). Kad se na RAR-RXR heterodimer veže RA,  $\alpha$ -heliks 12, koji se nalazi na C-terminalnom kraju ligand vezajuće domene, mijenja se



trodimenzionalna površina RAR-a. Dolazi do alosteričke promjene koja omogućava vezanje koaktivatora, odnosno otpuštanje korepresora. Koaktivatori su SRC-1, -2, -3 te proteini koji sadrže histon acetiltransferaznu aktivnost (HAT), poput p300. Vezanjem koaktivatora dolazi do dekondezacije kromatina, vezanja RAR/RXR na RARE, te transkripcijske aktivacije ciljnih gena (Tang i Gudas, 2011).

#### **4.1.1.2. RAR- $\beta$ 2 u tumorima**

Smatra se da je antitumorsko djelovanje, inducirano od strane RA, većim dijelom regulirano s RAR- $\beta$ 2. RAR- $\beta$  posreduje u zaustavljanju staničnog rasta i diferencijacije stanica raka (Arisi i sur., 2014). Primarno je eksprimiran u normalnim epitelnim tkivima, dok je kod malignih epitelnih staničnih linija nekih vrsta karcinoma uočeno smanjenje ili potpuni nedostatak ekspresije RAR- $\beta$  (Seewaldt i sur., 1995).

RAR- $\beta$ 2 genska ekspresija često je izgubljena tijekom procesa karcinogeneze pa su i retinoidni signalni putevi u stanicama raka narušeni. Utišavanje ekspresije RAR- $\beta$ 2 u stanicama karcinoma događa se zbog hipermetilacije cpG regija RAR- $\beta$ 2 promotora. Povišene razine transkripcijskih korepresora u tumorima doprinose smanjenju transkripcijske aktivacije ciljnih gena, izazivaju abnormalno regrutiranje DNA-metiltransferaza na RAR- $\beta$ 2 promotor, a vjerojatno i na RAR ciljne gene. Primjerice, PRAME protein je ligand-ovisni korepresor, a njegovo povišenje u tumorima rezultira smanjenjem RAR- $\beta$ 2 signalizacije. U normalnim hematopoetskim progenitorskim stanicama njegova pretjerana ekspresija inhibira mijeloidnu diferencijaciju. Povećana aktivnost AKT signalnih puteva u tumorskim stanicama može povećati afinitet korepresora SMRT za RARE RAR- $\beta$ 2 te time smanjiti njegovu transkripciju. Postoji još jedan mehanizam za koji se smatra da utišava RAR- $\beta$ 2 u tumorima, a to je gubitak ekspresije RAR- specifičnih koaktivatora (Tang i Gudas, 2011).

#### **4.1.1.3. Djelovanje vitamina A na staničnu proliferaciju**

Retinoidi mogu inhibirati progresiju staničnog ciklusa tumorskih stanica djelujući na CDKs (ciklin-ovisne kinaze), cikline i inhibitore staničnog ciklusa. RA zaustavlja stanični ciklus u G<sub>1</sub> fazi, a to je djelovanje predominantno regulirano s RAR- $\beta$ 2.

Za prelazak iz G<sub>1</sub> u S fazu bitni su D1, D2 i D3 ciklini te E1 i E2 ciklini. D-ciklini se vežu za CDK4 i CDK6 te potiču progresiju staničnog ciklusa, a često su prekomjerno eksprimirani kod tumora, posebice ciklin D1. Retinoidi potiču njegovu proteolizu, smanjujući mu time

razinu u stanicama. To dovodi do smanjene aktivnosti CDK i smanjene fosforilacije Rb proteina (Tang i Gudas, 2011). *Rb* je tumorsupresorski gen, čija je aktivnost u staničnom ciklusu regulirana promjenama u njegovoj fosforilaciji. Kad nije dovoljno fosforiliran, Rb se veže za E2F transkripcijski faktor, koji regulira ekspresiju gena koji kodiraju za ciklin E te djeluje kao represor i zaustavlja transkripciju gena i progresiju staničnog ciklusa. Fosforilacija Rb proteina od strane Cdk 4,6/ciklin D rezultira njegovim odvajanjem od E2F i aktiviranjem transkripcije (Cooper i Hausman, 2004). Dakle, smanjenjem fosforilacije Rb proteina, posljedično ne dolazi do ekspresije ciklina E1 i E2 pa stanica ne može ući u S fazu. U humanim mijeloidnim staničnim linijama te u stanicama bronhijalnog epitela, retinoidi potiču proteasomalnu degradaciju ciklina D3, E i CDK 2, 4. RA smanjuje aktivnost CDK, fosforilaciju Rb proteina, te ekspresiju *c-myc* (Tang i Gudas, 2011).

#### **4.1.1.4. Djelovanje vitamina A na indukciju apoptoze**

Retinoidi induciraju apoptozu u tumorskim stanicama. Primjerice, kod staničnih linija mijeloidne leukemije i stanica akutne T-limfoblastične leukemije, vezanje RA na RAR $\alpha$  uzrokuje apoptozu. U akutnoj promijelocitnoj leukemiji (APL) retinoidi potiču post-maturacijsku apoptozu blasta indukcijom TRAIL, tumor selektivnog liganda, koji izaziva smrt stanice (Tang i Gudas, 2011). TRAIL (ligand koji inducira apoptozu povezan s tumorskim faktorom nekroze) je poznat i pod nazivom APO-2L, a član je TNF obitelji. Inducira apoptozu u transformiranim, tumorskim stanicama, dok na normalne stanice ne djeluje citotoksično. Zbog toga se smatra dobrim tumor-selektivnim, antikancerogenim agensom. RA povećava ekspresiju receptora TRAIL-R1 (poznat i kao DR4), RAR-ovisnim mehanizmom te time potiče TRAIL-induciranu apoptozu (Dhandapani i sur., 2011).

Vezanjem Fas liganda za Fas receptor (član 6 TNF obitelji receptora) dolazi do formiranja kompleksa za izazivanje smrti stanice, a sličnu ulogu ima i prokaspaza-8. Njenom se aktivacijom aktiviraju efektorske kaspaze, koje vode do apoptoze. Kaspaze-8 često su utišane ili odsutne u neuroblastomu i drugim tumorima. RA povećava ekspresiju kaspaze-8 u staničnim linijama neuroblastoma, meduloblastoma i raka pluća malih stanica. Primjerice, u istraživanju Jiang i suradnika, dvodnevni tretman staničnih linija NB10 s RA rezultirao je kontinuiranom ekspresijom kaspaze-8 idućih 120 dana (Jiang i sur., 2008).

#### **4.1.1.5. Blokiranje promocije tumora inhibiranjem AP1**

Fos i Jun su dijelovi transkripcijskog faktora AP1 koji aktivira transkripciju gena nakon stimulacije faktorima rasta. Zbog poremećene ekspresije Fos ili Jun onkogenog proteina, može doći do konstitutivne aktivnosti AP1, a posljedično do snažne proliferacije koja uzrokuje malignu transformaciju stanice (Cooper i Hausman, 2004). Antitumorski učinci retinola proučavani su na kemijski induciranom raku kože, gdje je kao promotor tumora korišten forbolni ester (Altucci i Gronemeyer, 2001). Istraživanje je pokazalo da retinoidi blokiraju promociju tumora inhibirajući AP1 aktivnost induciranu forbolnim esterima. RAR $\beta$ 2/RXR djeluju na AP1 na više pretpostavljenih mehanizama. Inhibiraju c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK), enzim koji fosforilacijom c-Jun potiče njegovu stabilnost i formiranje AP1. Mogu direktno ulaziti u interakciju s Jun/Fos članovima, a mogu i poremetiti dimerizaciju Jun-Fos te tako spriječiti stvaranje AP1 kompleksa. Osim toga, kompeticijom s AP1 sprječavaju regrutiranje koaktivatora poput p300 (Gariglio i sur., 2009).

#### **4.1.2. KAROTENOIDI KAO ANTIOKSIDANSI**

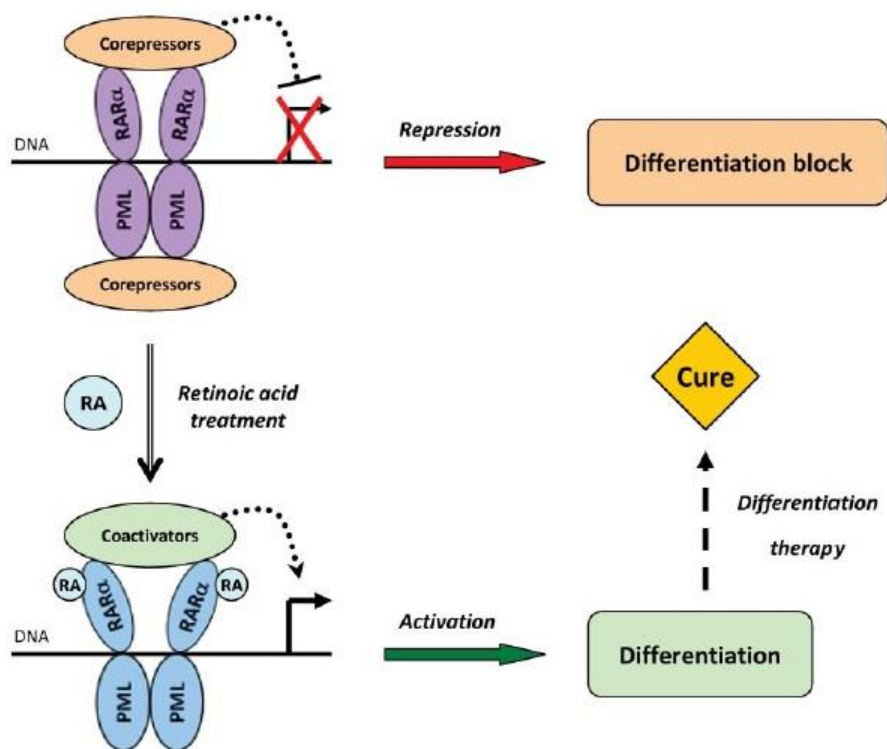
Karotenoidi su poznati prekursori vitamina A, a oni sami djeluju kao antioksidansi. Igraju važnu ulogu u hvatanju reaktivnih kisikovih spojeva i singleta kisika, što naposljetku rezultira sprječavanjem oksidativnog stresa. Zahvaljujući svom antioksidacijskom djelovanju, imaju protektivnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih bolesti ili različitih tipova tumora. Brojna su istraživanja pokazala pozitivnu korelaciju između unosa hrane bogate karotenoidima poput voća, povrća i smanjenog rizika od raka (Fiedor i Burda, 2014).

#### **4.1.3. VITAMIN A U AKUTNOJ PROMIJELOCITNOJ LEUKEMIJI**

U liječenju APL-a retinoidi djeluju kao kemoprotektivni agensi. Akutna promijelocitna leukemija je podtip akutne mijeloične leukemije, a nastaje zbog nekontrolirane ekspanzije i nakupljanja nezrelih stanica s obilježjima promijelocita u koštanoj srži. Uzrok tome je recipročna translokacija između kromosoma 15 i 17. Na kromosomu 15q21 nalazi se gen promijelocitne leukemije (PML), odgovoran za stvaranje nuklearnih tijela i regulaciju samoobnove matičnih stanica. Translokacijom dolazi do fuzije *PML* gena s genom za RAR $\alpha$ , koji se nalazi na kromosomu 17q21, uz formiranje onkoproteina PML-RAR $\alpha$ . On uzrokuje

pojačanu proliferaciju i inhibira terminalnu diferencijaciju hematopoetskih stanica (Doldo i sur., 2015).

PML-RAR $\alpha$  može formirati kompleks sa HDAC, koja zatim regrutira DNA metil-transferaze na promotore RAR $\beta$ -2 koje inaktivira hipermetilacijom. RA se veže za ligand-vezajuću domenu PML-RAR $\alpha$  (slika 12) i uzrokuje disocijaciju PML-RAR $\alpha$ -HDAC korepresorskog kompleksa što dovodi do transkripcijske aktivacije i diferencijacije stanica leukemije (Combs, 2008; Altucci i Gronemeyer, 2001). Ciljni geni, čija je transkripcija primarno bila zaustavljena zbog djelovanja PML-RAR $\alpha$ , počinju se transkribirati što rezultira brzom diferencijacijom i vodi do remisije bolesti (Ablain i de The, 2011). Većina APL pacijenata, čak 80%, pozitivno reagira na terapiju retinoidima (Combs, 2008).



Slika 12. Djelovanje retinoične kiseline na APL (Ablain i de The, 2011)

#### 4.1.4. SINTETSKI RETINOIDI

Sintetski retinoidi, poput fenretinida (4-HPR), ispituju se u pretkliničkim studijama obzirom na pokazanu citotoksičnu aktivnost u tumorskim stanicama inducirajući apoptotsku staničnu smrt. Osim toga, on inhibira tumorsku angiogenezu, potiče stvaranje NK stanica (stanice prirodne ubojice) te generira ROS u tumorskim stanicama (Doldo i sur., 2015). Na animalnim modelima je pokazao protektivno djelovanje kod kemijski induciranih tumora

dojke, mokraćnog mjehura, prostate i kože (Arisi i sur., 2014). TAC-101, sintetski retinoid, je učinkovit u inhibiciji rasta tumora jetre, dok je Bexaroten, koji se specifično veže za RXR, odobren za sistemsko i topikalno liječenje kožnog T-staničnog limfoma, a ima učinke i na stanični rast i diferencijaciju. Tazaroten se koristi topikalno u liječenju karcinoma bazalnih stanica (Doldo i sur., 2015).

## 4.2. VITAMIN D

Vitamin D ima ulogu u održavanju homeostaze kalcija i fosfata, sudjeluje u remodeliranju kostiju i regulaciji imunskog sustava, a bitan je i za diferencijaciju i proliferaciju stanica. Njegov nedostatak uzrokuje rahitis kod djece i osteomalaciju kod odraslih, a povezuje se i s osteoporozom, razvojem raka, autoimunim bolestima, kardiovaskularnim bolestima, bakterijskim i virusnim infekcijama, upalnim bolestima crijeva te neurokognitivnim poremećajima (Hii i Ferrante, 2016).

Djeluje kao steroidni hormon i modulira funkciju brojnih gena. Regulira gene uključene u staničnu diferencijaciju i proliferaciju, hormonsku signalizaciju, homeostazu minerala, onkogenih i kromosomskih proteina (Combs, 2008). Svoje djelovanje ostvaruje preko nengenomskih i genomskih učinaka. Nengenomski učinci nastaju vezanjem vitamina D na membranske receptore. Kaskada događaja dovodi do stvaranja sekundarnih glasnika ili fosforilacije intracelularnih proteina koji uzrokuju aktivaciju enzima, a posljedično se modulira aktivnost stanice. Genomski učinci nastaju tako da vitamin D ulazi u stanicu i veže se za VDR (receptor vitamina D) u jezgri (Laktašić-Žerjavić i sur., 2011). Vežući se za VDR,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  može modulirati aktivnost određenih gena. Za transkripcijsku aktivaciju VDR potrebno je da se aktivni oblik vitamina D veže za receptor što potiče udruživanje heterodimera VDR i RXR.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  – VDR – RXR kompleks se u jezgri veže za VDREs (elemente odgovora vitamina D) te počinje transkripcija gena, a posljedično i sinteza proteina za koje kodiraju (Fleet i sur., 2012).

Preporučeni dnevni unos (RDA) vitamina D ovisi o životnoj dobi i izražava se u internacionalnim jedinicama (tablica 6).

Tablica 6. Preporučeni dnevni unos (RDA) za vitamin D (www.cancer.gov)

Dob	RDA (IU/dan)
0-1 god.	400
1-70 god.	600
trudnice i dojilje	600
stariji od 70 god.	800

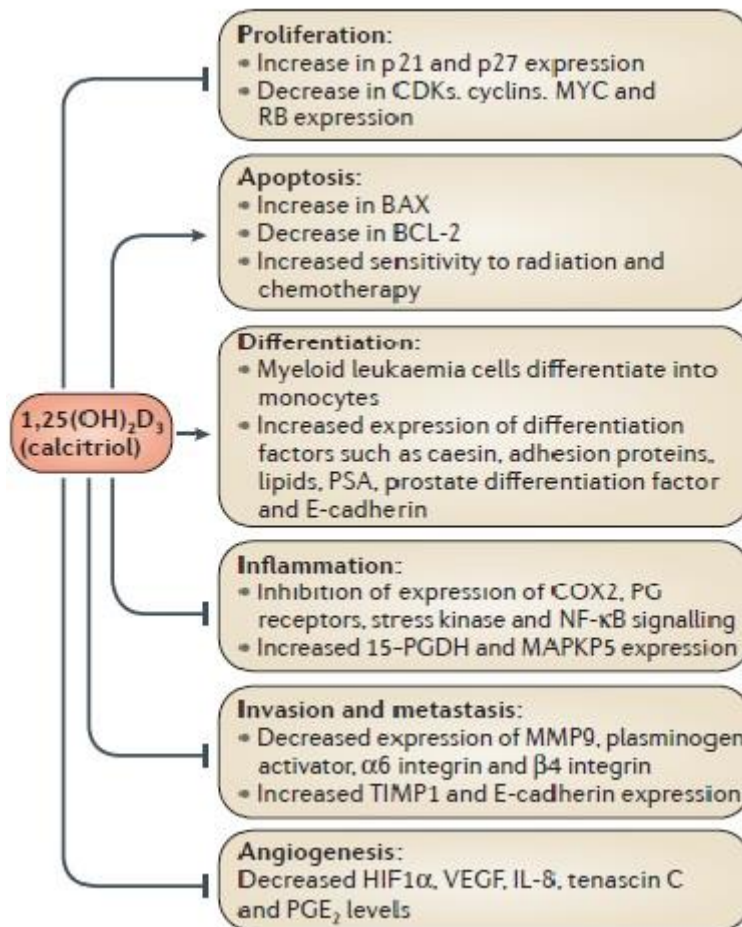
\*1  $\mu\text{g}$  vitamina D = 40 IU (*International Units*) internacionalnih jedinica

## **DEFICIT VITAMINA D**

Smatra se da nedostatak vitamina D pogađa oko 50% svjetske populacije, zbog faktora okoliša i načina života. Glavni pokazatelj nedostatka vitamina D je niska razina 25(OH)D u serumu. Deficit se definira kod koncentracija 25(OH)D manjih od 29 ng/mL (Nair i Maseeh, 2012). Starija životna dob, tamnija koža, ženski spol, prehrana siromašna vitaminom D i manje izlaganje suncu važni su čimbenici rizika povezani s nedostatkom vitamina D (Laktašić-Žerjavić i sur., 2011). Primjerice crnci, u usporedbi s bijelcima, trebaju 3-5 puta dulju izloženost sunčevom svjetlu da bi proizveli istu količinu vitamina D. Također, krema za sunčanje sa zaštitnim faktorom 30 smanjuje sintezu vitamina D za čak 95% (Nair i Maseeh, 2012). Stvaranje vitamina D u koži ovisi i o zemljopisnoj širini te godišnjem dobu. Na području zemljopisnih širina udaljenijih od ekvatora, od 10. do 3.mjeseca u godini, u koži se proizvodi malo vitamina D bez obzira na vrijeme provedeno na suncu. U ostatku godine, dovoljno je izložiti kožu suncu 10-15 minuta kako bi se stvorila dovoljna količina vitamina D. Što se tiče životne dobi, osobe starije od 70 godina imaju tek trećinu sposobnosti stvaranja vitamina D u usporedbi s osobom od 20 godina (Laktašić-Žerjavić i sur., 2011).

### **4.2.1. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA D**

Još 1980. godine utvrđena je povezanost vitamina D s rakom i uočene su više stope raka u sjevernom dijelu Amerike u usporedbi s južnijim predjelima. Jedan od razloga tome je smanjeno stvaranje vitamina D u koži, za koje je bitno izlaganje sunčevom svjetlu, odnosno UV-zrakama (Fleet i sur., 2012). Brojna kasnije provedena istraživanja pokazala su povezanost deficita vitamina D s pojavom nekih tipova tumora. Također, uočeno je i da vitamin D jako povoljno djeluje na prevenciju i terapiju raka kolona, dojke, prostate i jajnika (Garland i sur., 2006). Smanjuje proliferaciju tumorskih stanica, povećava staničnu diferencijaciju, djeluje antiinflamatorno i sprječava rast novih krvnih žila (Nair i Maseeh, 2012). Može se koristiti kao adjuvantna terapija u kombiniranoj kemoterapiji gdje svojim antitumorskim mehanizmima (slika 13) doprinosi učinku citotoksičnog agensa (Chakraborti, 2011).



Slika 13. Mehanizmi antitumorskog djelovanja vitamina D (Feldman i sur., 2014)

## ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE

Vitamin D inhibira rast proliferirajućih epitelnih stanica, a za inhibiciju rasta posredovanu s 1,25(OH)<sub>2</sub>D neophodan je VDR. U prilog tome idu istraživanja s mišjim epidermalnim keratinocima i stanicama osteosarkoma gdje je učinak inhibicije rasta izostao zbog odsutnosti VDR-a. Jedno od istraživanja pokazalo je smanjenje rasta stanica melanoma tretiranih s 1,25(OH)<sub>2</sub>D, a taj je učinak zabilježen i kod stanica raka kolona, dojke i prostate (Fleet i sur., 2012). Vitamin D djeluje antiproliferativno na više načina:

- Povećava ekspresiju p21 i p27, inhibitora CDK, čime smanjuje aktivnost CDK i vodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G<sub>1</sub> fazi (Feldman i sur., 2014).

Vitamin D djeluje direktno na aktivaciju transkripcije p21, što dokazuje činjenica da je u promotoru *p21* gena pronađen VDRE. Nadalje, p21 uzrokuje inaktivaciju ciklin/CDK kompleksa, prevenira fosforilaciju Rb proteina i dovodi do zaustavljanja



staničnog ciklusa. Oštećena DNA time dobiva dovoljno vremena za popravak (Chakraborti, 2011).

- Izaziva represiju proto-onkogen *myc* te modulira intracelularne kinazne puteve poput p38 MAPK (p38 protein kinaza aktivirana mitogenom), ERK (kinaza regulirana izvanstaničnim signalima) i PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaza) (Feldman i sur., 2014). *Myc* je onkogen čiji poremećaji u ekspresiji doprinose razvoju različitih tumora kod ljudi dok se p38 MAP-kinaza aktivira u odgovoru na stanični stres i upalne citokine. ERK signaliziranje vodi do stanične proliferacije, preživljavanja i diferencijacije (Cooper i Hausman, 2004).
- Gen *CST5* kodira za formiranje cistatina D, a može ga aktivirati kalcitriol tako što se veže za VDR i aktivira *CST5* promotor u DNA. To vodi do povećanja *CST5* RNA i povišene razine cistatina D kod raka. Cistatin D djeluje antitumorski i antimetastatski, inhibira endogene cistein proteaze koje uzrokuju progresiju raka kolona, antagonizira wnt/ $\beta$ -katenin signalni put te izaziva represiju protoonkogen *c-myc*. Također, inducira ekspresiju E-kadherina koji inhibira tumorsku progresiju i metastaze (Chakraborti, 2011).
- Inhibira inzulinu sličan faktor rasta-1 (IGF-1) povećavajući ekspresiju IGF-vezajućeg proteina 3 (IGFBP3) (Feldman i sur., 2014).

Istraživanja su pokazala vezu između povišenih razina IGF-1 i proliferacije neoplastičnih stanica. IGF su važni za stanični rast, potiču progresiju staničnog ciklusa, angiogenezu i metastaze tumora, a djeluju preko IGF-1 receptora. U cirkulaciji formiraju kompleks sa IGFBPs, a kad se taj kompleks nađe u tkivu, IGFBP može inhibirati interakciju IGF s receptorom zbog toga što ima veći afinitet za IGF, koji tada ne može ispoljiti svoje učinke. O bioaktivnosti IGF u mikrokolišu stanice sa oštećenom DNA ovisi hoće li ona preživjeti i razviti se u malignu staničnu liniju ili će doći do apoptoze. U okolišu sa višim razinama IGF, oštećene stanice sklonije su preživljavanju, što pogoduje pojavi malignih klonova, a time i razvoju tumora (Brahmkhatri i sur., 2015).

## INDUKCIJA APOPTOZE

Disregulacija apoptoze, programirane stanične smrti, može dovesti do nenormalne proliferacije malignih stanica. U prevenciji razvoja, rasta i metastaziranja tumora važnu ulogu imaju pro-apoptotske komponente. Nakon oštećenja DNA, popravak je posredovan s p21

proteinima, a ukoliko se to ne dogodi, p21 djeluje pro-apoptotski zajedno sa BAX (bcl-2 vezan X protein) (Chakraborti, 2011).

U normalnim uvjetima, citokrom C se nalazi u međumembranskom prostoru mitohondrija, a u citosolu su inaktivirana kaspaza-9 i Apaf-1 (aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze) (Cooper i Hausman, 2004). Pro-apoptotska komponenta BAX stimulira otpuštanje citokroma C iz mitohondrija, dok anti-apoptotski Bcl-2 to inhibira. Citokrom C zatim formira kompleks s Apaf-1 koji ulazi u interakciju s aktiviranom prokaspazom 9 te se aktiviraju efektorske kaspaze i dolazi do apoptoze (Chakraborti, 2011). U slučaju kromosomske translokacije dolazi do pojačane ekspresije *Bcl-2* pa nastaje *Bcl-2* onkogen. On sprječava apoptozu i omogućuje stanicama da prežive u uvjetima koji bi normalno doveli do stanične smrti (Cooper i Hausman, 2004). Vitamin D inducira apoptozu u stanicama raka tako što suprimira anti-apoptotske gene poput *Bcl-2*, a stimulira pro-apoptotski gen *BAX* (Feldman i sur., 2014).

## **STIMULACIJA DIFERENCIJACIJE**

Prodiferencijacijski učinci vitamina D u tumorima ovise o tipu stanice, a uključuju regulaciju signalnih puteva s  $\beta$ -kateninom, PI3K, JNK i NF $\kappa$ B (Krishnan i sur., 2012). Kao odgovor na vitamin D, neke stanice raka mogu prijeći iz malignog u normalni, zreli fenotip. Primjer je diferencijacija humanih mijeloidnih stanica leukemije u monocite i makrofage. Također, kalcitriol kod raka dojke inducira stvaranje diferencijacijskih faktora poput adhezijskih proteina i lipida te kazeina, a kod raka prostate povećava ekspresiju *PSA* (prostata-specifični antigen) i *BMP6* (morfogenetski koštani protein 6). Nadalje, u stanicama raka kolona vitamin D uzrokuje indukciju markera diferencijacije epitelnih stanica (Feldman i sur., 2014).

## **ANTIINFLAMATORNI UČINCI**

Upalni procesi mogu biti jedan od rizičnih faktora za razvoj tumora, a vitamin D djeluje antiinflamatorno na više načina: inhibira NF $\kappa$ B, ekspresiju ciklooksigenaze-2 (COX-2) i metabolizam prostaglandina te stvaranje proinflamatornih citokina.

- Inhibira NF $\kappa$ B signalizaciju. NF $\kappa$ B je transkripcijski faktor, uključen u regulaciju imunskog odgovora i upalnih procesa, a u malignim stanicama često je prisutan u povišenim koncentracijama. Kod miševa bez VDR-a uočena je smanjena razina NF $\kappa$ B

inhibitornog proteina, I $\kappa$ B. Dodatak antagonista VDR-a kod stanica raka kolona povećava aktivnost NF $\kappa$ B, smanjujući razinu I $\kappa$ B što dovodi do zaključka da VDR ligandi, pa tako i kalcitriol, suprimiraju aktivnost NF $\kappa$ B.

- Regulira metabolizam prostaglandina (PG). Smanjuje ekspresiju COX-2, enzima koji je odgovoran za sintezu PG, a povećava ekspresiju kataboličkog enzima 15-hidroksiprostaglandin-dehidrogenaze. Smanjenjem razine PG i inhibicijom PG signalnih puteva dolazi do supresije proliferativnih i angiogenetski stimulativnih učinaka PG.
- Kalcitriol aktivira VDR, veže se za VDREs u MKP5 (fosfataza 5 MAP kinaze) promotoru i povećava transkripciju MKP5 koji defosforilacijom vodi do inaktivacije p38 MAPK i JNK. Posljedično dolazi do smanjenog stvaranja proinflamatornih citokina, poput IL-6, koji pojačavaju upalni odgovor, a mogu potaknuti rast i progresiju raka prostate (Krishnan i sur., 2012).

## **INHIBICIJA METASTAZIRANJA I INVAZIVNOSTI TUMORA**

Kalcitriol smanjuje invazivnost i metastatski potencijal malignih stanica tako što regulira ekspresiju molekula ključnih za metastaziranje (Krishnan i sur., 2012).

- Povećava ekspresiju E-kadherina, tumor supresorskog gena, koji ima ulogu smanjenja metastatskog potencijala (Feldman i sur., 2014). Gubitak funkcije E-kadherina u vezi je sa stjecanjem metastatskog potencijala stanica raka, a obnova funkcije E-kadherina i njime posredovane adhezije između stanica dovodi do smanjenja invazivnih svojstava brojnih tumorskih stanica (Guan, 2015).
- Regulira ekspresiju komponenti sustava aktivacije plazminogena (Feldman i sur., 2014).
- Aktivatori plazminogena su serinske proteaze, te postoje dva tipa: urokinaza (u-PA) i tkivni aktivator plazminogena (t-PA). t-PA primarno nastaje u endotelnim stanicama krvnih žila, dok se urokinaza stvara u monocitima/makrofagima, trofoblastima i epitelnim stanicama. u-PA ima ulogu u remodeliranju normalnih stanica, destrukciji bazalne membrane i degradaciji ekstracelularnog matriksa što doprinosi metastaziranju tumora (Sumiyoshi i sur., 1992; Sappino i sur., 1991).
- Smanjuje aktivnost MMP-9 (Feldman i sur., 2014).

- MMP-9 uglavnom stvaraju same tumorske stanice, a povezuje se s agresivnošću i metastatskim svojstvima tumora. Smanjenje njegove ekspresije u stanicama raka može dovesti do stvaranja manje malignih fenotipova tumora (Mehner i sur., 2014).
- Smanjuje ekspresiju  $\alpha 6$ - i  $\beta$ -4 integrina te tenascina C (Feldman i sur., 2014) .  
Osim što su odgovorni za adheziju stanica, integrini su uključeni i u njihovu migraciju te se njihova povećana aktivnost dovodi u vezu s povećanom invazivnošću tumora. Posreduju u sintezi ciklina i inozitolnih lipida, aktiviraju neke protoonkogene i MAPK te kroz aktivaciju MMPs olakšavaju metastatski proces proteolitičkom degradacijom bazalne membrane i matriksa (Guan, 2015).  
Kalcitriol smanjuje ekspresiju tenascina C, ekstracelularnog proteina koji promovira rast tumora, angiogenezu te ekspresiju  $\alpha 6$ - i  $\beta$ -4 integrina (Krishnan i sur., 2012).

## INHIBICIJA TUMORSKE ANGIOGENEZE

Jedan od mehanizma djelovanja vitamina D je i inhibicija tumorske angiogeneze. Za rast tumora većih od 2-3 mm<sup>3</sup> i metastaziranje bitna je neovaskularizacija koja može poslužiti kao meta antitumorske terapije. Kod tumorske angiogeneze, ECs (visoko proliferirajuće endotelne stanice) ekspimiraju receptore za faktore rasta, kao i ostale molekule bitne za sam proces (Chakraborti, 2011). Povećana potreba za kisikom u brzo proliferirajućim tumorskim stanicama vodi do hipoksije koja uzrokuje indukciju sinteze proangiogenetskih faktora. Aktiviraju se signalni putevi i posljedično dolazi do strukturne reorganizacije endotelne stanice, formiranja novih krvnih žila i započinjanja procesa angiogeneze (Chakraborti, 2011; Krishnan i sur., 2012). Vitamin D, odnosno kalcitriol, djeluje na više načina:

- Suprimira ekspresiju VEGF-a tako što izaziva represiju HIF-1 $\alpha$  i IL-8 (Feldman i sur., 2014).
- HIF-1 $\alpha$  kao odgovor na hipoksiju, povećava ekspresiju proangiogenetskih faktora poput VEGF-a koji se smatra jednim od glavnih stimulatora angiogeneze (Krishnan i sur., 2012).
- IL-8, koji stvaraju i tumorske stanice, ulazi u interakciju s kemokinskim receptorima (CXCR1 i CXCR2). Ti su receptori ekspimirani na normalnim, kao i na tumorskim stanicama, a njihova aktivacija na EC povezana je s procesom angiogeneze. Kalcitriol preko NF $\kappa$ B inhibira stvaranje IL-8 u stanicama raka, a time i angiogenezu i progresiju tumora (Chakraborti, 2011).

- Indirektno, vitamin D inhibira COX-2 i time smanjuje stvaranje PGE2 koji u tumorskim stanicama doprinosi angiogenezi povećavanjem sinteze HIF-1 $\alpha$ . (Feldman i sur., 2014).

#### 4.2.2. ISTRAŽIVANJA DJELOVANJA VITAMINA D NA RAK

Od 30 studija, koje su istraživale povezanost statusa vitamina D i raka kolona ili adenomatoznih polipa, dostupnih na PubMedu, njih 20 je pokazalo značajni pozitivni utjecaj vitamina D na smanjenje rizika od raka i pad mortaliteta. Od 26 studija povezanosti vitamina D i raka prostate, 13 ih je pokazalo učinkovitost vitamina D, dok je istu povezanost pokazalo 9 od 13 studija raka dojke. Nadalje, u 5 od 7 studija raka jajnika pronađena je veza višeg mortaliteta sa smanjenim unosom vitamina D i smanjenim izlaganjem sunčevoj svjetlosti. Da bi se ispitala povezanost vitamina D i raka prostate, provedena je studija koja je uključivala 19 000 ljudi. Ispitanici s razinom 25(OH)D ispod 16 ng/mL imali su 70% veću incidenciju pojave raka prostate (Garland i sur., 2006). Crnci imaju skoro upola manje 25(OH)D, glavnog oblika vitamina D u cirkulaciji, od bijelaca, a podaci govore da crnci u sjevernim predjelima SAD-a imaju 33% višu stopu smrtnosti od raka kolona te 19% višu incidenciju raka kolona nego ljudi bijele rase. Osim raka kolona, i stope mortaliteta od raka dojke su kod crnaca 28% više (Garland i sur., 2006).

#### VITAMIN D I RAK KOLONA

Vitamin D može smanjiti incidenciju kolorektalnog tumora. Studije (Klampfer, 2014) su pokazale inverznu korelaciju između serumskih razina vitamina D<sub>3</sub> i pojave polipa ili adenoma u kolonu. Kod animalnih modela pokazano je da suplementacija vitaminom D<sub>3</sub> povoljno djeluje na suprimiranje tumorigeneze. Djelujući na wnt/ $\beta$ -katenin signalni put, on prevenira razvoj i progresiju raka kolona. Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put abnormalno je aktiviran u 90% slučajeva raka kolona. Aktivira gene koji promoviraju proliferaciju tumorskih stanica, poput ciklina D i *c-myc*, a potiče i ekspresiju COX-2. Wnt signalizacija promovira i aktivaciju transkripcije te stabilizaciju proteina Snail, transkripcijskog faktora koji posreduje EMT i koji interakcijom s  $\beta$ -kateninom povećava ekspresiju Wnt ciljnih gena. Osim toga, Snail smanjuje učinke vitamina D na tumor te njegova pojačana ekspresija uzrokuje smanjeni odgovor na kalcitrol (Feldman i sur., 2014). Dodatno, makrofagi povezani s tumorom tijekom progresije raka kolona otpuštaju faktore poput IL-1 $\beta$  koji aktivira Wnt signalizaciju u tumorskim

stanicama (Welsh, 2012). Vitamin D potiče vezanje VDR-a s  $\beta$ -kateninom i inhibira njegovu nuklearnu translokaciju te inducira ekspresiju faktora koji antagoniziraju  $\beta$ -kateninsku transkripcijsku aktivnost. Rezultat je smanjena ekspresija Wnt ciljnih gena poput *Snail* i *Myc* (Klampfer, 2014). Također, inhibicijom stvaranja IL-1 $\beta$ , vitamin D onemogućava makrofage da aktiviraju Wnt signalni put (Welsh, 2012).

U istraživanju ([www.ods.od.nih.gov](http://www.ods.od.nih.gov)) na 3 121 osobe starije od 50 godina (96% muškarci) koje su se podvrgnule kolonoskopiji, uočeno je da 10% njih ima uznapredovale kancerogene lezije te da su osobe s višim dnevnim unosom vitamina D (>645 IU/dan) imale manji rizik od nastanka takvih lezija.

## **VITAMIN D I RAK DOJKE**

Kod postmenopauzalnih žena prestaje stvaranje estrogena u jajnicima. Estrogen se stvara i lokalno u dojkama te može biti pokretač ER(+) (estrogen receptor pozitivnog) raka dojke. Transkripcijskom represijom ER $\alpha$  u stanicama raka dojke i smanjenom ekspresijom aromataze u adipoznom tkivu dojki, vitamin D inhibira sintezu estrogena i signalizaciju. Zbog toga se smatra da ima terapijski učinak u prevenciji ER(+) raka dojke (Feldman i sur., 2014). Na animalnim modelima dokazano je da VDR agonisti inhibiraju rast humanog raka dojke. U ER(+) tumorima učinak vitamina D i njegovih analoga može se usporediti sa standardnom antiestrogenskom terapijom, poput tamoksifena (Welsh, 2012).

Studija koja je proučavala povezanost raka dojke i suplementacije vitaminom D i kalcijem pokazala je smanjenje rizika od raka dojke za 14-20% kod žena koje su uzimale 1500 mg/dan kalcija te 400 IU/dan vitamina D. Također, pacijenti s višim koncentracijama vitamina D u vrijeme kad im je dijagnosticiran rak imali su bolje stope preživljavanja (Haq i Sofi, 2017).

## 4.3 VITAMIN E

Vitamin E je zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima vrlo važan u prevenciji bolesti povezanih sa oksidativnim stresom, kao što su rak, kardiovaskularne bolesti i ateroskleroza (Brigelius-Flohe i Traber, 1999). RDA za vitamin E (tablica 7) izražava se u mg ili IU: 1 IU prirodne forme (*RRR*- $\alpha$ -tokoferola) = 0,67 mg  $\alpha$ -tokoferola

1 IU sintetske forme (*dl*- $\alpha$ -tokoferola) = 0,45 mg  $\alpha$ -tokoferola

Tablica 7. Preporučeni dnevni unos (RDA) za vitamin E (www.ods.od.nih.gov)

Dob	RDA (mg $\alpha$ -tokoferola)
0-6 mj.	4*
7-12 mj.	5*
1-3 god.	6
4-8 god.	7
9-13 god.	11
14+ god.	15
trudnice	15
dojilje	19

\*AI= adekvatan unos

### 4.3.1. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA E

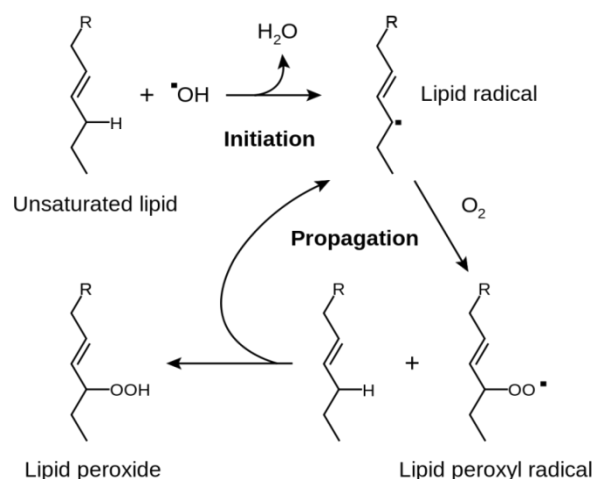
Vitamin E je prisutan u staničnim membranama gdje djeluje kao hvatač slobodnih radikala i inhibira lipidnu peroksidaciju (Klein i sur., 2000). Sprječava visokoreaktivne elektrofile poput superoksida, hidroksil radikala, hidroperoksil radikala i drugih slobodnih radikala da oštete biološke membrane i lipoproteine u plazmi. Na taj način štiti od oksidativnog stresa koji je uključen u proces karcinogeneze te smanjuje mogućnost mutagenoze i razvoja samog tumora. Osim toga, sprječava stvaranje karcinogenih nitrozamina, djeluje antiproliferativno, inhibira staničnu adheziju, metabolizam arahidonske kiseline i prostaglandina te poboljšava rad imunskog sustava (Weinstein i sur., 2007; Klein i sur., 2000). Također, vitamin E može utjecati i na rast i agresivnost tumora s obzirom da inhibira protein kinazu C i proliferaciju stanica glatkih mišića (Klein i sur., 2000).

#### 4.3.1.1. Antioksidativno djelovanje vitamina E

Vitamin E, kao poznati antioksidans, bitan je u prevenciji i smanjenju štetnih učinaka oksidativnog stresa na različita tkiva (Hamza i sur., 2017). Kemijska karcinogeneza uključuje elektrofilni napad slobodnih radikala ROS-a i RNS-a na makromolekule poput DNA izazivajući njihovo oštećenje. Pritom može nastati 8-OH-2-deoksigvanozin i transverzija mutacija gvanina u timin ukoliko dođe do replikacije prije popravka baze. Takva mutacija na *p53* genu može rezultirati njegovom smanjenom tumor supresorskom aktivnošću što se događa u više od polovice karcinoma. Djelovanje ROS-a i RNS-a te malonildiadehida, produkta lipidne peroksidacije, povezuje se s nastankom i progresijom tumora na animalnim modelima. Upravo zbog toga što vitamin E djeluje kao antioksidans te inhibira lipidnu peroksidaciju, smatra se kako može značajno djelovati u prevenciji nastajanja tumora (Combs, 2008).

#### LIPIDNA PEROKSIDACIJA

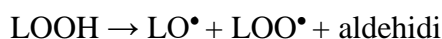
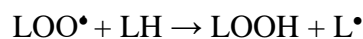
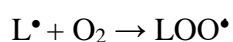
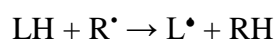
Lipidna peroksidacija je oksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA), potaknuta slobodnim radikalima (Nam, 2011). Polinezasićene masne kiseline puno su osjetljivije na djelovanje ROS-a od zasićenih masnih kiselina ili masnih kiselina s jednom dvostrukom vezom. Sam proces ima tri stupnja (slika 14): inicijaciju, propagaciju i terminaciju (Štefan i sur., 2007).



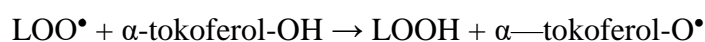
Slika 14. Mehanizam lipidne peroksidacije ([https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid\\_peroxidation](https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation))



Faza inicijacije počinje napadom reaktivnih kisikovih spojeva na PUFA-e. ROS imaju sposobnost izdvajanja atoma vodika ( $H^\bullet$ ) iz metilenske  $-CH_2-$  skupine čime nastaju slobodni lipidni radikali. S ciljem stabilizacije oblikuju se konjugirani dieni koji se mogu spajati s  $O_2$  te stvarati peroksilne radikale  $LOO^\bullet$ . Peroksilni radikali mogu dalje eliminirati  $H^\bullet$  iz PUFA-e i drugih organskih molekula, odnosno, u fazi propagacije, nastali lipidni hidroperoksidi ( $LOOH$ ) i reaktivni ugljikovi radikali nastavljaju lančanu reakciju. Željezo katalizira lipidnu peroksidaciju, a  $LOOH$  disocira do  $LO^\bullet$  i  $LOO^\bullet$  koji dovode do ponovne inicijalizacije peroksidacije (Štefan i sur., 2007). U fazi terminacije antioksidansi poput vitamina E doniraju vodik  $LOO^\bullet$  vrsti pri čemu nastaje vitamin E radikal koji dalje reagira s idućom  $LOO^\bullet$  uz stvaranje neradikalnog produkta (Ayala i sur., 2014). Pojednostavljeno, oksidacijom PUFA-e ( $LH$ ) stvaraju se slobodni lipidni radikali ( $L^\bullet$ ) koji zatim reagiraju s kisikom uz nastanak lipidnih peroksiradikala ( $LOO^\bullet$ ). Potonji su nosači lančane reakcije jer dalje oksidiraju molekule PUFA-e i iniciraju nove lančane reakcije. Kao produkt nastaju lipidni hidroperoksidi ( $LOOH$ ) koji se kidaju uz stvaranje novih radikala i aldehida.



U reakciji peroksilnog radikala s vitaminom E nastaje tokoferil radikal koji je relativno stabilan pa ne inicira lipidnu peroksidaciju (Nimse i Pal, 2015).

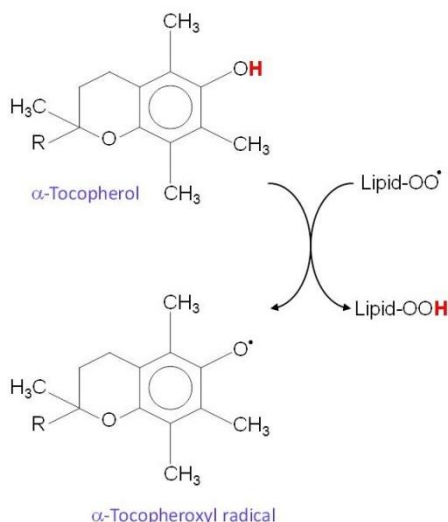


Najčešći uzročnici lipidne peroksidacije su hidroksilni ( $OH^\bullet$ ) i hidroperoksilni radikal ( $HO_2^\bullet$ ) (Štefan i sur., 2007).

Produkti lipidne peroksidacije, osim primarnih lipidnih hidroperoksida, su aldehidi, ketoni, ugljikovodici, epoksidi, aktivni radikali, a malonildialdehid (MDA) služi kao pokazatelj peroksidacije. MDA je u fiziološkim uvjetima prisutan kao enolanti ion koji dovodi do mutagenih oštećenja (Štefan i sur., 2007). Može reagirati s nekim nukleozidima pa formira adukte deoksigvanozina i deoksiadenozina, a glavni spoj koji nastaje je pirimido[1,2- $\alpha$ ]purin-10(3H)-on (M1dG). Nastali MDA-DNA adukti dovode do pucanja veza, zastoja staničnog

ciklusa i mutacija. M1dG može se oksidirati do 6-okso-M1dG, a tako nastali adukti s DNA utječu na razvoj raka. Unos hrane bogate antioksidansima, poput vitamina, povezuje se sa smanjenim razinama markera DNA oksidacije, a time i manjim rizikom za razvoj tumora (Ayala i sur., 2014). Kao produkt lipidne peroksidacije  $\omega$ -6 PUFA-e (linoleinske i arahidonske kiseline) nastaje 4-hidroksinonenal (HNE) koji može djelovati izrazito toksično (Štefan i sur., 2007). Kao i MDA, i HNE može reagirati s biomolekulama te stvarati adukte s DNA ili proteinima (Ayala i sur., 2014).

Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) inhibira fazu propagacije lipidne peroksidacije zahvaljujući svojem antioksidativnom djelovanju (slika 15). Donira fenolni vodik slobodnim lipidnim radikalima pri čemu nastaju pripadajući neradikalni produkti i  $\alpha$ -tokoferil radikal koji je relativno stabilan. Na molekulu  $\alpha$ -tokoferola potrebna su dva lipidna slobodna radikala kako bi došlo do zaustavljanja lančane reakcije (Yamauchi, 1997).



Slika 15. Antioksidativno djelovanje  $\alpha$ -tokoferola

(<http://www.westcottresearchandconsulting.com/antioxidants.htm>)

#### 4.3.1.2. Ne-antioksidativni mehanizmi djelovanja

Vitamin E ne djeluje samo kao antioksidans, već može regulirati gensku ekspresiju i utjecati na neke signalne puteve. Sudjeluje u transkripcijskoj regulaciji gena uključenih u staničnu signalizaciju i regulaciji staničnog ciklusa, ekstracelularnih proteina i molekula bitnih za staničnu adheziju i upalu. Nadalje, djeluje antiproliferativno na različite stanice, smanjuje proliferaciju stanica glatkih mišića, staničnu adheziju, upalu i agregaciju trombocita (Combs, 2008). Konverzija  $\alpha$ -tokoferola u  $\alpha$ -TOS ( $\alpha$ -tokoferil sukcinat) može poboljšati

njegova antitumorska svojstva. Potonji inhibira proliferaciju MDA-MB-435 stanica raka dojke blokirajući stanični ciklus u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi. To je djelovanje posredovano s MAPK te pojačanom regulacijom p21. Kod staničnih linija osteosarkoma uočeno je da  $\alpha$ -TOS aktivira p53 i smanjuje ekspresiju transkripcijskog faktora E2F1 čime je onemogućen prijelaz stanice iz G<sub>1</sub> u S fazu. Blokiranje staničnog ciklusa u toj fazi uočeno je i kod androgen receptor-pozitivnih staničnih linija raka prostate LNCaP, gdje je to postignuto smanjenom ekspresijom ciklina D1 i D3 te CDK 2 i 4.

Osim što inhibira staničnu proliferaciju, uočeno je da  $\alpha$ -TOS inducira apoptozu u različitim tumorskim staničnim linijama. Povećava aktivnost protein fosfataze A2 (PPA2) koja uzrokuje defosforilaciju i inhibiciju protein kinaze C (PKC). Inaktivirana PKC tako ne dovodi do fosforilacije antiapoptotskog Bcl-2 i dopušta indukciju apoptoze. Nadalje,  $\alpha$ -TOS inducira puteve apoptoze ovisne o kaspazama, a prema novijim spoznajama i one neovisne o kaspazama. Također, smanjuje aktivnost Akt i NF- $\kappa$ B. Inhibirajući NF- $\kappa$ B smanjuje razinu antiapoptotskih proteina i proteina uključenih u staničnu proliferaciju, angiogenezu i tumorsku invazivnost pošto su oni njime regulirani. Smanjena aktivnost Akt također je povezana sa smanjenom aktivnošću NF- $\kappa$ B (Constantinou i sur., 2008). Akt fosforilira proteine koji nadziru apoptozu te time sprječava programiranu staničnu smrt (Cooper i Hausman, 2004). Inhibicijom Akt dopušta se translokacija Bad (bcl-2 vezan promotor smrti) u mitohondrij (Constantinou i sur., 2008). Bad je član porodice Bcl-2 koji potiče otpuštanje citokroma C iz mitohondrija. Akt fosforilira Bad i onemogućuje njegovo premještanje u membranu mitohondrija te tako onemogućuje samu apoptozu (Cooper i Hausman, 2004).  $\alpha$ -TOS aktivira mitohondrijski put apoptoze i inaktivira antiapoptotski protein Bcl-2. Dopušta translokaciju Bax u mitohondrij, otpuštanje citokroma C, formiranje apoptosoma i aktivaciju kaspaze-9 koja zatim aktivira kaspazu-3 i dovodi do apoptoze. Nadalje,  $\alpha$ -TOS sudjeluje i u uspostavi Fas apoptotskih puteva, povećavajući ekspresiju Fas i FADD (Fas-povezana domena smrti) što vodi do aktivacije kaspaze-8 i do stanične smrti (Constantinou i sur., 2008).

#### **4.3.1.3. Modulacija imunskog sustava**

Za uništavanje tumora organizmu je potreban jak i efikasan imunski sustav. Vitamin E je važan za njegovu normalnu funkciju što je jedan od razloga zbog kojeg ga smatramo dobrim antitumorskim agensom (Brigelius-Flohe i sur., 2002). Starenjem dolazi do slabljenja našeg imunološkog sustava, a samim time organizam je podložniji infekcijama, bolestima i nastanku tumora. Imunosne stanice s većim udjelom visoko nezasićenih masnih kiselina

(PUFA), bogate su vitaminom E kako bi se zaštitile od mogućeg oksidativnog oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima. Brojna istraživanja pokazala su da vitamin E može poboljšati T-stanicama posredovanu imunost direktno djelujući na njih i pojačavajući njihovu proliferaciju te indirektno na način da smanjuje stvaranje PGE2 koji suprimira stvaranje T-stanica (Ren i sur., 2010).

#### 4.3.2. ISTRAŽIVANJA ANTITUMORSKOG UČINKA VITAMINA E

O kemoprotektivnim svojstvima vitamina E počelo se pričati kad je studija ljudi u mediteranskom području, čija je hrana bila bogata vitaminom E, pokazala niži rizik od raka kolona, nego kod ljudi u SAD-u i sjevernoj Europi (Constantinou i sur., 2008). Istraživanja su se nastavila te su *in vitro* studije pokazale da vitamin E inhibira rast nekih humanih staničnih linija, kao što su rak dojke, prostate i pluća te melanom. Provedena ispitivanja na životinjskim modelima pokazuju učinkovitost vitamina E na različite kemijski inducirane tumore, kao i one hormonski ovisne (Klein, 2000). Hamza i suradnici (Hamza i sur., 2017) proveli su studiju na miševima tretiranim s natrijevim azidom ( $\text{NaN}_3$ ) koji izaziva peroksidaciju lipida u membrani mitohondrija. Kod miševa koji su primali vitamin E uočeno je smanjenje razine produkta lipidne peroksidacije, malonildialdehida (MDA), kao i povećanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx), antioksidativnih enzima bitnih u zaštiti od oksidativnog stresa.

ATBC ( *$\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotene Cancer Prevention Study*) je randomizirana, dvostruko slijepa studija sa placebo kontrolnom skupinom. Cilj joj je bio utvrditi utječu li  $\alpha$ -tokoferol i  $\beta$ -karoten na smanjenje incidencije raka pluća ili drugih vrsta karcinoma kod muških pušača. U studiju je bilo uključeno 29 133 muškarca, Finaca, dobi od 50 do 69 godina, koji su pušili barem pet cigareta na dan. Dnevno su, tijekom 5-8 godina, primali 50 mg  $\alpha$ -tokoferola i 20 mg  $\beta$ -karotena, ili placebo. Iako nije bilo značajnog učinka na rak pluća, rezultati su pokazali smanjenje incidencije raka prostate za 32% kod ispitanika koji su primali suplemente  $\alpha$ -tokoferola u usporedbi s kontrolnom skupinom (Weinstein i sur., 2007). Studija u Baselu, provedena na 2 974 ispitanika tijekom 17 godina, pokazala je povezanost niskih razina vitamina E s povećanim rizikom od raka prostate, dok suprotno tome neke studije nisu pokazale protektivni učinak vitamina E na rak prostate (Klein i sur., 2000).

2001. godine započela je studija čiji je cilj bio utvrditi imaju li vitamin E i selen, u kombinaciji ili pojedinačno, sposobnost prevencije raka prostate. Istraživanje je uključivalo 35 533 muška ispitanika podijeljena u četiri grupe: vitamin E + placebo, selen + placebo,

vitamin E + selen ili samo placebo. Rezultati su, u skupini koja je primala 400 IU vitamina E dnevno tijekom sedmogodišnjeg praćenja, pokazali povećani rizik od raka prostate, a kod grupe s kombinacijom selena i vitamina E nije uočen značajniji porast incidencije raka. Dobiveni rezultati značajno se razlikuju od onih iz ATBC studije, gdje su ispitanici bili dugogodišnji pušači i gdje nije proveden skrining PSA pa je rak prostate dijagnosticiran u naprednijoj fazi bolesti (Klein i sur., 2011).

## 4.4. VITAMIN C

Otkriće vitamina C vezano je uz skorbut, bolest koju karakteriziraju simptomi poput umora, iscrpljenosti, krvarenja desni, sporog zarastanja rana i unutarnjeg krvarenja. Uzrok bolesti je nedostatak vitamina C, kao posljedica nedovoljnog konzumiranja svježeg voća i povrća. Askorbinska kiselina poznata je po svom antioksidativnom, antitumorskom, antiaterogenom i imunomodulacijskom djelovanju, a pomaže i u sprječavanju prehlade.

Vitamin C djeluje kao kofaktor hidroksilaza i monooksigenaza uključenih u sintezu neurotransmitera, kolagena i karnitina. Ubrzava reakcije hidroksilacije održavajući metalne ione u aktivnom centru enzima u reduciranom stanju (Naidu, 2003). Nužan je za aktivnost dvije vrste enzima: hidroksilaza koje sadrže željezo te onih koje sadrže bakar. Od hidroksilaza koje sadrže željezo poznate su: prolil- i lizil- hidroksilaze bitne za sintezu kolagena, aspartat- $\beta$ -hidroksilaza zaslužna za postsintetičnu modifikaciju proteina C te trimetilizin- i  $\gamma$ -butirobetain hidroksilaze za sintezu karnitina (Caballero i sur., 2005). Askorbinska kiselina sudjeluje i u sintezi neurotransmitera (Naidu, 2003). Kofaktor je dopamin- $\beta$ -hidroksilaze, enzima koji sadrži bakar i važan je u sintezi kateholamina, noradrenalina i adrenalina koji se sintetiziraju iz tirozina. Aktivni oblik enzima sadrži  $\text{Cu}^+$  koji se oksidira do  $\text{Cu}^{2+}$  tijekom hidroksilacije supstrata. Za povratnu redukciju do  $\text{Cu}^+$  zaslužan je upravo askorbat koji se pritom oksidira do monodehidroaskorbata (Caballero i sur., 2005). Vitamin C prevenira i smanjuje simptome prehlade tako da potiče proliferaciju T-stanica u odgovoru na infekciju. T-stanice mogu uništiti prisutne patogene stvaranjem citokina i pomaganjem B-stanicama u sintezi imunoglobulina i kontroli upalne reakcije. Nadalje, on djeluje i antiaterogeno sprječavajući oksidaciju LDL-a hvatanjem slobodnih radikala ili drugih reaktivnih kisikovih spojeva. Važan inicijalni korak ateroskleroze je adhezija leukocita na endotel, a vitamin C ima sposobnost sprječavanja interakcije leukocita i endotelnih stanica uzrokovano oksidacijom LDL-a (Naidu, 2003).

Preporučeni dnevni unos (RDA) vitamina C razlikuje se ovisno o dobi i spolu, a pušači u usporedbi s nepušačima moraju unositi veće količine vitamina C (tablica 8).

Tablica 8. Preporučeni dnevni unos (RDA) za vitamin C (www.ods.od.nih.gov)

Dob	RDA (mg/dan)
0-6 mj.	40*
7-12 mj.	50*
1-3 god.	15
4-8 god.	25
9-13 god.	45
14-18 god.	65 (žene) / 75 (muškarci)
19 +god.	75 (žene) / 90 (muškarci)
trudnice	85
dojilje	120
pušači	+35 mg/dan u usporebi s nepušačima

\*AI = adekvatni unos

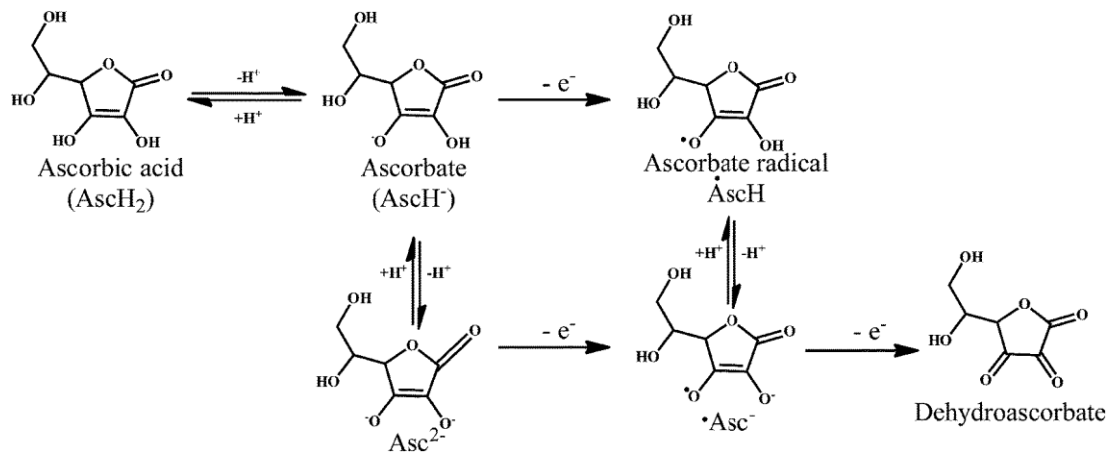
#### 4.4.1. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA C

Još od 1950-tih vitamin C se spominje kao potencijalni antitumorski agens. Smatralo se, na temelju njegove uloge u sintezi kolagena, da štiti normalna tkiva od tumorske invazivnosti i metastaza (Mikirova i sur., 2013). Danas se zna da vitamin C djeluje kao antioksidans, reagira sa slobodnim radikalima te time sprječava oštećenje bioloških molekula i iniciranje rasta tumora. Osim toga, u visokim koncentracijama može djelovati prooksidacijski, uništavajući tumorske stanice (Naidu, 2003).

##### 4.4.1.1. Vitamin C kao antioksidans

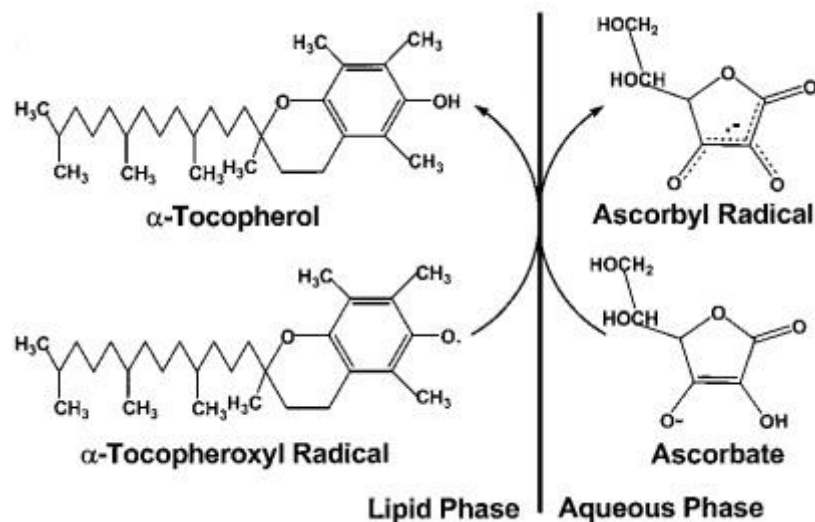
Askorbinska kiselina je reducirani oblik vitamina C koji postoji i u oksidiranom obliku, kao dehidroaskorbinska kiselina (DHA). DHA se unosi u stanicu putem glukoza-transportera, unutar stanice se reducira u askorbinsku kiselinu i smanjuje razinu slobodnih radikala (Lee, 2009). Prema tome, djeluje kao antioksidans i u fiziološkim koncentracijama (0,1 mM) štiti stanice od oksidativnih oštećenja (Mikirova i sur., 2013). Vitamin C je elektron donor, djeluje kao reducirajući agens i sprječava oksidaciju drugih spojeva. Nakon gubitka jednog elektrona (slika 16), stvara se askorobil radikal koji je u usporedbi s drugim radikalima relativno stabilan i slabo reaktivan. Gubitkom drugog elektrona nastaje DHA (Padayatty i

sur., 2003) koja se daljnjim reakcijama može reducirati natrag u askorbinsku kiselinu uz pomoć glutationa (Domitrović, 2006). Askorbat može reducirati i reaktivne spojeve poput nitrozamina, spojeve s nesparenim elektronima poput ROS-a (superoksid, hidroksilni radikal, peroksilni radikal), RNS-a te  $\alpha$ -tokoferil radikala (Padayatty i sur., 2003).



Slika 16. Reakcije vitamina C (Nimse i Pal, 2015)

Vitamin C obnavlja vitamin E (slika 17) i omogućava mu daljnje djelovanje (Domitrović, 2006) tako da reducira  $\alpha$ -tokoferoksilni radikal i regenerira  $\alpha$ -tokoferol uz stvaranje askorbilnog radikala (Sadler i sur., 1991).



Slika 17. Vitamin C regenerira vitamin E (Carr i sur., 2000)

Jedan od mehanizama antitumorskog djelovanja vitamina C je inhibicija stvaranja karcinogenih nitrozamina. Oralne bakterije mogu reducirati nitrata u nitrite. U kiselim

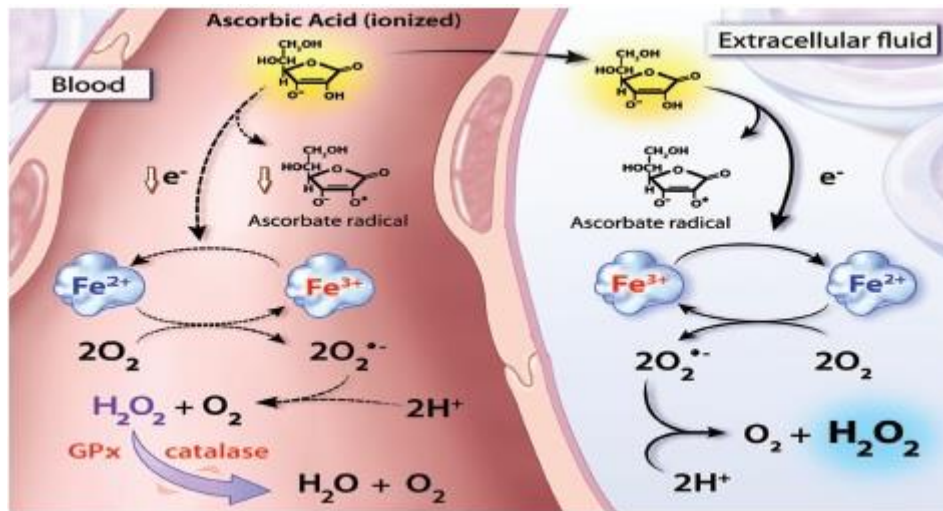


uvjetima želuca nitriti reagiraju s aminima iz hrane uz nastanak N-nitrozamina. Askorbinska kiselina reagira s nitritima uz stvaranje NO, NO<sub>2</sub> i N<sub>2</sub> te na taj način prevenira nastanak nitrozamina (Caballero i sur., 2005).

#### 4.4.1.2. Vitamin C kao prooksidans

Vitamin C inhibira rast stanica raka djelujući kao prooksidans. U milimolarnim koncentracijama, koje se postižu intravenskom primjenom, djeluje citotoksično na tumorske stanice (Mikirova i sur., 2013), odnosno potiče hidrogen peroksid-ovisnu citotoksičnost u tumorskim stanicama bez utjecaja na normalne, zdrave stanice (Lee, 2009). U brojnim istraživanjima vitamin C se koristi intravenski i to iz više razloga. U milimolarnim koncentracijama askorbat je toksičan za stanice raka te može inducirati njihovu apoptozu i inhibirati angiogenezu. Akumulira se u tumorima te u koncentracijama od 1 mM i više dovodi do inhibicije njihovog rasta. Faza I kliničkih studija pokazuje da se vitamin C može sigurno davati *i.v.* uz relativno malo nuspojava (Mikirova i sur., 2013). Od nuspojava najčešće su deficit glukoza-6-fosfata, bubrežni kamenci (oksalati), dispepsija i mučnina (Wilson i sur., 2014).

Chen i suradnici (Chen i sur., 2005) istraživali su može li askorbat djelovati selektivno citotoksično na tumorske stanice te su zaključili da visoke doze askorbata (0,3-20 mM) uzrokuju formiranje vodikovog peroksida i askorbil radikala u ekstracelularnom mediju (slika 18). Pritom su u krvi pronađene male koncentracije askorbil radikala dok vodikov peroksid nije detektiran. U ekstracelularnoj tekućini askorbinska kiselina gubi elektron i formira askorbil radikal uz prisutnost metaloproteina s atomom željeza pri čemu dolazi do redukcije Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup>. Potonji zatim donira elektron kisiku uz stvaranje superoksida koji dismutacijom prelazi u vodikov peroksid (Chen i sur., 2007). U krvi se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> brzo prevodi u kisik reakcijama kataliziranim glutation peroksidazom ili katalazom dok se u tumorskom tkivu može akumulirati (Wilson i sur., 2014; Chen i sur., 2005).



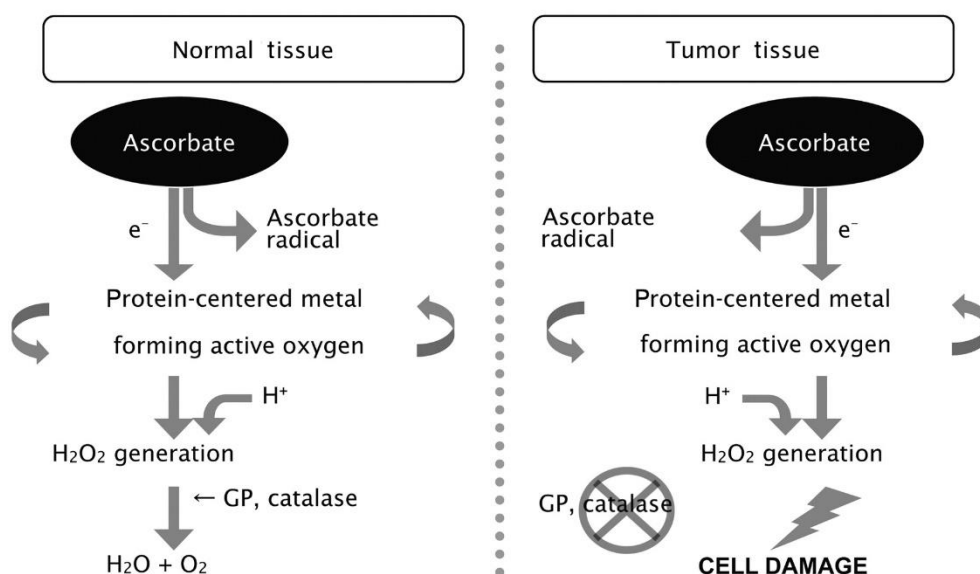
Slika 18. Formiranje radikal askorbata ( $\text{Asc}^\bullet$ ) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Chen i sur., 2007)

Pretpostavlja se da vodikov peroksid ulazi u osjetljive stanice poput tumorskih te iscrpljuje ATP (adenozin trifosfat) na jedan od tri moguća načina što dovodi do smrti stanice.

- Vodikov peroksid može uzrokovati oštećenje DNA koje popravljaju PARP (poliADP-riboza polimeraza). Njena povećana aktivnost katabolizira  $\text{NAD}^+$  što rezultira smanjenim stvaranjem ATP-a.
- Glutathion peroksidaza uklanja vodikov peroksid u stanici, a za djelovanje joj je potreban glutathion (GSH) koji se pri tome oksidira u disulfid GSSG. Za regeneraciju GSH i redukciju GSSG potreban je NADPH dobiven putem pentoza fosfata iz glukoze pa tako glukoza koja se koristi za redukciju  $\text{NADP}^+$  u NADPH nije više dostupna za stvaranje ATP-a. S obzirom da tumorske stanice koriste glikolizu češće od oksidativne fosforilacije za dobivanje ATP-a (Warburg efekt), u takvim stanicama ovisnim o glikolizi njeno smanjenje dovodi do pada ATP-a. Stoga su tumorske stanice posebno osjetljive na visoke koncentracije askorbinske kiseline.
- Vodikov peroksid može oštetiti mitohondrije pošto mitohondriji u tumorskim stanicama imaju povećanu osjetljivost na  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ukoliko se ošteti ATP sintaza, smanjuje se stvaranje ATP-a.

Visoke koncentracije askorbata ne djeluju tako na normalne stanice pošto one većinom stvaraju ATP aerobnim putem, a mitohondriji ne pokazuju takvu osjetljivost na  $\text{H}_2\text{O}_2$  kao tumorske stanice (Chen i sur., 2007). Normalna tkiva dobro su opskrbljena krvlju i bogata antioksidativnim enzimima pa se vodikov peroksid odmah uništi. Suprotno tome (slika

19), tumorska tkiva imaju smanjeni krvni protok i manju količinu antioksidativnih enzima pa vodikov peroksid uzrokuje oštećenje i staničnu smrt (Ohno i sur., 2009).



Slika 19. Djelovanje askorbata u normalnom i tumorskom tkivu (Ohno i sur., 2009)

#### 4.4.1.3. Vitamin C kao imunomodulator

Onkološki bolesnici često pate od nedostatka vitamina C pa njegova nadopuna može poboljšati funkciju imunskog sustava koji je veoma bitan u borbi protiv raka (Mikirova i sur., 2013). Mikirova i suradnici (Mikirova i sur., 2012) ispitali su učinak visokih doza intravenski primijenjenog vitamina C na upalu kod pacijenata oboljelih od raka. Upala ima važnu ulogu u razvoju tumora, a uključuje infiltraciju leukocita te stvaranje proupalnih citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) i kemokina. Kao odgovor na povišene razine IL-6, jetra proizvodi C-reaktivni protein (CRP) koji se koristi kao marker sistemske upale i povezuje s lošom prognozom te smanjenim preživljavanjem kod nekih tipova tumora. Askorbat inhibira proizvodnju nekih proupalnih citokina, kao i aktivaciju transkripcijskog faktora NF-kB koji sudjeluje u genskoj ekspresiji tijekom upalnog procesa. Analizom dobivenih rezultata zaključeno je da vitamin C smanjuje upalu kod pacijenata oboljelih od tumora, a smanjenje upale povezano je i s nižom razinom tumorskih markera. Nadalje, vitamin C u visokim dozama može pojačati i učinak NK stanica prevenirajući rast i diseminaciju tumora (Wilson i sur., 2014), a osim toga, stimulira i imunski sustav pojačavajući proliferaciju T-limfocita (Härtel i sur., 2004).

#### 4.4.1.4. Djelovanje vitamina C na angiogenezu

Vitamin C, kad je prisutan u visokim koncentracijama, može inhibirati aktivaciju faktora HIF-1 $\alpha$ . Hidroksilaze koje kidaju HIF-1 $\alpha$  trebaju za svoju aktivnost askorbinsku kiselinu i željezo kao kofaktore. Ukoliko postoji nedostatak vitamina C u organizmu neće doći do adekvatne hidroksilacije HIF-1 $\alpha$ , a njegova pretjerana ekspresija potiče angiogenezu koja dovodi do progresije tumora (Wilson i sur., 2014).

#### 4.4.2. ISTRAŽIVANJA ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA C

Provedena su brojna animalna, klinička i epidemiološka istraživanja kako bi se otkrila uloga askorbinske kiseline u prevenciji i liječenju različitih tipova tumora (Naidu, 2003). Što se tiče istraživanja na animalnim modelima, jedna se studija (Mikirova i sur., 2013) bavila učinkom askorbata na supresiju tumora kod miševa subkutano inokuliranih sa stanicama sarkoma S-180. Askorbinska kiselina je primijenjena u koncentraciji 700 mg/kg/dan, a srednje vrijeme preživljavanja iznosilo je 35,7 dana nakon implantacije za netretirane, odnosno 50,7 dana za miševe tretirane askorbatom. U drugom istraživanju (Mikirova i sur., 2013), inhibicija tumorskog rasta iznosila je 50% za intratumorsku koncentraciju askorbata od 1mM, a za koncentraciju iznad 2 mM, 65%.

Liehr (Liehr, 1991) je istraživao učinak vitamina C na estrogenom inducirane tumore kod sirijskih hrčaka. Kronična primjena dietilstilbestrola ili estradiola inducira stvaranje toksičnih kinonskih metabolita koji se kovalentno vežu za makromolekule i posljedično dolazi do pojave tumora bubrega. Vitamin C smanjuje koncentraciju dietilstilbestrol-4',4"-kinona, genotoksičnog metabolita dietilstilbestrola, i smanjuje razinu dietilstilbestrol-DNA adukata formiranih s kinonskim metabolitom te inhibira tumorigenezu.

Cha i suradnici (Cha i sur., 2013) proveli su istraživanje u kojem su ispitivali utjecaj askorbata na stanice melanoma B16F0 i stanice raka dojke 4T1 u miševima bez gulonolakton oksidaze koji stoga nemaju mogućnost sinteze askorbinske kiseline. Cilj istraživanja bio je saznati ima li askorbat bilo kakav učinak na rast tumora i tumorske metastaze. Pokazano je da postoji veza između niskih koncentracija askorbata u plazmi i smanjenog preživljavanja te veće agresivnosti tumora. Rezultati su pokazali da miševi s injektiranim stanicama melanoma B16F0 koji su primali askorbat imaju smanjenje metastaza u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod miševa sa stanicama raka dojke 4T1, koji su primali suplemente askorbata, uočeno je smanjenje težine tumora za 28% u usporedbi s kontrolom. U miševima na askorbatu nađeni su

manji tumori, s manjim jezgrama i stupnjem nekroze te boljom inkapsulacijom kolagenom što doprinosi manjem potencijalu za metastaziranje.

## **KLINIČKE STUDIJE ANTITUMORSKOG DJELOVANJA VITAMINA C**

Linus Pauling i Ewan Cameron 1970-tih godina proveli su kliničko istraživanje o učinku visokih doza vitamina C na rak (Unlu i sur., 2016). U knjizi „*Vitamin C and the common cold*“, Pauling je izložio svoju teoriju o važnosti askorbata u prevenciji i liječenju raka. Obrazložio je njegovu ulogu u sintezi kolagena koji čini potporno tkivo i, po njegovom mišljenju, sprječava infiltraciju tumorskih stanica i rast tumora u zdravom tkivu. Usmjerio je svoju teoriju više na kontrolu invazivnosti tumora nego na uništavanje tumorskih stanica. Smatrao je kako tumorske stanice modificiraju svojstva tkiva otpuštajući neke faktore i enzime, poput hijaluronidaze, što im omogućava proliferaciju i penetraciju te invaziju u susjedna tkiva. Njegovoj se teoriji pridružio Pauling koji je uočio obećavajuće rezultate primjene askorbata na svoje terminalno oboljele pacijente (Richards 1991).

Cameron i Pauling proveli su studiju na 100 terminalno bolesnih pacijenata kojima su davali suplemente askorbata te 1000 pacijenata kao odgovarajućih kontrola koji su primali istu terapiju, osim askorbata (Cameron i Pauling, 1978). U liječenju bolesnika s uznapredovalim oblicima tumora koristili su visoke doze askorbinske kiseline (>10g/dan), primijenjene intravenski. Tvrdili su da se terminalnim pacijentima poboljšala kvaliteta života i produjilo vrijeme preživljenja (Naidu, 2003). Vrijeme preživljenja mjerilo se od dijagnosticiranja neizlječivosti tumora, odnosno od datuma prve hospitalizacije zbog raka koji je dosegnuo terminalnu fazu. Datum neizlječivosti određen je uzevši u obzir kada je utvrđena nemogućnost operacije laparotomijom, odustajanje od nekog oblika antikancerogenog liječenja te datuma prijema pacijenta na terminalnu njegu. Na jednog pacijenta koji je primao askorbat, sukladno spolu, dobi i tipu tumora odabrano je 10 pacijenata za kontrolnu grupu, sveukupno njih 1000. Kod pacijenata koji su primali askorbat zabilježeno je produženje prosječnog vremena preživljenja za više od 300 dana u odnosu na kontrolnu grupu s tim da je 22% ispitanika na askorbatu imalo vrijeme preživljenja dulje od 1 godine od utvrđivanja datuma neizlječivosti, dok je kod kontrolne skupine taj postotak iznosio tek 0,4%. Prosječno vrijeme preživljenja ta 22 pacijenta bilo je 2,4 godine, dok je 8 njih po završetku studije još bilo živo, odnosno od uspostavljanja datuma neizlječivosti preživljenje im je iznosilo 3,5 godine (Cameron i Pauling, 1978).

Istraživanja na klinici *Mayo* o učinku vitamina C na rak nisu pokazala značajne rezultate što se tiče kvalitete i produljenja života. Provedene su tri randomizirane kliničke studije gdje su pacijente podijelili u skupinu koja je primala placebo i skupinu koja je oralno unosila 10 g askorbata dnevno (Wilson i sur., 2014). Rezultati nisu pokazali značajnu učinkovitost vitamina C, a jedan od razloga može biti i način unosa askorbata koji je bio intravenski kod Camerona i Paulinga, a peroralno u studiji klinike *Mayo* (Lee, 2009).

## 4.5. PREHRANA U PREVENCIJI RAKA

Prevenција raka može se podijeliti na primarnu, koja otklanja uzročnike i sprječava nastanak raka, i sekundarnu koja se odnosi na rano otkrivanje i liječenje (Vrdoljak i sur., 2013). Veliki broj namirnica iz naše svakodnevne prehrane sadrži antikancerogene tvari koje mogu pomoći u borbi protiv raka. Neke namirnice mogu spriječiti nastanak tumora, dok ga druge mogu uzrokovati. Procjenjuje se da je oko 30-40% svih vrsta raka izravno povezano s prehranbenim navikama, a taj je postotak čak i veći u slučaju raka probavnog sustava (jednjak, želudac, crijeva) te iznosi do 90%.

Pojam nutriterapija označava prehranu bogatu antikancerogenim namirnicama s ciljem prevencije tumora, koja kompenzira neke nasljedne nedostatke ili nedostatke uzrokovane nepravilnim načinom života. Veoma je bitno takve namirnice uključiti u svakodnevnu prehranu jer se time stvaraju nepovoljni uvjeti za rast i razvoj mikrotumora koji spontano nastaju tijekom života. Također, time se bolest može spriječiti u samom korijenu, prije nego dosegne zrelost i bude u stanju ugroziti organizam. Optimalna preventivna prehrana protiv raka temelji se na svakodnevnom unosu namirnica koje su poznati izvori antikancerogenih tvari (Beliveau i Gringras, 2007). Pretilost, hrana bogata šećerima i rafiniranim brašnom, mali unos vlakana, neravnoteža omega-3 i omega-6 masnih kiselina samo su neki od rizičnih čimbenika za razvoj raka (Donaldson, 2004). Vrlo je važno smanjiti unosa kalorija, odnosno smanjeno konzumirati hranu s prevelikom količinom šećera, masti i soli. Isto tako, povećani unos crvenog mesa (janjetina, svinjetina, govedina) može povećati rizik od raka debelog crijeva. Mnoge namirnice sadrže konzervanse, kao što su nitriti, a koji se u organizmu transformiraju u karcinogene spojeve i time povećavaju rizik oboljevanja od raka. Također, treba paziti kod pripreme mesa na plamenu, jer se pritom mogu stvoriti toksični elementi, aromatski ugljikovodici. Osim njih, pripremom mesa na visokim temperaturama mogu se stvoriti i neki drugi toksični elementi, poput heterocikličkih amina (Beliveau i Gringras, 2007). Postoji povezanost između unosa voća i povrća te manjeg rizika od razvoja raka. Voće i povrće sadrži hranjive tvari koje induciraju detoksifikacijske puteve, stimuliraju imunski sustav, utječu na progresiju staničnog ciklusa i mogu spriječiti nastanak raka. Bogato je antioksidansima, poput  $\beta$ -karotena (provitamina A), vitamina E, vitamina C koji hvataju slobodne radikale i sprječavaju oksidativni stres, a time i oštećenje lipida, proteina i DNA i nedvojbeno pomažu u sprječavanju raka (Heber i sur., 2006). Osim navedenih vitamina, bitno je da hrana koju svakodnevno konzumiramo bude bogata i vitaminom D, folnom kiselinom, vitaminom B12, prehranbenim vlaknima, izotiocijanatima, izoflavonima, fitosterolima,

saponinima, selenom i drugim molekulama s protektivnim djelovanjem. Povrće iz porodice krstašica (brokula, cvjetača, kupus) sadrži sulforafan, spoj koji se dovodi u vezu s antitumorskim djelovanjem. U prehranu je bitno uvrstiti i laneno sjeme koje je odličan izvor prehrambenih vlakana, omega-3 masnih kiselina i lignana (Donaldson, 2004). Vlakna koja se razgrađuju u probavnom traktu snižavaju pH u kolonu, vežu vodu i otrove iz stolice te reduciraju karcinogenezu. Vlakna koja se ne razgrađuju privlače vodu i povećavaju volumen stolice, ubrzavajući njen prolazak kroz probavni sustav i skraćuju izloženost karcinogenima.

U svrhu prevencije raka preporuča se (Vrdoljak i sur., 2013):

- redovna tjelesna aktivnost i održavanje tjelesne mase
- pet različitih obroka voća i povrća dnevno
- 20-30 g prehrambenih vlakana dnevno
- smanjiti količine zasićenih masti u prehrani
- jesti crveno meso najviše jednom na tjedan
- izbjegavati pečenu hranu (preferira se kuhanje).



## 5. ZAKLJUČCI

- Stanice raka karakterizira poremećeni stanični metabolizam, nekontrolirani rast i dioba, a proces kojim nastaje rak iz zdravog tkiva u više koraka naziva se karcinogeneza. Oštećenje DNA, proteina i lipida od strane ROS-a i RNS-a može dovesti do početka karcinogeneze, a za zaštitu od oksidativnog stresa vrlo su bitni antioksidansi koji neutraliziraju štetne učinke slobodnih radikala.
- Vitamin A spada u skupinu liposolubilnih vitamina poznatijih pod nazivom retinoidi, a tu se ubraja i  $\beta$ -karoten, provitamin A, poznat po svom antioksidativnom djelovanju. Vitamin A preko nuklearnih receptora regulira gensku ekspresiju i ispoljava svoje antitumorsko djelovanje. Inhibira proliferaciju tumorskih stanica, potiče njihovu apoptozu i sprječava progresiju stanica iz premalignog u maligni stadij. Posebno je važan u liječenju akutne promijelocitne leukemije, pošto vrlo visoki postotak pacijenata pozitivno reagira na terapiju retinoidima.
- Vitamin D je liposolubilni vitamin čiji nedostatak pogađa veliki dio svjetske populacije i dovodi se u vezu s pojavom raka. Aktivni oblik vitamina D je kolekalciferol koji modulira aktivnost određenih gena i djeluje antiproliferativno, inducira apoptozu tumorskih stanica, stimulira diferencijaciju i ima antiinflamatorne učinke. Također, sprječava tumorsku angiogenezu i ima sposobnost inhibiranja metastaza i invazivnosti tumora.
- Glavni oblik vitamina E je  $\alpha$ -tokoferol koji je prisutan u staničnim membranama gdje djeluje kao antioksidans i inhibira lipidnu peroksidaciju. Sprječava slobodne radikale da oštete biološke membrane i lipoproteine te tako štiti od oksidativnog stresa i moguće karcinogeneze. Ima i brojne ne-antioksidativne mehanizme djelovanja pa može inhibirati proliferaciju i inducirati apoptozu tumorskih stanica, a ima ulogu i u normalnoj funkciji imunosnog sustava.
- Vitamin C djeluje kao antioksidans i reagira sa slobodnim radikalima, dok reakcijom s  $\alpha$ -tokoferoksil radikalom regenerira vitamin E i omogućava mu daljnje djelovanje. U visokim koncentracijama djeluje kao prooksidans te potiče hidrogen-ovisnu citotoksičnost selektivnu za tumorske stanice. Nadalje, vitamin C djeluje i kao imunomodulator, poboljšava funkciju imunosnog sustava u borbi protiv raka te ima sposobnost inhibiranja angiogeneze.

- Hrana koja smanjuje rizik od raka bogata je prehrambenim vlaknima, antioksidansima (vitamin E,  $\beta$ -karoten, vitamin C), vitaminom D, folnom kiselinom, vitaminom B12, selenom i mnogim drugim kemoprotektivnim agensima. Preporuča se konzumiranje 5 različitih obroka voća i povrća dnevno, izbjegavanje zasićenih masti, crvenog mesa, mesnih prerađevina i pečene hrane. Također, bitno je hraniti se raznovrsnim namirnicama, jer na taj način unosimo sve potrebne nutrijente koji pomažu u prevenciji i borbi protiv raka.

## 6. LITERATURA

Ablain J, de The H. Revisiting the differentiation paradigm in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 2011, 117, 5795-5802.

Altucci L, Gronemeyer H. The promise od retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1, 181-193.

Arisi MF, Starker RA, Addya S, Huang Y, Fernandez SV. All trans-retinoic acid (ATRA) induces re-differentiation of early transformed breast epithelial cells. *Int J Oncol*, 2014, 44, 1831-1842.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S, Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014, 1-31.

Beliveau R, Gingras D. Hranom protiv raka. Zagreb, Mozaik knjiga, 2007, str. 24, 25, 36-39, 52, 59-61, 193-201.

Bešlija S, Vrbanec D. Medicinska/inernistička onkologija. Sarajevo, Medicinski fakultet univerziteta u Sarajevu, 2014, str. 8-10, 16.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 2012, 5, 9–19.

Brahmkhatri VP, Prasanna C, Ateya HS. Insulin-Like Growth Factor System in Cancer: Novel Targeted Therapies. *BioMed Res Int*, 2015, 2015, 1-24.

Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76, 703-716.

Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 1999, 13, 1145-1155.

Caballero B, Allen L, Prentice A. Encyclopedia of human nutrition – Second Edition. Elsevier Academic Press, 2005, str. 171-173.

Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75, 4538-4542.

Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential Antiatherogenic Mechanisms of Ascorbate (Vitamin C) and  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E). *Circ Res*, 2000, 87, 349-354.

Cha J, Roomi MW, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Ascorbate supplementation inhibits growth and metastasis of B16FO melanoma and 4T1 breast cancer cells in vitamin C-deficient mice. *Int J Oncol*, 2013, 42, 55-64.

Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 2011, 331, 1559-1564.

Chakraborti CK. Vitamin D as promising anticancer agent. *Indian J Pharmacol*, 2011, 43, 113-120.

Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102, 13604-13609.

Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E, Choyke PL, Pooput C, Kirk KL, Buettner GR, Levine M. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 8749-8754.

Combs GF. The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health. New York, Elsevier Academic Press, 2008, str. 3, 4, 42, 48, 99-104, 113, 127-129, 147, 158, 159, 161, 182, 193-198, 236, 237, 239, 242.

Constantinou C, Papas A, Constantinou AI. Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. *Int J Cancer*, 2008, 123, 739–752.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 569, 570, 583, 606, 631-640, 649-652, 654, 657.

Dhandapani L, Yue P, Ramalingam SS, Khuri FR, Sun SY. Retinoic acid enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells by upregulating TRAIL receptor 1 expression. *Cancer Res*, 2011, 71, 5245–5254.

Doldo E, Costanza G, Agostinelli S, Tarquini C, Ferlosio A, Arcuri G, Passeri D, Scioli MG, Orlandi A. Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. *Biomed Res Int*, 2015, 2015, 1-14.

Domitrović R. Vitamin C u prevenciji i liječenju bolesti. *Biochemia medica*, 2006, 16, 107-125.

Donaldson MS. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anticancer diet. *Nutr J*, 2004, 3, 1-21.

Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 2002, 82, 47-95.

Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14, 342-357.

Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 2014, 6, 466-488.

Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Q. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J*, 2012, 441, 61–76.

Francetić I i sur. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 485-520.

Gagic Z, Nikolic K, Ivkovic B, Filipic S, Agbaba D. QSAR studies and design of new analogs of vitamin E with enhanced antiproliferative activity on MCF-7 breast cancer cells. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2015, 1–12.

Gariglio P, Gutiérrez J, Cortés E, Vázquez J. The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer. *Arch Med Res*, 2009, 40, 449-465.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *Am J Public Health*, 2006, 96, 252-261.

Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5, 402-418.

Hamza RZ, Al-Harbi MS, El-Shenawy NS. Ameliorative effect of vitamin E and selenium against oxidative stress induced by sodium azide in liver, kidney, testis and heart of male mice. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91, 602-610.

Härtel C, Strunk T, Bucszy P, Schultz C. Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine*, 2004, 27, 101–106.

Haq A, Sofi NY. Vitamin D and breast cancer: Indian perspective. *Clin Nutr Exp*, 2017, 12, 1-10.

Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. Nutritional oncology. Los Angeles, Academic Press, 2006, str. 97, 513-516, 545-553.

Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*, 2016, 8, 135.

Jiang M, Zhu K, Grenet J, Lahti MJ. Retinoic acid induces caspase-8 transcription via phospho-CREB and increases apoptotic responses to death stimuli in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Acta*, 2008, 1783, 1055–1067.

Kedar N, Che Prasad K. Protiv raka vitaminima i dodacima prehrani. Zagreb, Cid-Nova, 2004, str. 28.

Klampfer L. Vitamin D and colon cancer. *World J Gastrointest Oncol*, 2014, 6, 430–437.

Klein EA, Thompson IM, Lippman SM, Goodman PJ, Albanes D, Taylor PR, Coltman C. SELECT: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial: rationale and design. *Prost Canc Prostatic Dis*, 2000, 3, 145-151.

Klein EA, Thompson IM, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, Minasian LM, Ford LG, Parnes HL, Gaziano JM, Karp DD, Lieber MM, Walther PJ, Klotz L, Parsons JK, Chin JL, Darke AK, Lippman SM, Goodman GE, Meyskens FL Jr, Baker LH. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*, 2011, 306, 1549-1556.

Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Rheum Dis Clin N Am*, 2012, 38, 161-178.

Laktašić-Žerjavić N, Koršić M, Crnčević-Orlić Ž, Anić B. Vitamin D: vitamin prošlosti, hormon budućnosti. *Liječ Vjesn*, 2011, 133, 194-204.

Lee WJ. The Prospects of Vitamin C in Cancer Therapy. *Immune netw*, 2009, 9, 147-152.

Liehr JG. Vitamin C reduces the incidence and severity of renal tumors induced by estradiol or diethylstilbestrol. *Am J Clin Nutr*, 1991, 54, 1256S-1260S.

Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC, Radisky ES. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 2014, 5, 2736-2749.

Mikirova N, Casciari J, Rogers A, Taylor P. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. *J Transl Med*, 2012, 10:189.

Mikirova NA, Casciari JJ, Hunninghake RE, Riordan NH. Intravenous ascorbic acid protocol for cancer patients: scientific rationale, pharmacology, and clinical experience. *Funct Food Health Dis*, 2013, 3, 344-366.

Mintas M. Medicinska kemija protutumorskih lijekova. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 16, 116, 118, 121, 140, 141, 144-147, 150.

Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J*, 2003, 2, 1-10.

Nair R., Maseeh A. Vitamin D: The „sunshine“ vitamin. *J Pharmacol Pharmacother*, 2012, 3, 118-126.

Nam TG. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicol. Res*, 2011, 27, 1-6.

Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants and their reaction mechanism. *RSC Adv*, 2015, 5, 27986-28006.

Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*, 2006, 2, 213–219.

Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Soma GI, Inoue M. High-dose Vitamin C (Ascorbic Acid) Therapy in the Treatment of Patients with Advanced Cancer. *Anticanc Res*, 2009, 29, 809-816.

Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*, 2003, 22, 18-35.

Perusek L, Maeda T. Vitamin A Derivatives as Treatment Options for Retinal Degenerative Diseases. *Nutrients*, 2013, 5, 2646-2666.



Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 2008, 4, 89–96.

Ren Z, Pae M, Dao MC, Smith D, Meydani SN, Wu D. Dietary Supplementation with Tocotrienols Enhances Immune Function in C57BL/6 Mice. *J Nutr*, 2010, 140, 1335-1341.

Richards E. Vitamin C and Cancer: Medicine or politics?. London, Macmillan, 1991, str. 75-76, 81.

Sadler JM, Strain JJ, Caballero B. Encyclopedia of human nutrition. San Diego, Academic Press, 1991, str 147.

Sappino AP, Huarte J, Vassalli JD, Belin D. Sites of Synthesis of Urokinase and Tissue-Type Plasminogen Activators in the Murine Kidney. *J Clin Invest*, 1991, 87, 962-970.

Seewaldt VL, Johnson BS, Parker MB, Collins SJ, Swisshelm K. Expression of retinoic acid receptor  $\beta$  mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth Differ*, 1995, 6, 1077-1088.

Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM. All trans retinoic acid and cancer. *Immunopharm Immunotox*, 2011, 33, 241-249.

Siddiqui AI, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann NY Acad Sci*, 2015, 2015, 1-12.

Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh V. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev*, 2013, 12, 376–390.

Sumiyoshi K, Serizawa K, Urano T, Takada Y, Takada A, Baba S. Plasminogen activator system in human breast cancer. *Int J Cancer*, 1992, 50, 345-348.

Šekerija M, Bobanović LJ, Novak P, Šelendić Đ, Lončar J, Čukelj P. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. Bilten br.39, 2016, str. 2,3,5.

Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.

Tang X-H, Gudas LJ. Retinoids, Retinoic Acid Receptors and Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2011, 6, 345-364.

Unlu A, Kirca O, Ozdogan M, Nayir E. High-dose vitamin C and cancer. *J Oncol Sci*, 2016, 1, 10-12.

Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: Molecular insight and evolving paradigms. *Cell*, 2011, 147, 275-292.

Vitamin A - Fact Sheet for Health Professionals, 2016, [www.ods.od.nih.gov](http://www.ods.od.nih.gov), pristupljeno: 10.07.2017.

Vitamin C – Fact Sheet for Health Professionals, 2016, [www.ods.od.nih.gov](http://www.ods.od.nih.gov), pristupljeno 10.07. 2017.

Vitamin D and Cancer Prevention, 2013, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov), pristupljeno 10.07.2017.

Vitamin D - Fact Sheet for Health Professionals, 2016, [www.ods.od.nih.gov](http://www.ods.od.nih.gov), pristupljeno 18.07.2017.

Vitamin E - Fact Sheet for Health Professionals, 2016, [www.ods.od.nih.gov](http://www.ods.od.nih.gov), pristupljeno 10.07.2017.

Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 1-8, 10, 14-17, 20-24.

Weinstein SJ, Wright ME, Lawson KA, Snyder K, Männistö S, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Serum and dietary vitamin E in relation to prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16, 1253-1259.

Welsh J. Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 523, 107–114.

Wilson MK, Baguley BC, Wall C, Jameson MB, Findlay MP. Review of high-dose intravenous vitamin C as anticancer agent. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2014, 10, 22-37.

Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11, 512-522.

Wu X, Cheng J, Wang X. Dietary Antioxidants: Potential Anticancer Agents. *Nutr Can*, 2017, 69, 521-533.

Yamauchi R. Vitamin E: Mechanism of Its Antioxidant Activity. *Food Sct Technol Int Tokyo*, 1997, 3, 301-309.

## 7. SAŽETAK

Maligne bolesti spadaju među vodeće uzročnike smrti, kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu, što predstavlja veliki javnozdravstveni problem. S obzirom na činjenicu da se značajan broj svih slučajeva raka može prevenirati adekvatnom prehranom, odnosno unosom namirnica bogatih kemoprotektivnim sastojcima, ovaj diplomski rad daje pregled najnovijih saznanja o antitumorskom djelovanju vitamina A, D, E i C koji su se pokazali kao najučinkovitiji u prevenciji i terapiji raka u navedenoj skupini mikronutrijenata. Oksidativni stres je jedan od okidača karcinogeneze pri čemu važnu kemoprotektivnu ulogu imaju antioksidansi poput  $\beta$ -karotena (provitamina A) te vitamina E i C. Osim navedenih vitamina s antioksidativnim svojstvima vrlo važnu ulogu u borbi protiv raka imaju i vitamini A i D koji smanjuju nekontroliranu proliferaciju tumorskih stanica, inhibiraju angiogenezu, metastaziranje i invazivnost raka te potiču apoptozu tumorskih stanica. Navedeni vitamini važni su i za normalnu funkciju imunskog sustava kojem pomažu u prevenciji i borbi protiv raka, a neki se koriste i kao dodatna terapija u kombiniranoj kemoterapiji. Imajući navedeno na umu, preporuča se u svakodnevnu prehranu uključiti raznolike namirnice bogate vitaminima A, D, E i C jer se time stvaraju nepovoljni uvjeti za rast tumora te omogućuje organizmu da se učinkovito bori s njima.

## 7. SUMMARY

Malignant diseases are considered as leading causes of death, which is a major public health problem, both in Croatia and in the world. About 30-40% of all cases of cancer can be prevented by adequate nutrition and intake of food rich in chemoprotective agents. This diploma thesis provides an overview of the latest findings on the anti-tumor activity of vitamins A, D, E and C, which are the most effective in preventing and treating cancer in that micronutrient group. Oxidative stress is one of the carcinogenesis triggers in which antioxidants such as  $\beta$ -carotene (provitamin A), vitamin E and vitamin C have an important chemoprotective role. In addition to vitamins with antioxidant properties, vitamins A and D play a very important role in fighting against cancer, reducing the uncontrolled proliferation of tumor cells, inhibiting angiogenesis, metastasis, invasiveness of cancer and stimulating apoptosis of tumor cells. These vitamins are also important for the normal function of the immune system in which they help prevent and fight cancer, while some of them are used as additional therapy in combined chemotherapy. Considering this, it is recommended to include a variety of food rich in vitamins A, D, E, and C in daily diet as it creates unfavorable conditions for tumor growth and allows the body to successfully fight with them.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za kemiju prehrane  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ANTITUMORSKO DJELOVANJE ODABRANIH VITAMINA

Laura Perčić

#### SAŽETAK

Maligne bolesti spadaju među vodeće uzročnike smrti, kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu, što predstavlja veliki javnozdravstveni problem. S obzirom na činjenicu da se značajan broj svih slučajeva raka može prevenirati adekvatnom prehranom, odnosno unosom namirnica bogatih kemoprotektivnim sastojcima, ovaj diplomski rad daje pregled najnovijih saznanja o antitumorskom djelovanju vitamina A, D, E i C koji su se pokazali kao najučinkovitiji u prevenciji i terapiji raka u navedenoj skupini mikronutrijenata. Oksidativni stres je jedan od okidača karcinogeneze pri čemu važnu kemoprotektivnu ulogu imaju antioksidansi poput  $\beta$ -karotena (provitamina A) te vitamina E i C. Osim navedenih vitamina s antioksidativnim svojstvima vrlo važnu ulogu u borbi protiv raka imaju i vitamini A i D koji smanjuju nekontroliranu proliferaciju tumorskih stanica, inhibiraju angiogenezu, metastaziranje i invazivnost raka te potiču apoptozu tumorskih stanica. Navedeni vitamini važni su i za normalnu funkciju imunskog sustava kojem pomažu u prevenciji i borbi protiv raka, a neki se koriste i kao dodatna terapija u kombiniranoj kemoterapiji. Imajući navedeno na umu, preporuča se u svakodnevnu prehranu uključiti raznolike namirnice bogate vitaminima A, D, E i C jer se time stvaraju nepovoljni uvjeti za rast tumora te omogućuje organizmu da se učinkovito bori s njima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 69 stranica, 18 grafičkih prikaza, 8 tablica i 87 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: rak, karcinogeneza, vitamini

Mentor: **Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Food Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ANTITUMOR ACIVITY OF SELECTED VITAMINS

**Laura Perčić**

#### SUMMARY

Malignant diseases are considered as leading causes of death, which is a major public health problem, both in Croatia and in the world. About 30-40% of all cases of cancer can be prevented by adequate nutrition and intake of food rich in chemoprotective agents. This diploma thesis provides an overview of the latest findings on the anti-tumor activity of vitamins A, D, E and C, which are the most effective in preventing and treating cancer in that micronutrient group. Oxidative stress is one of the carcinogenesis triggers in which antioxidants such as  $\beta$ -carotene (provitamin A), vitamin E and vitamin C have an important chemoprotective role. In addition to vitamins with antioxidant properties, vitamins A and D play a very important role in fighting against cancer, reducing the uncontrolled proliferation of tumor cells, inhibiting angiogenesis, metastasis, invasiveness of cancer and stimulating apoptosis of tumor cells. These vitamins are also important for the normal function of the immune system in which they help prevent and fight cancer, while some of them are used as additional therapy in combined chemotherapy. Considering this, it is recommended to include a variety of food rich in vitamins A, D, E, and C in daily diet as it creates unfavorable conditions for tumor growth and allows the body to successfully fight with them.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 69 pages, 18 figures, 8 tables and 87 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cancer, carcinogenesis, vitamins

Mentor: **Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2017.

