

Utjecaj mitohondrija na stupanj diferenciranosti i agresivnosti malignih tumora

Abramović, Inga

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:066499>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-15**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Inga Abramović

**Utjecaj mitohondrija na stupanj diferenciranosti i
agresivnosti malignih tumora**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Filipa Sedlića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Filip Sedlić, dr. med

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:

ACCS- acetil-CoA karboksilaza (*engl.* acetyl-CoA carboxylases)

ACSS2- acetil-CoA sintetaza 2 (*engl.* acetyl-CoA synthetase 2)

ATF5- čimbenik aktivacije transkripcije 5 (*engl.* activating transcription factor 5)

BRCA1- gen za karcinom dojke (*engl.* breast cancer gene 1)

CA- tumorski antigen (*engl.* cancer antigen)

CDKN2A- kinaza ovisna o ciklinu inhibitora 2A (*engl.* cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

cDNA- komplementarna DNA (*engl.* complementary DNA)

CEA- karcinoembrionalni antigen (*engl.* carcinoembryonic antigen)

ClpP- kazeinolitička proteaze (*engl.* caseinolytic protease)

CoA- koenzim A (*engl.* coenzym A)

CPT1- karnitin palmitoiltransferaza 1 (*engl.* carnitine palmitoyltransferase 1)

CSC- tumorske matične stanice (*engl.* cancer stem cell)

DNMT1- DNA metiltransferaza 1 (*engl.* DNA methyltransferase 1)

D-2HG- D-2-hidroksiglutarat (*engl.* D-2-hydroxyglutarate)

Drp1- *engl.* dinamin-related protein 1

ECM- ekstracelularni matriks (*engl.* extracellular matrix)

ETC- respiratorni lanac (*engl.* electron transport chain)

FAC- fokalni adhezijski kompleks (*engl.* focal adhesion complex)

FH- fumarat hidrataza (*engl.* fumarate hydratase)

IDH- izocitrat dehidrogenaza (*engl.* isocitrate dehydrogenase)

GSH- glutation (*engl.* glutathione)

GST- GSH S-transferaza (*engl.* GSH S-transferase)

GTP- gvanozin trifosfat (*engl.* guanosine triphosphate)

HSP- protein toplotnog šoka (*engl.* heat shock protein)

LONP1- lon peptidaza (*engl.* lon peptidase)

NADH- nikotinamid adenin dinukleotid (*engl.* nicotinamide adenine dinucleotide)

NADPH- nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat (*engl.* nicotinamide adenine dinucleotide-phosphate)

NNMT- nikotinamid N-metiltransferaza (*engl.* nicotinamide N-methyltransferase)

OCT4- oktamer vezujući transkripcijski faktor 4 (*engl.* octamer-binding transcription factor 4)

OXPHOS- oksidativna fosforilacija (*engl.* oxidative phosphorylation)

PSA- antigen specifičan za prostatu (*engl.* prostate-specific antigen)

ROS- reaktivni kisikovi spojevi (*engl.* reactive oxygen species)

Mdivi-1- inhibitor diobe mitohondrija 1 (*engl.* mitochondrial division inhibitor 1)

mitoQ- antioksidans mitokinon usmjeren na mitohondrije (*engl.* mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone)

mitoTEMPO- mimetik superoksid dismutaze usmjeren na mitohondrije (*engl.* mitochondria-targeted superoxide dismutase mimetic)

mtDNA- mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina (*engl.* mitochondrial deoxyribonucleic acid)

mtHSP70- mitohondrijski protein toplinskog šoka 70 (*engl.* mitochondrial heat shock protein 70)

mtROS- mitohondrijski reaktivni kisikovi spojevi (*engl.* mitochondrial reactive oxygen species)

PET- pozitronska emisijska tomografija (*engl.* positron emission tomography)

SDH - sukcinat dehidrogenaza (*engl.* succinate dehydrogenase)

SOX2- SRY-box transkripcijski faktor 2 (*engl.* SRY-box transcription factor 2)

TCA - ciklus limunske kiseline (*engl.* tricarboxylic acid cycle)

TNF- čimbenik nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor)

TRAK2- *engl.* trafficking kinesin protein 2

UPR^{mt}- mitohondrijski odgovor na razmotane proteine (*engl.* mitochondrial unfolded protein response)

VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta (*engl.* vascular endothelial growth factor)

α -KGDH- α -ketoglutarat dehidrogenaza (*engl.* α -ketoglutarate dehydrogenase)

α -TOS- α -tokoferil sukcinat (*engl.* α -tocopheryl succinate)

2DG- 2-deoksi-D-glukoza (*engl.* 2-deoxy-D-glucose)

Sadržaj:

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD.....	1
1.1. Mitochondriji.....	1
1.2. Proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva u mitohondrijima.....	2
1.3. Mitohondrijska dinamika	3
1.4. Maligni tumori.....	4
2. FUNKCIJA MITOHONDRIJA U TUMORSKIM STANICAMA.....	10
2.1. Međudjelovanje mitohondrija i glikolize.....	10
2.2. Metabolizam mitohondrija u raku	11
3. ULOGA ROS-A U INDICIRANJU ČIMBENIKA PLURIPOTENCIJE.....	15
4. ULOGA MITOHONDRIJSKE DINAMIKE U AGRESIVNOSTI I DIFERENCIJACIJI TUMORSKIH STANICA.....	17
5. ULOGA MITOHONDRIJSKOG ODGOVORA NA RAZMOTANE PROTEINE	20
6. CILJANJE MITOHONDRIJA U LIJEČENJU RAKA.....	23
7. ZAKLJUČAK	26
8. ZAHVALE.....	27
9. LITERATURA.....	28
10. ŽIVOTOPIS.....	32

SAŽETAK

Utjecaj mitohondrija na stupanj diferenciranosti i agresivnosti malignih tumora

Inga Abramović

Maligni tumori jedan su od vodećih uzroka smrti u razvijenom svijetu. Njihov nastanak se povezuje s oštećenjem i mutacijama DNA, a karakterizira ih autonoman i infiltrativan rast. Jedna od glavnih karakteristika malignih tumora je metastaziranje u lokalna i udaljena tkiva i stjecanje rezistencije na terapiju. Iako njihova incidencija raste tijekom godina, razvoj novih terapija je povećao preživljenje kod nekih pacijenata. Mitohondriji su stanične organele zadužene za proizvodnju ATP-a, a ujedno su i važan izvor reaktivnih kisikovih spojeva. Imaju niz funkcija u regulaciji metabolizma, signalizaciji, a povezuje ih se s patofiziologijom tumora. Dinamika mitohondrija koja uključuje procese fisije i fuzije također je uključena u regulaciju diferenciranosti stanica tumora. Cilj ovog rada je prikazati utjecaj mitohondrija na razvoj malignih tumora, njihovu diferenciranost, sposobnost invazije i metastaziranja. Osvrnut ću se i na potencijalne strategije liječenja tumora usmjerene na mitohondrije.

Ključne riječi: fisija; fuzija; maligni tumori; mitohondriji; terapija.

SUMMARY

The influence of mitochondria on the degree of differentiation and aggressiveness of malignant tumors

Inga Abramović

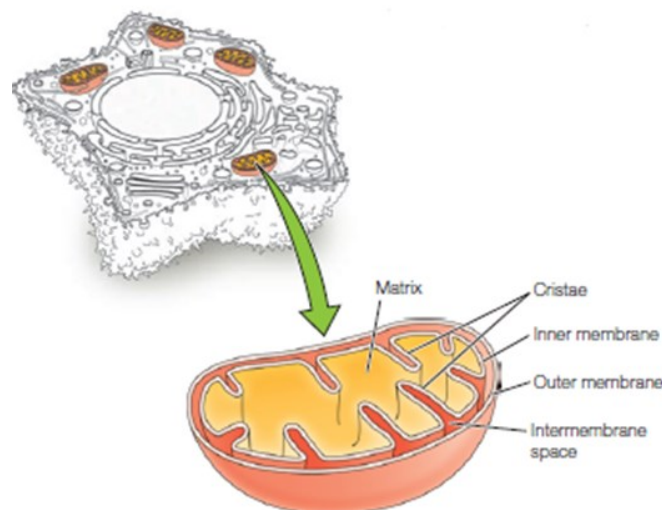
Malignant tumors represent one of the leading causes of mortality in the developed world. Their development is closely associated with DNA damage and mutations, characterized by autonomous and infiltrative growth. One of the main characteristics of malignant tumors is their capacity to metastasize to both local and distant tissues, as well as their ability to develop resistance to therapy. Despite the rising incidence of malignant tumors over the years, the development of new therapies has improved survival in some patients. Mitochondria, the cellular organelles responsible for ATP production, are also an important source of reactive oxygen species. They play a significant role in regulating metabolism and cellular signaling and are linked to the pathophysiology of tumors. Mitochondrial dynamics, including fission and fusion processes, are also involved in regulating the differentiation of tumor cells. This study aims to explore the influence of mitochondria on the development of malignant tumors, their differentiation, and their capacity for invasion and metastasis. Additionally, potential therapeutic strategies targeting mitochondria in the treatment of tumors will be discussed.

Keywords: fission; fusion; malignant tumors; mitochondria; therapy.

1. UVOD

1.1. Mitochondriji

Mitochondriji (mito=nit chondros= granule) su bioenergetske, biosintetske i signalne organele te je njihov pravilan rad važan za odvijanje brojnih staničnih funkcija. Građeni su od vanjske glatke membrane i unutrašnje koja sadržava nabore (kriste) koji su izbočeni u unutrašnjost mitohondrija (matriks) (slika 1). Mitochondriji sadržavaju vlastitu DNA (mtDNA), čija se sinteza odvija pomoću proteina kodiranih mitohondrijskom i jezgrinom DNA. Molekula mtDNA je kružna DNA koja sadrži 37 gena neophodnih za normalno funkcioniranje mitohondrija. Mitohondrijski genom kodira 13 proteina potrebnih za respiratorni lanac (ETC) i oksidativnu fosforilaciju kao i 22 vrste transferne RNA i ribosomalnu RNA. Smatra se da je njihov genom nastao endosimbiozom bakterija s većim stanicama, a poznato je i da se nasljeđuju maternalno (1).



Slika 1. Shematski prikaz strukture mitohondrija. Građeni su od unutarnje i vanjske membrane između kojih se nalazi intermembranski prostor. Unutrašnja membrana sadržava nabore (kriste) koji su izbočeni u unutrašnjost mitohondrija (matriks), dok je vanjska membrana glatka. Preuzeto iz: Cooper GM, Hausmann RE, 2006. (1)

Jedna od glavnih uloga mitohondrija je proces dobivanja ATP-a u energetskom metabolizmu stanice, koji se osniva na procesu oksidativne fosforilacije (OXPHOS). U aerobnim uvjetima piruvat, koji nastaje glikolizom, ulazi u mitohondrije gdje se putem OXPHOS-a stvara ATP. Kada dođe do nedostatka transportera glukoze ili kompleksa ETC-a, metabolizam glukoze i oksidacija piruvata u mitohondrijima se smanjuju, a opskrba energijom se prebacuje s glukoze na ketonska tijela pomoću oksidacije masnih kiselina (FAO) (2).

Pored energijske proizvodnje mitohondriji imaju i druge važne funkcije poput sudjelovanja u regulaciji unutarstaničnog kalcija, signalizaciji putem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), metabolizmu aminokiselina, lipida i kolesterola te u apoptozi (3).

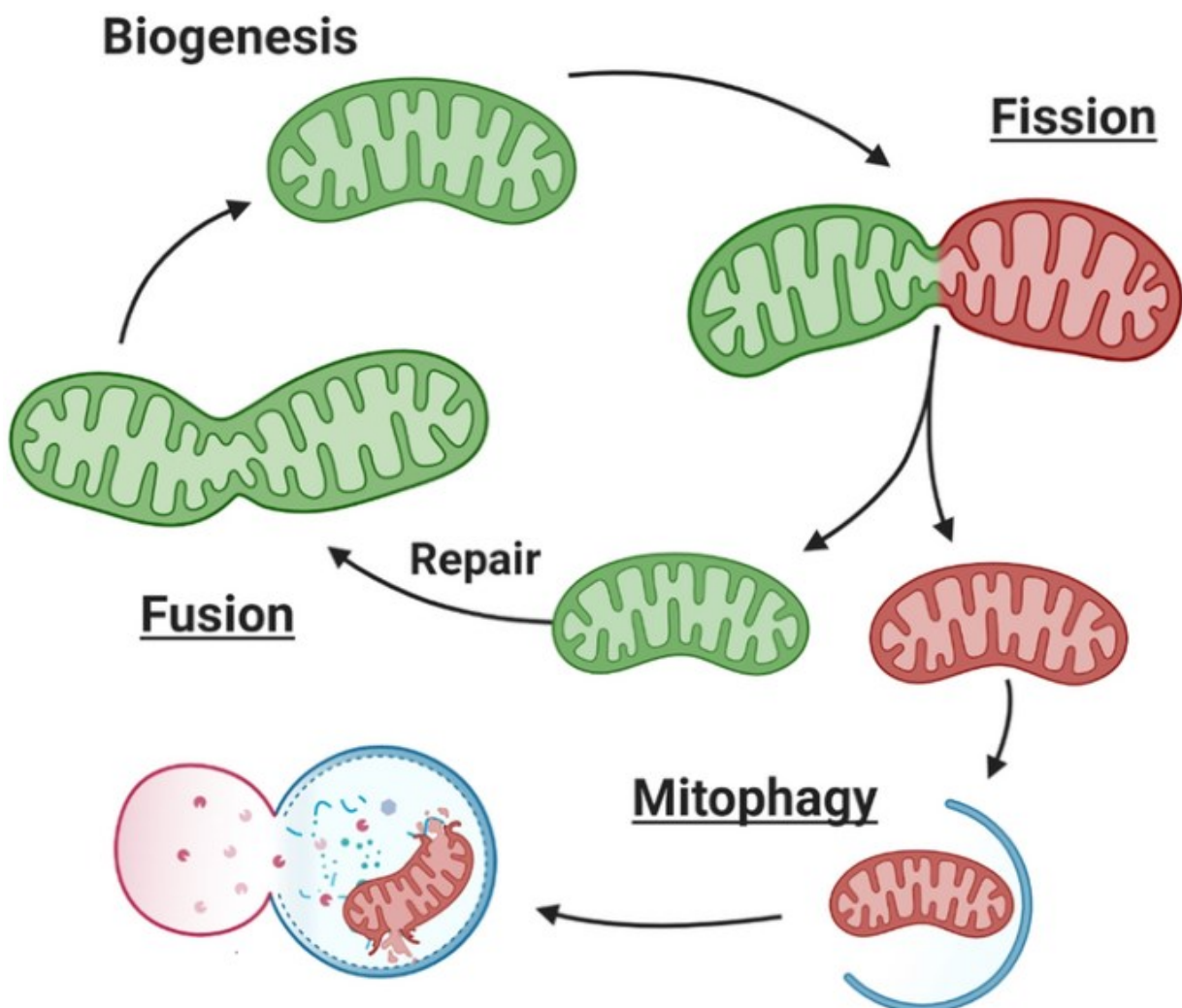
1.2. Proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva u mitohondrijima

Molekule ROS-a normalno nastaju tijekom oksidativne fosforilacije iz kisika koji izbjegne potpunu redukciju u vodu, što u normalnim uvjetima iznosi oko 1% kisika (3). Molekule ROS-a čine slobodni radikali kisika (iznimno reaktivni spojevi poput superoksidnog radikala koji imaju nespareni elektron u valentnoj orbiti) i visoko reaktivne molekule kisika (nemaju nesparene elektrone u vanjskoj orbiti poput vodikovog peroksida).

Najviše se proizvode u mitohondrijima u ETC-u na kompleksima I (kad se koenzim Q prekomjerno reducira što rezultira sintezom superoksidnog aniona) i III. Ostali važni izvori ROS-a su nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat (NADPH) oksidaza i drugi enzimi (poput lipoksigenaze i sintaze dušikova oksida), a proizvode se i u peroksisomima i endoplazmatskom retikulumu (ER) (4). Mitohondrijski reaktivni kisikovi spojevi (mtROS) imaju razne fiziološke uloge, poput stanične signalizacije, autofagije, ali i diferencijacije stanica i imunosti (5). Prekomjerno nakupljanje ROS-a oštećuje mtDNA, što može dovesti do poremećaja u OXPHOS-u. To uzrokuje veće stvaranje ROS-a i u konačnici dovodi do višestrukih poremećaja, što je u podlozi različitih patoloških stanja poput neurodegenerativne bolesti, preranog starenja i raka (3).

1.3. Mitohondrijska dinamika

Mitohondrijska dinamika se sastoji od kontinuiranih procesa spajanja mitohondrija (fuzije) i njihovog razdvajanja (fisije ili fragmentacije). Normalna mreža mitohondrija u stanicama se održava putem biogeneze, fisije, fuzije i mitofagije. U stanjima stresa često dolazi do oštećenja mitohondrijske membrane što ih čini disfunkcionalnim. U procesu fisije dolazi do odvajanja disfunkcionalnog od zdravog dijela mitohondrija. Zdravi dio sudjeluje u mitohondrijskoj fuziji, vrlo koordiniranom procesu koji miješa i ujedinjuje mitohondrijske dijelove kako bi se održala normalna mitohondrijska funkcija i nasljeđivanje mtDNA. Oštećeni fragmenti mitohondrija odvajaju se i razgrađuju u posebnoj vrsti autofagije koja se naziva mitofagija. Konačno, mitohondriji se popravljaju i obnavljaju stvaranjem novih mitohondrijskih membrana, proteina i mtDNA u procesu biogeneze (slika 2) (6).



Slika 2. Pregled homeostaze mitohondrija. Homeostaza se održava pomoću dinamike mitohondrija u koju ubrajamo: fuziju (spajanje), fisiju (razdvajanje), mitofagiju i biosintezu mitohondrija. Preuzeto iz: Fisher CR, Shaaeli AA, Ebeling MC i sur., 2022. (6)

Osim miješanja sadržaja i kontrole funkcije, mitohondrijska dinamika također diktira veličinu i morfologiju mitohondrija. Tako unutar stanica u kojima dominira fisija, mitohondriji će biti manji, a prilikom fuzije veći. Njihova veličina utječe i na funkciju, pa tako fragmentirani mitohondriji pokazuju smanjenu sintezu ATP-a i veću proizvodnju ROS-a u usporedbi s fuzioniranim mitohondrijima.

1.4. Maligni tumori

Zloćudni (maligni) tumori su karakterizirani prekomjernom proliferacijom abnormalnih stanica, čiji rast nije usklađen s rastom normalnih tkiva, uz mogućnosti lokalne i udaljene infiltracije tkiva. Očituju se pretjeranim umnožavanjem stanica zbog neograničenog broja dioba i gubitka kontaktne inhibicije. Kontaktna inhibicija je svojstvo normalnih stanica u kulturi da se pri dodiru s okolnim stanicama prestaju dijeliti i gibati. Tumorske stanice gubitkom tog svojstva rastu nepravilno i neorganizirano, a u kulturi se gomilaju.

Tumori nastaju zbog mutacija koje mogu biti nasljedne ili stečene, nastale zbog fizikalnih ili kemijskih oštećenja DNA. Mutacije protoonkogenih i tumor-supresorskih gena uzrokuju abnormalnu regulaciju staničnog rasta i diobe. Tumor-supresorski geni suprimiraju maligni rast stanica tako što održavaju normalnu staničnu diobu. Mutacija gena *p53*, koji se nalazi na kromosomu 17, najčešća je mutacija tumor-supresorskog gena u različitim vrstama tumora (u oko 50 % svih vrsta tumora) (7). Protein p53 je transkripcijski faktor koji potiče stvaranje proteina p21. Protein p21 u kompleksu s proteinom koji stimulira staničnu diobu (ciklin ovisna kinaza 2) djeluje kao „stop signal“ za diobu stanica. Mutacijom *p53* se smanjuje stvaranje proteina p21, što posljedično vodi do nekontroliranog dijeljenja stanica i stvaranja tumora (7). Protoonkogeni također

sudjeluju u kontroli staničnog rasta. Mutacijom protoonkogeni nastaju onkogeni, čija povećana aktivnost potiče izraženost gena uključenih u proliferaciju stanica. Onkogen MYC (c-MYC) je među najčešće aktiviranim onkogenima u tumorima ljudi. MYC je glavni regulator brojnih procesa u patofiziologiji stanica raka, a sudjeluje i u izbjegavanju imunološkog odgovora domaćina protiv raka (8).

Tumori imaju i mogućnost dostatne opskrbe hranjivim tvarima pomoću pojačane angiogeneze što podržava njihov rast. Bez pojačane angiogeneze tumori ne bi mogli narasti više od 1 do 2 mm u promjeru, koliko iznosi maksimalna udaljenost na kojoj je moguća difuzija kisika i hranjivih tvari iz krvnih žila (7). Pri kritičnoj veličini tumora razvija se hipoksija, što potiče transkripciju vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i pokreće angiogenezu. Novostvorene endotelne stanice izlučuju čimbenike rasta i potiču rast susjednih tumorskih stanica (7). Također, angiogeneza je važna i za nastanak metastaza jer stanicama tumora omogućava pristup krvotoku.

Sljedeće bitno svojstvo malignih stanica je besmrtnost, što se tumači visokom aktivnošću telomerase. Enzim telomeraza je stanična reverzna transkriptaza koja dodaje DNA na krajeve kromosoma (telomere). Telomere su izgrađene od ponavljajućih sljedova DNA, koje čini šest nukleotida (TTAGGG) (9). Glavna zadaća telomera je očuvanje integriteta kromosoma, štiteći kromosom od staničnih enzima (egzonukleaza) i mehanizama prepoznavanja oštećenja DNA. Telomere se skraćuju pri svakoj staničnoj diobi, a kad dođu do kritične duljine, dolazi do zaustavljanja daljnje diobe stanice. Skraćivanje telomera povezano je s bolestima i starenjem. Telomeraza je aktivna u stanicama koje imaju neograničen broj dioba (poput matičnih i tumorskih stanica), gdje stalno produljuje telomere. Razvijanje strategija inhibicije telomerase je još jedna moguća strategija u liječenju tumora (7,9).

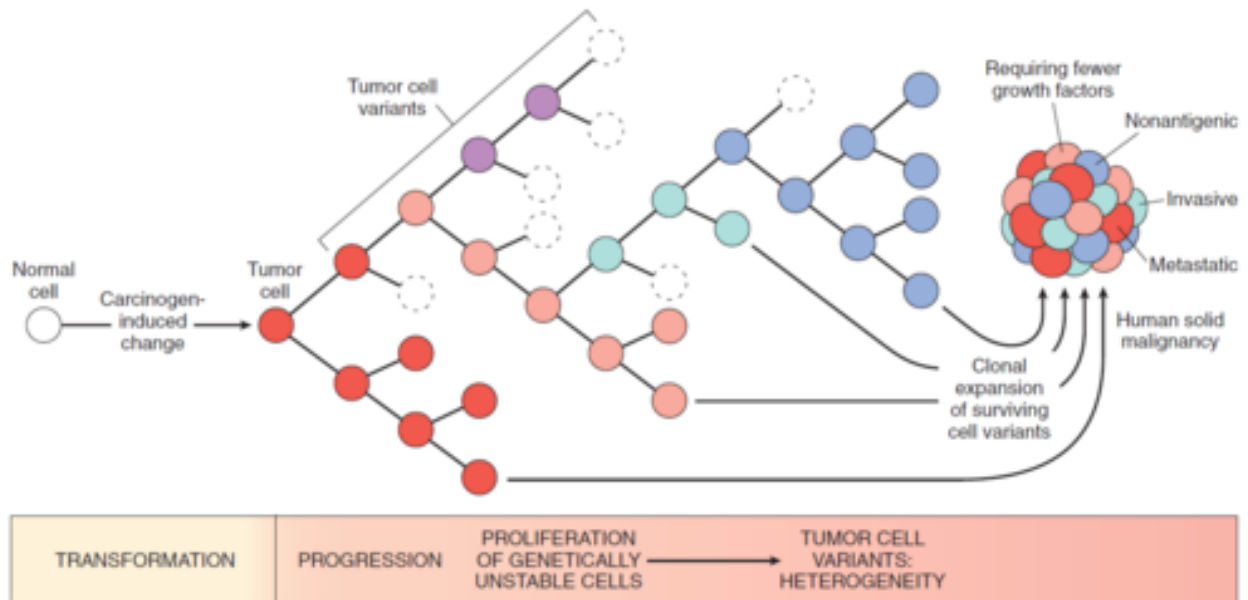
Tumorske stanice imaju još jednu karakteristiku, a to je sposobnost izbjegavanja apoptoze. Apoptoza je kontrolirani proces stanične smrti, kojim stanica aktivno uz utrošak energije i sintezu određenih proteina, pokreće vlastitu smrt kao sastavni dio fizioloških procesa ili kao odgovor na određena patološka stanja (9). Postoje vanjski i unutarnji (mitohondrijski) put aktivacije apoptoze, a oba puta rezultiraju aktivacijom kaskade kaspaza. Ekstrinzični (vanjski) put se pokreće aktivacijom TNF-receptora, poput Fas-a (CD95), te se formira signalizacija za aktivaciju proteolitika kaskada kaspaza (7). Oštećenjem DNA pokreće se intrinzični (unutarnji) put, koji dovodi do permeabilizacije vanjske membrane mitohondrija i otpuštanja citokroma c koji inicira

apoptozu (7). Stanice tumora izbjegavaju apoptozu mijenjajući različita mjesta u unutarnjem (reguliranjem pro- i anti-apoptotičkih molekula važnih za cjelovitost vanjske membrane mitohondrija) i vanjskom putu apoptoze (inaktivacijom signalnog puta aktivacije kaspaza) (7). Geni *p53* i *MYC* također imaju važnu ulogu u pokretanju apoptoze u stanicama koje ne mogu popraviti oštećenu DNA, sprječavajući tako stvaranje tumora (7,9).

Sposobnosti invazije i metastaziranja su ključne značajke u razlikovanju malignih od benignih tumora. Širenje tumora u lokalna i udaljena tkiva je složen proces koji se sastoji od: lokalne invazije, intravazacije u krvne i limfne žile, prijenosa cirkulacijom, ekstravazacije iz žila, formiranja mikrometastaza i rasta mikrometastaza u makroskopski tumor (7). Ovi koraci se mogu podijeliti u dvije faze: 1) invaziju ekstracelularnog matriksa (ECM) i 2) vaskularnu diseminaciju i nastanak metastaza. Invazija ECM-a je aktivan proces koji se odvija u nekoliko koraka metastatske kaskade. Prvo je potrebna inaktivacija funkcije E-kadherina, koji djeluje kao međustanično ljepljivo držeći susjedne stanice zajedno (7). Njegovim gubitkom smanjuje se povezanost susjednih stanica što tumorskim stanicama omogućava pristup bazalnoj membrani i intersticijskom vezivnom tkivu. Zatim slijedi lučenje proteaza i gubitak receptora za proteine ECM-a (7). To omogućava migraciju stanica tumora kroz degradiranu bazalnu membranu i zonu proteolize matriksa te ulazak u cirkulaciju. Kad dosegnu cilj, tumorske stanice prijanjanju na vaskularni endotel i kroz bazalnu membranu izlaze u parenhim organa (7). Mnogi tumori metastaziraju u organ koji predstavlja prvi kapilarni splet na koji naiđu nakon ulaska u cirkulaciju (najčešće jetra i pluća). Mjesto metastaza uvelike ovisi o vaskularnoj ili limfnoj drenaži mjesta nastanka primarnog tumora. Neki tumori pokazuju tropizam organa pomoću kojeg se mogu predvidjeti mjesta nastanka metastaza.

Mutacije se u tumorskim stanicama akumuliraju stvarajući podklonove s novim karakteristikama kao što su sposobnost invazije, metastaziranja i smanjene osjetljivosti na antineoplastične lijekove. S progresijom, tumorska masa postaje agresivnija uz sve veću mogućnost izbjegavanja imunološke obrane domaćina (slika 3) (7). Osim mutacijama, tumorske stanice su podvrgnute i selekciji. Obrambeni mehanizmi domaćina uništavaju stanice koje imaju jako izražene neoantigene, čineći tako imunološku selekciju (9). Nakon primjene kemoterapije dolazi do selekcije podklonova

otpornih na terapiju. Oni prenose otpornost na lijekove i odgovorni su za ponovni rast tumora (7,9). Dakle, tumor teži stvaranju podklonova koji su vještiji u preživljavanju, rastu, invaziji i stvaranju metastaza.



Slika 3. Progresija tumora i stvaranje heterogenosti. Višestrukim mutacijama izvorne transformirane stanice nastaje tumorska masa s brojnim, vjerojatno agresivnijim, podklonovima. Preuzeto iz: Kumar V, Cotran R, Robbins S; 2012. (7)

U kliničkom radu maligni tumori su karakterizirani čestim recidivima i lošom prognozom (7,9). Određivanje stadija i stupnja diferenciranosti malignih tumora koristi se za procjenu agresivnosti tumora, prognozu bolesnika i odabir odgovarajuće terapije. Stupanj diferenciranosti tumora (*gradus*) je određen citološkim izgledom tumorskih stanica na način da su slabo diferencirani tumori agresivniji. Tumori se dijele u 4 stupnja: dobro diferencirani tumori (G1), umjereno diferencirani tumori (G2), slabo diferencirani tumori (G3) i nediferencirani tumori (G4). Stanice tumora *gradusa* 1 sporo rastu, najmanje su agresivne i izrazito nalikuju stanicama normalnog tkiva iz kojega nastaju (9). Određivanje stadija tumora (*staging*) se temelji na kliničkom pregledu i radiološkim metodama (poput kompjuterizirane tomografije i magnetske rezonance). Koristi se TNM-klasifikacija, u kojoj T opisuje sijelo i veličinu primarnog tumora (T1- T4), N zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N0- N3), a M opisuje

prisutnost ili odsutnost udaljenih metastaza (M0 i M1) (9). Na temelju TNM klasifikacije proširenosti tumora određuje se i opći stadij proširenosti bolesti (stadiji 0-IV, gdje stadij 0 označava tumor *in situ*). Stadij tumora je najvažniji pokazatelj očekivane dužine preživljenja i određivanja terapije (7,9).

Tumorski markeri su molekule čija je povišena razina u krvi povezana s dijagnozom raka. U kliničkoj praksi karcinoembrionalni antigen (CEA) se određuje kod karcinoma debelog crijeva, gušterače i želuca, a alfa-fetoprotein kod hepatocelularnog karcinomima, ali i u tumorima nastalim iz ostataka žumanjčane vreće u gonadama (9). Stoga se da zaključiti da tumorskim markerima nedostaje specifičnost jer se isti mogu pronaći u različitim vrstama tumora. Ali i jedan tumor može imati povišene razine nekoliko tumorskih markera (CEA, CA125 i CA15-3 u karcinomu dojke) (9). Nedostaje im i osjetljivost potrebna za ranu dijagnozu raka jer su povišenih vrijednosti i u drugim stanjima, poput upale. Primjer je tumorski marker PSA čije se povišene vrijednosti mogu dobiti kod benigne hiperplazije prostate, ali i kod adenokarcinoma prostate (7). Stoga, tumorski markeri služe kao orijentir je li potrebno napraviti dodatne pretrage. No, njihova najveća korisnost je u kvantificiranju odgovora na terapiju ili otkrivanju recidiva bolesti. Kod uspješnog izlječenja bolesti ovi markeri nestaju iz seruma (7,9).

Molekularne analize koriste se za određivanje dijagnoze tumora i za predviđanje njihovog ponašanja. Također su važne u otkrivanju genetske predispozije za nastanak raka. Primjer je mutacija tumor-supresorskog gena *BRCA1* (breast cancer gene 1), koji povećava rizik od razvoja različitih vrsta raka poput karcinoma dojke i jajnika (9). Otkrivanje mutacija povezanih s nastankom raka imaju važnu ulogu u odabiru terapije i protokola liječenja. Danas je sve veći razvoj „pametnih lijekova“ koji izravno ciljaju specifične mutacije. Osim toga, njihovo otkrivanje omogućava genetsko savjetovanje rodbine pod rizikom (7,9).

Molekularnim profiliranjem tumora može se odrediti izraženost velikih dijelova genoma, ali i identificirati sve mutacije koje se nalaze u tumorskom genomu. Određuju se sekvenciranjem nukleotida (*Whole Genome Sequencing*) i analizom komplementarne DNA (cDNA) (7). Molekule cDNA nastaju reverznom transkriptazom mRNA iz uzorka i sadrže fluorescentno obilježene nukleotide (7). Molekularno profiliranje tumora veoma

je korisno u molekularnom razlučivanju inače identičnih tumora ili u razlikovanju tumora koji sadrže jednaku mutaciju u svrhu odabira terapije i procjene prognoze (7).

Dobročudni (benigni) tumori se u mnogočemu razlikuju od malignih tumora. Sadržavaju manje mutacija i genetski su stabilniji. Ključno svojstvo benignih tumora koje ih razdvaja od malignih je nemogućnost udaljenog metastaziranja i neinfiltrativni rast, koji ih čini oštro ograničenima od normalnog tkiva. Postoje četiri temeljne značajke po kojima se dobroćudni i maligni tumori mogu razlikovati: diferencijacija i anaplazija, brzina rasta, lokalna invazija i metastaziranje (9). Benigni tumori sastoje se od dobro diferenciranih stanica koje vrlo nalikuju normalnom tkivu iz kojeg su nastali. Većina benignih tumora raste sporo i ostaju lokalizirani na mjestu nastanka. Oko benignog tumora može se formirati fibrozna kapsula, koja ga odvaja od tkiva domaćina i olakšava njegovo potpuno odstranjenje tijekom operacijskog postupka (9). Dakle, benigni tumori ne metastaziraju, ne recidiviraju i općenito imaju bolju prognozu od malignih tumora.

U konačnici, najvažniji je utjecaj tumora na pacijenta. Iako maligni tumori zbog svojih karakteristika više ugrožavaju život pacijenta, morbiditet i mortalitet mogu biti povezani s bilo kojim tumorom. Ako se tumor nalazi na položaju na kojem pritišće okolne strukture, može dovesti do rupture i krvarenja. Tumor može ulcerirati kroz susjedne površine i uzrokovati nastanak infekcije. Svojom položajem može smanjiti funkciju okolnog tkiva, poput sinteze hormona ili potaknuti razvoj paraneoplastičnog sindroma. Također, korištenjem hranjivih tvari domaćina, tumori uzrokuju kaheksiju ili iscrpljenost.

2. FUNKCIJA MITOHONDRIJA U TUMORSKIM STANICAMA

2.1. Međudjelovanje mitohondrija i glikolize

Izvor energije u tumorskim stanicama nije jednak za sve stanice, jedne se više oslanjaju na OXPHOS, a druge na glikolizu. Stanice malignih tumora mogu prijeći s jednog izvora energije na drugi, ovisno o uvjetima u kojima se nalaze. U aerobnoj glikolizi nastaju 2 molekule ATP-a po molekuli glukoze, što ju čini manje učinkovitom od OXPHOS-a u kojem nastaje 36 molekula ATP-a. Za stanice raka karakterističan je promijenjeni metabolizam glukoze poznat kao Warburgov efekt u kojem je povećana aerobna glikoliza. Glukoza se putem piruvata pojačano pretvara u laktat, što je obilježje povećanja intenziteta glikolize čak i pri normalnom parcijalnom tlaku kisika u tkivu (10). Tumori koji se oslanjaju na aerobnu glikolizu karakterizira iznimno brz rast, koji se u kliničkoj praksi naziva "glad za glukozom". To svojstvo se koristi za vizualizaciju tumora pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) pomoću fluor-18 fluor deoksi glukoze, derivatom glukoze koji se ne metabolizira.

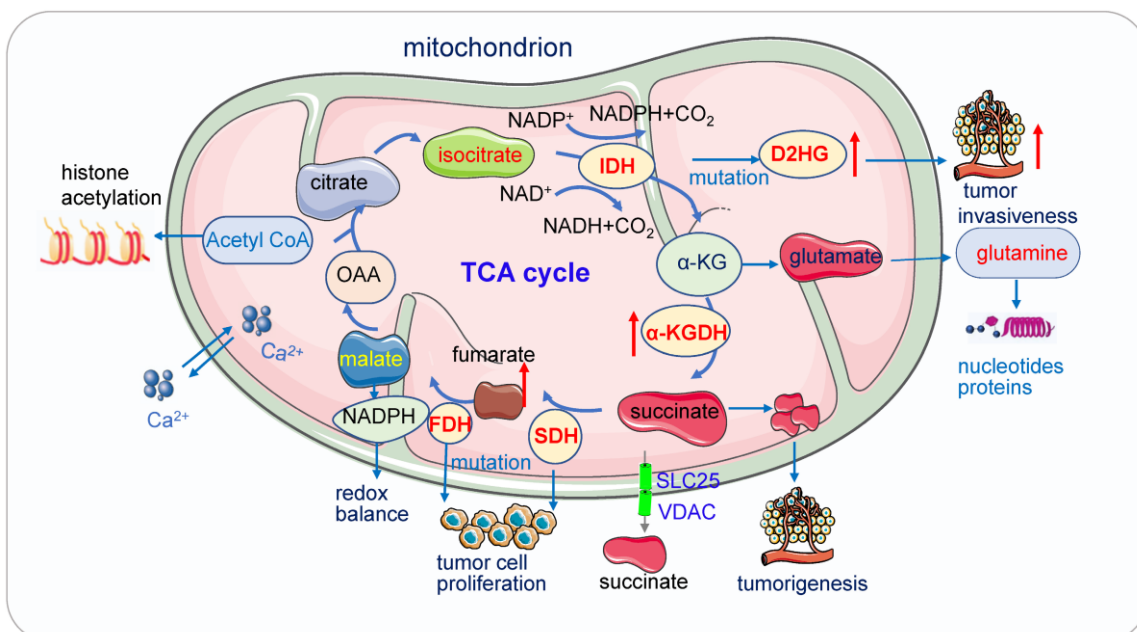
Nedavna studija je pokazala da tumorske stanice raka koje se više oslanjaju na OXPHOS imaju visoku izraženost DNA-metiltransferaze 1 (DNMT1) i nisku izraženost nikotinamid N-metiltransferaze (NNMT). Također vrijedi i obrnuto, da se izvor energije promijeni s OXPHOS na glikolizu kada dođe do prekomjerne izraženosti NNMT-a i *knockdowna* DNMT1. Enzim DNMT1 je jedan od glavnih enzima uključenih u kontroliranje metilacije DNA, prijenos metilne skupine na C5 položaj citozina kako bi nastao 5-metilcitozin (m5C). Metilacija DNA regulira izraženost gena, čiji se obrazac mijenja kao odgovor na fiziološke i okolišne podražaje. Drugi epigenetski mehanizmi, poput modifikacije nekodirajuće RNA i histona, također su povezani s mehanizmom metilacije i demetilacije DNA. Enzim DNMT1 je važan za regulaciju normalnih bioloških funkcija, kao što su razvoj embrija, diferencijacija stanica i transkripcija gena. Promjene u DNMT-u su povezane s nastankom tumora jer mogu dovesti do hipermetiliranosti tumor-supresorskih gena i nestabilnosti genoma, što povećava malignost tumora i pogoršava prognozu za pacijente (11). Enzim NNMT također ima važnu ulogu u pojavi i razvoju različitih vrsta raka remodelirajući epigenetiku stanica, poput hipometiliranosti histona. Studije su pokazale da je enzim NNMT u stanicama karcinoma dojke povezan

s povećanom migracijom stanica i metastazama te inhibicijom autofagije, zbog čega bi NNMT mogao biti potencijalni biomarker raka.

Zanimljiva je činjenica da tumor-supresorski gen *p53* također sudjeluje u poticanju OXPHOS-a (13), što bi upućivalo da vrsta energijskog metabolizma može utjecati na ponašanje tumorskih stanica. Na promjenu izvora energije u tumorskim stanicama utječe i modifikacija RNA. Otkriveno je da su stanice ljudskog oralnog karcinoma s RNA modifikacijom (nedostatkom m5C-a) imale povećanu razinu glikolize. Međutim, nedostatak m5C dovodi do neučinkovitog metastaziranja tumora jer je potreban za aktivaciju invazije i diseminacije (12).

2.2. Metabolizam mitohondrija u raku

Tumorske stanice uvelike se oslanjaju na brojne aktivnosti mitohondrija poput sinteze lipida, nukleotida i aminokiselina. Agresivni tumori pokazuju povećanu sposobnost promijene metabolizma s glikolize na OXPHOS i obrnuto, ali točni mehanizmi još su nejasni. Različiti metaboliti i intermedijarni metaboliti u ciklusu limunske kiseline (TCA) imaju kritičnu ulogu u proliferaciji, metastaziranju i apoptozi tumorskih stanica (slika 4) (13). Stoga razvijanje terapijskih strategija usmjerenih na OXPHOS i metabolizam vezan uz mitohondrije imaju veliki potencijal u terapiji raka.



Slika 4. Funkcija mitohondrija u metabolizmu malignih tumora. Mutacije enzima u TCA-u dovode do visokih koncentracija D2HG, fumarata i sukcinata koji potiču proliferaciju i progresiju tumorskih stanica. Preuzeto iz: Liu Y, Sun Y, Guo Y, Shi X, Chen X, Feng W i sur., 2023. (13)

Acetil-koenzim A

Acetil-koenzim A (Acetil-CoA) jedan je od najvažnijih supstrata u acetilaciji i ključan indikator metabolizma stanica. Može se dobiti iz glukoze (putem OXPHOS-a) i katabolizmom iz aminokiselina ili masnih kiselina. Acetil-CoA sudjeluje u epigenetskoj regulaciji jer promjene njegove razine utječu na acetilaciju histona i posljedično na izraženost gena. To svojstvo ga čini važnim čimbenikom u ranoj diferencijaciji embrionalnih matičnih stanica. Studije su pokazale kako acetil-koenzim A u stanicama glioblastoma potiče migraciju, a u karcinomu pankreasa upravo acetilacija histona povećava proliferaciju stanica (13).

Malonil-CoA, koji nastaje iz acetil-CoA uz pomoć enzima acetil-CoA karboksilaze (ACCS), u nemikrocelularnom karcinomu pluća je potreban za *de novo* sintezu masnih kiselina što rezultira rastom i povećanim preživljavanjem tumora. Stoga bi se inhibicija ACCS-a potencijalno mogla koristiti kao terapija protiv tumora. Još jedan enzim koji bi se u budućnosti mogao koristiti kao meta u terapiji je acetil-CoA sintetaza 2 (ACSS2) za koji je otkriveno kako doprinosi rastu tumorskih stanica u uvjetima niske razine kisika i osiromašenih lipida, tako što potiče korištenje acetata (14).

Citrat

Citrat nastaje oksidacijom acetil-CoA u ciklusu limunske kiseline, a tumorske stanice koriste ekstracelularni citrat za svoj rast. Promjene razine citrata utječu na modulaciju tumorskih i imunoloških stanica, u vidu apoptoze i imunološkog odgovora. U visoko proliferativnim stanicama tumora razina citrata inhibira glikolizu i potiče glukoneogenezu. No, povišene unutarstanične razine citrata u tumorskim stanicama zaustavljaju dediferencijaciju, agresivnost i proliferaciju aktiviranjem autofagije, što ga čini potencijalnom metom u terapiji protiv tumora (13).

Izocitrat

Izocitrat je intermedijarni metabolit u ciklusu limunske kiseline i oksidira se pomoću enzima izocitrat dehidrogenaze (IDH), a kao produkt nastaju α -ketoglutarat i ugljikov dioksid. Postoje dvije inačice enzima, IDH1 i IDH2 u mitohondriju i citosolu koje smanjuju proizvodnju α -ketoglutarata i reduciraju NADPH iz izocitrata ili oksidiraju NADP⁺ i pretvaraju α -ketoglutarat u D-2-hidroksiglutarat (D-2HG). Upravo se povišene razine D-2HG-a mogu koristiti kao biomarker za mnoge zloćudne tumore (13).

Mutacije *IDH1* i *IDH2* su česte u malignim tumorima, a induciraju epigenetske i transkripcijske promjene koje potiču razvoj brojnih zloćudnih tumora pa bi njihova inhibicija mogla pridonijeti liječenju malignih tumora (15).

α -ketoglutarat

Molekula α -ketoglutarat ključni je endogeni metabolit u ciklusu limunske kiseline, a neke od njegovih najvažnijih uloga uključuju regulaciju metabolizma stanica i inhibiciju autofagije izazvanu gladovanjem. Važan je kofaktor u histon-demetilazi i tako utječe na regulaciju u epigenetici. Uz to, ima važnu ulogu i u imunološkom odgovoru (13).

Studije su pokazale da u stanicama kolorektalnog karcinoma α -ketoglutarat djeluje kao antineoplastični metabolit, izravno regulirajući signalni put tako što potiče hipometilaciju DNA i histona te pokreće diferencijaciju stanica tumora (16). Pomoću α -ketoglutarat dehidrogenaze (α -KGDH) α -ketoglutarat se metabolizira u sukcinil-CoA.

Sukcinat

Sukcinat je glavni modulator staničnog metabolizma u hipoksiji i pri nakupljanju, zajedno s D-2HG-om i fumaratom, čini onkometabolite, pokretače tumorigeneze. Ima i ključnu ulogu u aktivaciji makrofaga u upalnom odgovoru. Sukcinat se nalazi unutar stanice (u citosolu i mitohondrijima) i u izvanstaničnom prostoru.

U ciklusu limunske kiseline sukcinat se oksidira u fumarat pomoću enzima mitohondrijskog kompleksa II (SDH; enzim SDH oksidira ubikvinon na kompleksu II u respiratornom lancu). Nedostatak SDH-a dovodi do nakupljanja sukcinata, što posljedično dovodi do inhibicije α -ketoglutarat-ovisne dioksigenaze. Ovi enzimi su

važni regulatori demetilacije DNA i histona te modifikacije RNA, što ih čini važnim regulatorima tumorigeneze (13). Nedostatak SDH-a dovodi i do promjena u staničnom metabolizmu tako što se povećava aktivnost glikolize i produkcije laktata. Također, SDH je važan i u regulaciji proliferacije T-stanica i upalnom odgovoru (17).

Dakle, SDH ima ulogu tumor-supresora, a sukcinat onkometabolita.

Fumarat

Nakupljanje fumarata i gubitak fumarat-hidrataze (FH) smatra se jednim od ključnih pokretača u raznim onkogenim kaskadama. Stanice s mutacijom FH-a povećavaju glikolizu i pretvaranje glutamina prvo u α -ketoglutarat, a zatim u citrat što potiče daljnju progresiju tumora. Gubitak FH-a utječe i na hipermetilaciju promotora tumor-supresora kinaze ovisne o ciklinu inhibitora 2A (CDKN2A), što se smatra prediktivnim faktorom nepovoljne prognoze raznih malignih tumora (13).

Malat

Malat u stanicama nastaje iz fumarata pomoću FH-a. U reverzibilnoj reakciji pomoću malat-dehidrogenaze i redukcije NAD^+ nastaje oksaloacetat, što ju čini jednom od najvažnijih oksidoreduktaza u brojnim metaboličkim procesima.

U stanicama malignih tumora ovaj malat-aspartatni prijenosni sustav ne koristi se za povećanje energije mitohondrijskog metabolizma, već za održavanje glikolize (18).

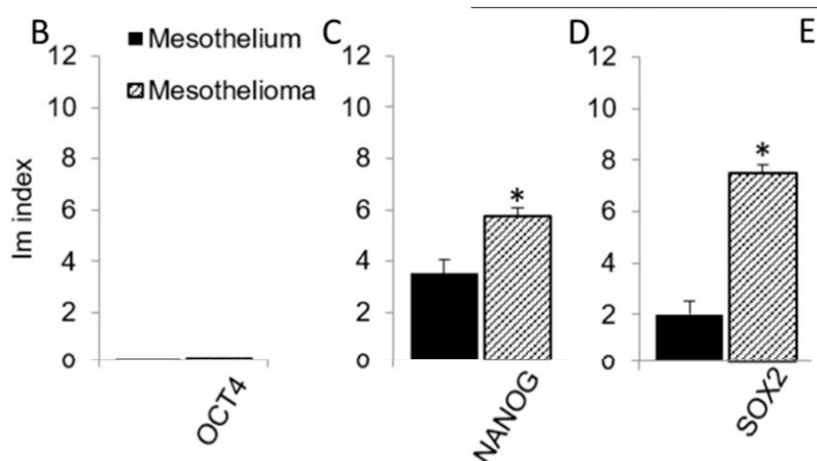
Oksaloacetat

Oksaloacetat također ima važnu ulogu u modulaciji staničnog metabolizma u tumorskim stanicama, a može nastati iz: malata, aspartata, piruvata i fosfoenolpiruvata. Studije su pokazale da ima važnu ulogu u apoptozi stanica hepatocelularnog karcinoma u ljudi zaustavljajući glikolizu i potičući OXPHOS (13).

3. ULOGA ROS-A U INDICIRANJU ČIMBENIKA PLURIPOTENCIJE

Dobro je poznata činjenica kako se tumorsko tkivo ne sastoji od homogenih neograničeno replicirajućih stanica, već od vrlo heterogenih staničnih populacija u kojima se nalaze matične stanice raka (CSC). Njih karakterizira pojačana izraženost gena za samoobnavljanje i pluripotenciju, koji se mogu pronaći u pluripotentnim i adultnim matičnim stanicama, a daju sposobnost diferencijacije tumorskih stanica u različita tkiva i tipove stanica. No, mogle bi biti odgovorne i za metastaziranje tumora, pa čak i otpornost na terapiju (20).

Matične stanice raka pokazuju visoku izraženost čimbenika pluripotencije poput OCT4, NANOG-a i SOX2, koji imaju važnu ulogu u poticanju dediferencijacije, što poprima klinički značaj u lošoj prognozi pacijenata (19). Visoke razine ROS-a, koji nastaju u mitohondrijima, potiču prekomjernu aktivaciju signalnih puteva i određuju brojne stanične funkcije i izraženost gena, poput onih za pluripotenciju i diferencijaciju. Posebno je zanimljiva studija u kojoj je stimulirana mitohondrijska proizvodnja ROS-a pomoću antimicina A, blokirajući kompleks III respiratornog lanca, u uzorcima humanog mezotelioma i normalnog mezotela. Prilikom primjene anitimicina A povećana je i izraženost čimbenika pluripotencije NANOG-a u staničnoj kulturi mezoteliomskih stanica (Mero-14). Uzorci humanog normalnog mezotela i mezotelioma analizirani su patohistološki i imunohistokemijski. Pronađena je povećana izraženost čimbenika pluripotencije NANOG-a i SOX2 u uzorcima humanog mezotelioma u usporedbi sa stanicama mezotela (slika 5) (19).



Slika 5. Sažeti podaci Im-indeksa za proteine OCT4, NANOG i SOX2, koji predstavljaju relativnu izraženost svakog proteina u uzrocima humanog mezotelioma i pleure. Preuzeto iz: Sedlic F, Seiwerth F, Sepac A, Sikiric S, Cindric M, Milavic M i sur., 2020. (19)

Autori su uspoređivali i podtipove mezotelioma, gdje je pronađeno da je NANOG više izražen u pleomorfnom podtipu mezotelioma, koji je slabije diferenciran, u usporedbi s tubulopapilarnim podtipom. Stoga se može zaključiti kako mitohondriji u stanicama humanog mezotelioma imaju veliki kapacitet za stvaranje ROS-a što potiče izraženost NANOG proteina i u konačnosti potiče dediferencijaciju mezotelioma (19).

Dakle, mitohondriji preko stvaranja ROS-a u tumorima smanjuju njihov stupanj diferencijacije.

4. ULOGA MITOHONDRIJSKE DINAMIKE U AGRESIVNOSTI I DIFERENCIJACIJI TUMORSKIH STANICA

Distribucija i morfologija mitohondrija regulirana je kroz stalne cikluse fuzije i fisije, koje su sastavni dio fiziologije stanice. Diobu mitohondrija reguliraju proteini povezani s dinaminom (DRP), koji oblikuju spirale oko mitohondrija i čija je zajednička funkcija reguliranje dinamike membrane u različitim staničnim procesima (21).

Matične stanice raka su podpopulacija stanica unutar tumora sa sposobnošću samoobnavljanja i diferencijacije. Matične stanice raka aktiviraju prijelaz epitela u mezenhim (EMT) kako bi se olakšao fizički prijelaz stanica tumora iz tkiva u kojem nastaju u udaljena tkiva, odnosno stvaranje metastaza. U EMT-u stanice raka smanjuju izraženost markera epitela (poput E-kadherina) i povećavaju izraženost markera karakterističnih za mezenhim (npr. vimentin) (22). Ove molekularne promjene popraćene su morfološkom promjenom stanica i povećanom proizvodnjom proteolitičkih enzima, što pogoduje razvoju migracijskih karakteristika i nastanku metastaza. Dakle, EMT potiče migraciju, invaziju i stvaranje metastaza. Matične stanice raka utječu i na brojne mitohondrijske procese, uključujući njihovu dinamiku i metabolizam. U studiji na epitelnim stanicama karcinoma dojke je pokazano kako se redukcijom mtDNA potiče fisija mitohondrija. Posljedično dolazi do povećanja koncentracije kalcija u citosolu i aktiviranja retrogradnog signalnog puta ovisnog o kalcineurinu. Time se potiče EMT i stjecanje migratornog i invazivnog fenotipa CSC-a (Slika 6B) (22).

Fragmentiranje mitohondrija se povezuje s povećanom glikolizom i smanjenom OXPHOS-om, povećanim stvaranjem ROS-a, mitofagijom i EMT-om. Manji mitohondriji češće se nalaze u „nezrelim“ stanicama koje imaju visoku aktivnost fisije, poput somatskih matičnih i tumorskih stanica (23).

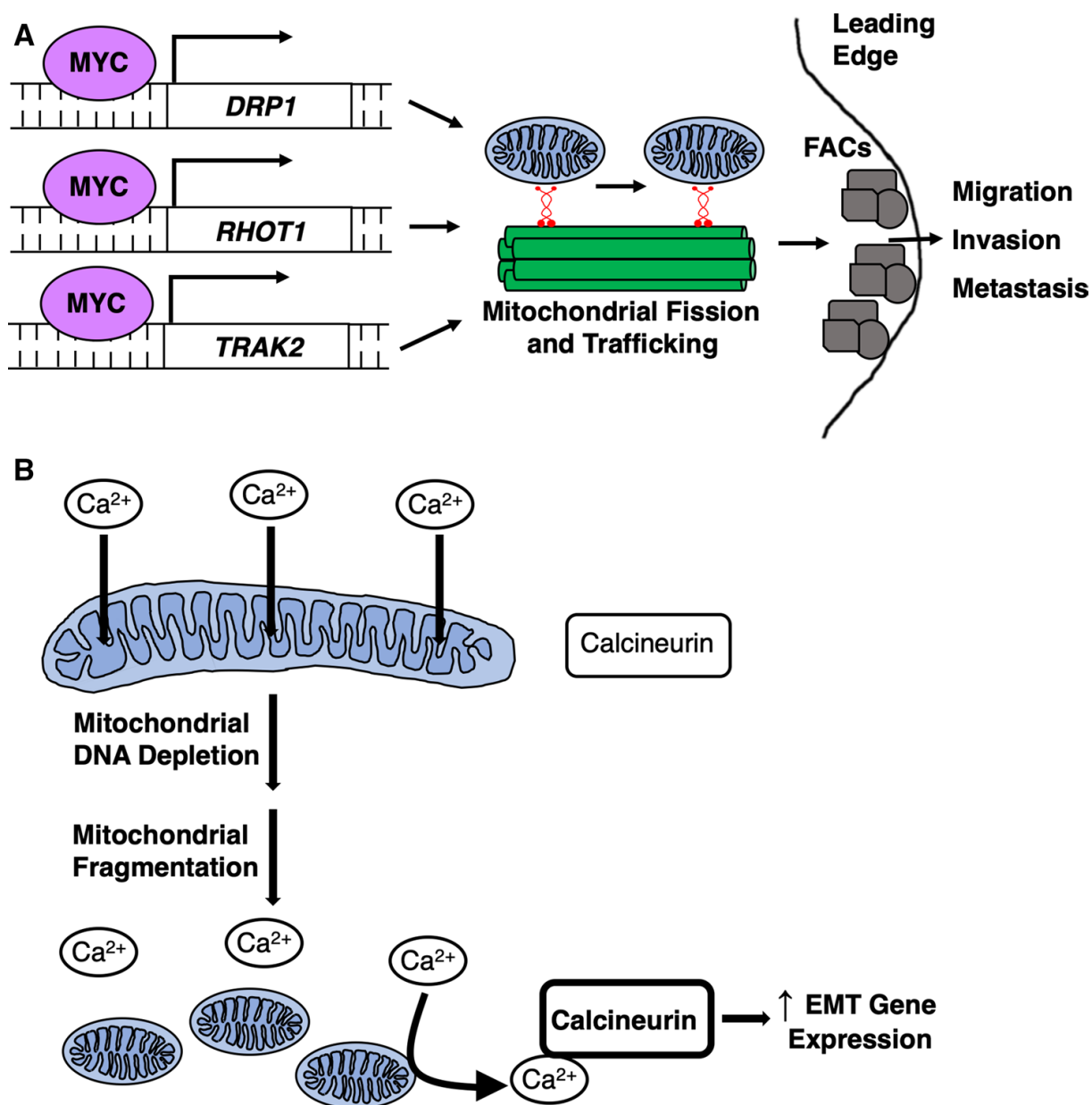
Onkogen MYC ima izuzetno važnu ulogu u reguliranju fisijskog proteina DRP1, atipične mitohondrijske GTP-aze RHOT1 i adapterskog proteina TRAK2, čime se potiče fisija mitohondrija (23). Mitohondrijska fisija potiče redistribuciju mitohondrija duž kortikalnog aktinskog citoskeleta stanica tumora. Promoviranjem fokalnog adhezijskog kompleksa (FAC) u konačnici se omogućuje invazija tumorskih stanica i

stvaranje metastaza (slika 6A) (24). Stoga, pravilna mitohondrijska dinamika ima ulogu u pokretljivosti mitohondrija unutar stanice te pokretanju migracije tumorskih stanica.

Mitofagijski protein NIX je izražen u CSC-u glioblastoma, gdje ima ključnu ulogu u mitofagiji izazvanoj hipoksijom i oksidativnim stresom. Zanimljivo je da njegovim suprimiranjem dolazi do smanjenja izraženosti čimbenika pluripotencije OCT4 i SOX2, što posljedično rezultira smanjenjem preživljenja stanica glioblastoma. Mitofagijski put posredovan NIX-om predstavlja potencijalno ključnu terapijsku metu za solidne tumore (25). Ovo otkriće baca novo svjetlo na mitofagiju, ukazujući na njezin značajan utjecaj na varijabilnost stanica putem reguliranja čimbenika pluripotencije (a time i diferencijacije).

Spajanje (fuzija) mitohondrija se povezuje s povećanom OXPHOS-om i rezistencijom tumora na terapiju. Mehanizmi rezistencije na terapiju često su specifični za tkivo ili vrstu tumora. No, čini se da su pojačana regulacija OXPHOS-a i ovisnost o mitofagiji ključ za preživljenje i očuvanje karakteristika CSC-a (23).

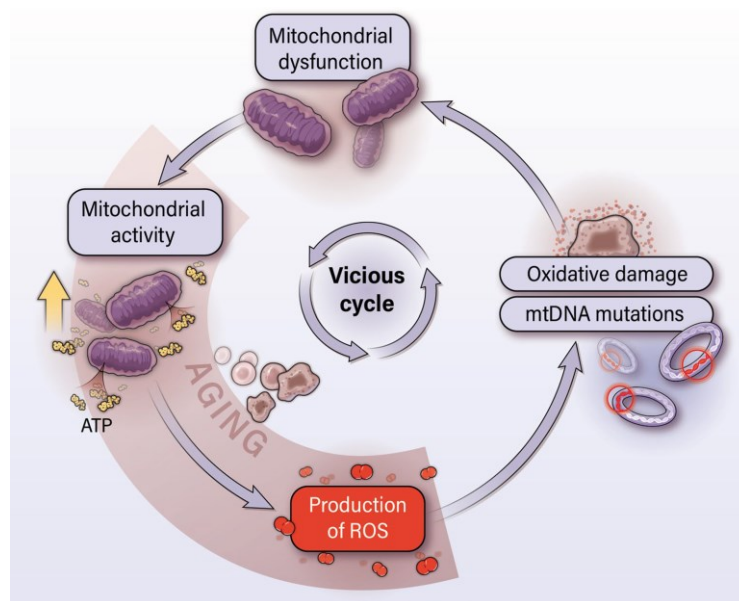
Izloženost radioterapiji potiče mitohondrije na stvaranje ROS-a te posljedično promicanje CSC-fenotipa, uključujući EMT. Također, radioterapija potiče mitohondrije CSC-a na povećanje OXPHOS-a i fuzije kao prilagodbu na oštećenje DNA (23). Studije na karcinomima vrata maternice i jajnika su pokazale da postojanje tubularne mitohondrijske mreže utječe na pojavu rezistencije na cisplatinu (26). Kemorezistentne stanice su imale razvijenu tubularnu mrežu mitohondrija i prije primjene terapije. Otkrivena je i pojačana regulacija mitofagije, pokazujući važnu ulogu dinamike mitohondrija u održavanju karakteristika CSC-a (23). Dakle, primjena radioterapije i kemoterapije dovodi do sličnog metaboličkog odgovora i morfološke promjene mitohondrija u CSC-u, dovodeći do spajanja mitohondrija u veću masu i stvaranja proširenih mreža mitohondrija.



Slika 6. Mehanizmi EMT-a posredovanog mitohondrijskom dinamikom. A) Onkogen MYC pojačava ekspresiju *DRP1*, *RHOT1* i *TRAK2* gena čime se povećava pokretljivost mitohondrija prema kortikalnom staničnom rubu. Zatim se promovira FAC, koji je važan za staničnu migraciju, invaziju i metastaziranje. B) Redukcija mtDNA dovodi do fragmentacije mitohondrija što povećava kalcij u citosolu i aktivira kalcineurin, čime se povećava EMT. Preuzeto iz: Sessions DT, Kashatus DF, 2021. (23)

5. ULOGA MITOHONDRIJSKOG ODGOVORA NA RAZMOTANE PROTEINE

Velika aktivnost mitohondrija u stanicama malignih tumora uzrokuje proizvodnju velikih količina ROS-a u mitohondrijima (mtROS), koji dovode do brojnih mutacija u mitohondrijskoj DNA i oštećenja proteina u mitohondrijima. To uzrokuje disfunkciju mitohondrija u vidu oštećenja OXPPOS-a i sniženja energetske proizvodnje, što posljedično dovodi do daljnjeg povećanja mtROS-a čime se zatvara začarani krug (slika 7) (27).

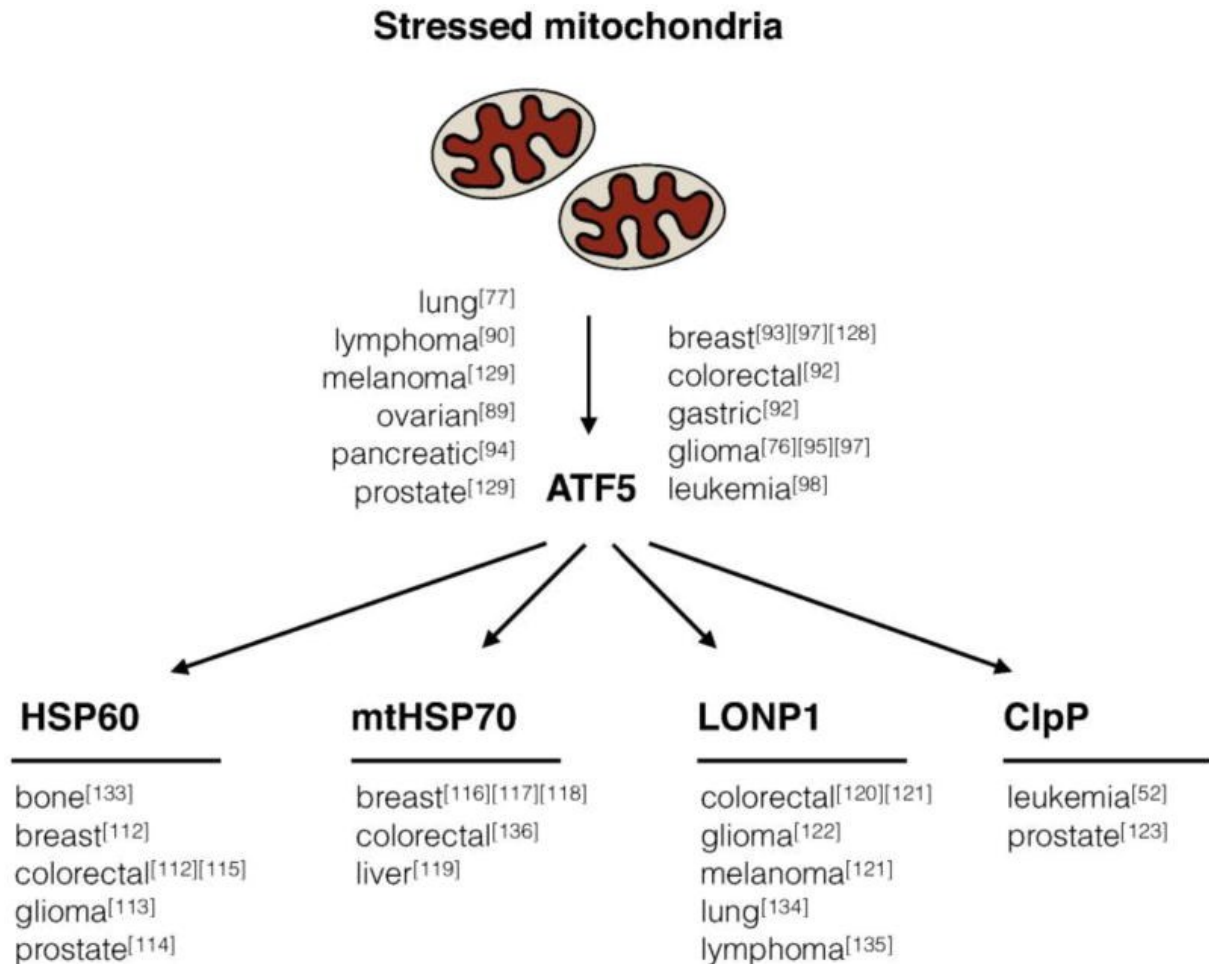


Slika7. Začarani krug razvoja mitohondrijske disfunkcije u stanicama koje stare i stanicama raka. Povećano stvaranje ROS-a u mitohondrijima uzrokuje oštećenje mtDNA koje dovodi do većeg stvaranja ROS-a. Preuzeto iz: Inigo JR, Chandra D, 2022. (27)

Stoga su stanice tumora razvile sustav kontrole kvalitete mitohondrija boreći se protiv mtROS pomoću aktivacije UPR^{mt} -a (mitochondrial unfolded protein response).

UPR^{mt} sustav sastoji se od proteaza, koje uništavaju mitohondrijske proteine oštećene mtROS-om i šaperona (HSP; heat shock proteins), koji ih pokušavaju ispravno smotati (27,28). Dakle, UPR^{mt} ima zaštitnu ulogu u odgovoru tumorskih stanica na mitohondrijski stres omogućavanjem održavanja integriteta mitohondrija, a time i preživljavanje stanica i nastavak rasta tumora.

UPR^{mt} se sastoji od brojnih komponenti, uključujući transkripcijski faktor ATF5, šaperone (HSP60 i mtHSP70) i mitohondrijske proteaze (LONP1 i ClpP) (slika 8).



Slika 8. Komponente UPR^{mt} sustava i njihova visoka izraženost u različitim vrstama tumora. Prikaz djelovanja transkripcijskog čimbenika ATF5, efektorskih šaperona (HSP60 i mtHSP70) i proteaza (LONP1 i ClpP). Preuzeto iz: Deng P, Haynes CM, 2017. (28)

Activating transcription factor 5 (ATF5)

ATF5 regulira izraženost različitih anti-apoptotskih gena tumora te posreduje u staničnoj proliferaciji i preživljavanju. Visoka izraženost ATF5 povezana je s povećanom smrtnosti pacijenata oboljelih od glioma i karcinoma pluća (28).

Heat shock protein 60 (HSP60)

Kompleks HSP60-HSP10 igra bitnu ulogu u oksidativnom stresu. Iako se HSP60 nakuplja u citoplazmi tijekom apoptoze, njegova svojstva (pro- ili anti-apoptotska) ovise o apoptotskim podražajima. Stvaranjem kompleksa HSP60-p53, dolazi do destabilizacije proteina p53 što smanjuje izraženost pro-apoptotičkih proteina. S druge strane, kada dođe do prekida kompleksa HSP60-p53 inducira se disfunkcija mitohondrija i aktivira apoptoza ovisna o kaspazi (29). Protein HSP60 je povezan s progresijom raznih vrsta tumora. No, studije su pokazale kako povećana izraženost HSP60 u hepatocelularnom karcinomu smanjuje invazivnost tumora te je povezana s boljom prognozom (30).

Mitochondrial heat shock protein 70 (mtHSP70)

Prekomjerna izraženost mtHSP70 povezana je s različitim procesima tumorigeneze. Protein mtHSP70 uzrokuje inaktivaciju tumor-supresorskog proteina p53 vežući se na njega u stanjima stresa (poput terapije cisplatinom), čime zaustavlja proces apoptoze. Zanimljivo je da je prekomjerna izraženost mtHSP70 povezana i s aktivacijom procesa EMT što dovodi do stvaranja metastaza (31). U studijama na neuroblastomu miša pronađena je korelacija izraženosti mtHSP70 s fragmentacijom mitohondrija, povezujući ga s fisijskim proteinom Drp-1 (32). Prekomjerna izraženost mtHSP70 je povezana i s različitim kliničkim značajkama, pa je tako kod karcinoma dojke povezan sa histološkim nalazom višeg *gradusa*, a time i smanjenim preživljenjem (33).

Lon peptidase (LONP1)

Uloga LONP1 je cijepanje agregata proteina, koji nastaju u stanjima oksidativnog stresa, u kratke peptide. Time se poboljšava funkcija mitohondrija u stanicama raka što potiče njihovu proliferaciju, migraciju i invaziju. U studijama na stanicama karcinoma gušterače, pokazano je da LONP1 potiče EMT (34).

Zanimljiva je i ključna uloga LONP1 u reguliranju prelaska metabolizma na glikolizu u stanicama karcinoma želudca, uzrokovanog infekcijom *Helicobacter pylori* (35).

6. CILJANJE MITOHONDRIJA U LIJEČENJU RAKA

Mitohondriji u stanicama raka imaju ključnu ulogu u brojnim procesima važnim za proliferaciju, invaziju i metastaziranje, što ih čini pogodnom metom terapijskih intervencija kod različitih tipova raka. Jedan od ciljeva mogu biti procesi u anaplerozu mitohondrija: glikoliza, oksidacija masnih kiselina i glutaminoliza, koji imaju važnu ulogu u stvaranju supstrata korištenih u TCA-u. U stanicama tumora ovi procesi podržavaju djelomično preživljavanje i proliferaciju neovisno o metabolizmu mitohondrija (36).

2-deoksi-D-glukoza (2DG)

Stanice raka se uvelike oslanjaju na metabolizam glukoze, stoga se ciljanim ometanjem unosa glukoze pomoću analoga glukoze (2DG), smanjuje dostupnost piruvata i posljedično oštećuje mitohondrijska anapleroza i OXPHOS. Molekula 2DG je povezana s induciranjem autofagije i povećanim oksidativnim stresom, što potiče apoptozu i usporava rast tumora (37). Najveći terapijski učinak 2DG uočen je prilikom njegove kombinacije s konvencionalnom kemoterapijom (cisplatinom i doksorubicinom) i u kombinaciji s radioterapijom (u liječenju glioblastoma) (36).

Etomoksir

Karnitin palmitoiltransferaza 1 (CPT1) je važan enzim u pretvaranju acil-CoA (krajnji proizvod oksidacije masnih kiselina) u acil-karnitin koji prolazi mitohondrijsku membranu i potiče TCA. Etomoksir ireverzibilno inhibira CPT1 čime poboljšava učinkovitost radioterapije, a pomaže i u liječenju kaheksije (36).

Ciklus limunske kiseline je središnji put za OXPHOS u stanicama. Inhibicija dereguliranih puteva povezanih s TCA-om potencijalna su meta za sprječavanje tumorigeneze. Neki od inhibitora enzima TCA korišteni u kliničkim studijama su: specifični inhibitor glutaminaze (CB-839), inhibitor piruvat dehidrogenaze i α -KGDH-a

(i CPI-613) te inhibitor mutiranih IDH1 i IDH2 (AG-881) (36). Enasidinib (AG-221) je inhibitor mutiranog enzima IDH2, koji je podvrgnut kliničkim ispitivanjima za liječenje akutne mijeloične leukemije, angio-imunoblastičnog T-staničnog limfoma i glioma. (36).

Respiratorni lanac je neizmjenjivo važan u antioksidativnoj obrani mitohondrija, što ga čini dobrim ciljem za lijekove protiv tumora. Metformin i fenformin su standardna terapija u liječenju šećerne bolesti, a pokazali su se kao najbolji inhibitori kompleksa I ETC-a u stanicama raka (36). Papaverin, koji se inače koristi za liječenje vazospazma i erektilne disfunkcije, također je prijavljen kao inhibitor kompleksa I. Atovaquone je inhibitor kompleksa III ETC-a. Ovaj analog ubikvina se koristi kao lijek za liječenje malarije, upale pluća i pneumocitoze (36). Arsenov trioksid, koji je odobren za liječenje akutne promijelocitne leukemije, inhibira kompleks IV ETC-a. Dušikov oksid i hidrokortizon, također su inhibitori kompleksa IV ETC-a (36).

Lijekovi poput mitoTEMPO-a i mitoQ-a potiskuju daljnju aktivaciju induciranu mtROS-om. Spojevi mitoTEMPO i mitoQ imaju ulogu u uklanjanju mitohondrijskog superoksida, što dovodi do blokiranja migratornih, invazivnih i metastatskih fenotipova stanica raka (36).

Još jedna od meta u liječenju raka je obnavljanje mitohondrijske apoptoze. Apoptoza se može potaknuti otpuštanjem citokroma c i aktiviranjem stanične smrti ovisne o kaspazi. Fotodinamička terapija inducira otpuštanje citokroma c i posljedično oštećuje tumorske stanice (36). No, zanimljivo je kako neki prirodni spojevi, poput kurkume i resveratrola, induciraju apoptozu stanica raka, a da pri tome nisu toksični za normalne stanice (38). Induciranjem fuzije i sprječavanjem fisije mitohondrija inhibira se mitofagija, što ima važnu ulogu u regulaciji apoptoze i čini ih potencijalnim ciljem u terapiji tumora. Protein Mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor) blokira diobu mitohondrija inhibicijom aktivnosti fisijskog proteina DRP1-a, čime se sprječava mitofagija (39). Dynasore je još jedan inhibitor DRP1-a, koji inducira apoptozu i inhibira migraciju i invaziju u različitim staničnim linijama raka. Studije su pokazale da mala prirodna molekula S3 snažno potiče fuziju mitohondrija kako bi se obnovila mitohondrijska mreža i OXPHOS u stanicama, što se može iskoristiti u liječenju raka (40).

Osim navedenih mitohondrijskih inhibitora, u terapiji liječenja raka mogu se koristiti i spojevi koji neizravno moduliraju mitohondrijske funkcije. α -tokoferol (vitamin E) je inhibitor GSH S-transferaze (GST), koji sudjeluje u detoksikaciji endogenih i egzogenih spojeva (36). Njegov analog α -tokoferil sukcinat (α -TOS) destabilizira mitohondrije i tako inducira apoptozu u tumorskim stanicama. Katalitička aktivnost GST-a može se koristiti za bioaktivaciju pro-lijekova i njihovu akumulaciju u stanicama raka s visokom izraženosti GST-izoenzima (36).

Ketogene dijetе smanjuju razinu glukoze u krvi i povećavaju korištenje ketonskih tijela, a nastale su na pretpostavci da stanice raka s promijenjenim mitohondrijima ne bi trebale moći koristiti ketonska tijela. Iako postoje podaci o pozitivnom učinku na pacijente s glioblastomom, njihovo antikancerogeno djelovanje još je predmet kliničkih ispitivanja (41).

7. ZAKLJUČAK

Maligni tumori su drugi vodeći uzrok smrti u razvijenom svijetu, odmah iza kardiovaskularnih bolesti. Mitohondriji su važni medijatori tumorigeneze jer omogućavaju fleksibilnost u prilagodbi staničnim i okolišnim promjenama. U ovom preglednom radu, raspravljali smo o mehanizmima i putevima brojnih funkcija mitohondrija na koje se tumorske stanice oslanjaju, kako bi nastavile proliferaciju i povećale agresivnost. Mitohondrijski respiratorni lanac je glavni izvor ROS-a, koji u stanici može dovesti do oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina poput mtDNA. Povećano stvaranje ROS-a u tumorima potiče prekomjernu izraženost čimbenika pluripotencije što smanjuje stupanj diferencijacije tumora. Dinamika mitohondrija je fiziološki proces potreban za normalno funkcioniranje stanica. No, dinamika mitohondrija i mitofagija imaju važnu ulogu i u reguliranju čimbenika pluripotentnosti. Proteini fisije imaju ulogu u invaziji i metastaziranju. Stanice tumora posjeduju i sustav kontrole kvalitete mitohondrija koji održava homeostazu mitohondrija, a omogućava preživljenje tumorskih stanica u nepovoljnim uvjetima poput primjene antitumorske terapije.

Napredovanjem u razumijevanju uloge mitohondrija u nastajanju, diferencijaciji i rezistenciji malignih tumora, otkrivaju se potencijalna mjesta intervencije što vodi razvoju antineoplastičnih lijekova usmjerenih na mitohondrije.

8. ZAHVALE

Prije svega zahvaljujem mentoru, izv. prof. dr. sc. Sedliču, na strpljenju i stručnom vodstvu u izradi ovog diplomskog rada.

Hvala akademiku Bojanu Jelakoviću na prenesenom znanju i pruženim prilikama tijekom studija.

Zahvaljujem i cijeloj svojoj obitelji i svim dragim prijateljima, a posebno hvala sestri Miji na neprestanoj potpori, razumijevanju i motivaciji.

9. LITERATURA

1. Cooper G, Adams K. The cell the cell: A molecular approach. 9th ed. New York, NY: Oxford University Press; 2023.
2. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, P Anthony Weil. Harper's illustrated biochemistry. New York: Mcgraw-Hill Medical; 2018.
3. Gamulin S, Marušić M , Kovač Z. i sur. Patofiziologija (Knjiga prva). 8. izd. Zagreb, Medicinska naklada; 2018.
4. Mccance K, Huether S. Pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children. 8th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2019.
5. Sena LA, Chandel NS. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol Cell*. 2012 Oct;48(2):158–67.
6. Fisher CR, Shaaeli AA, Ebeling MC, Montezuma SR, Ferrington DA. Investigating mitochondrial fission, fusion, and autophagy in retinal pigment epithelium from donors with age-related macular degeneration. *Sci Rep*. 2022 Dec 16;12(1):21725.
7. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Robbins Basic Pathology. 9th ed. Saunders; 2012.
8. Dhanasekaran R, Deutzmann A, Mahauad-Fernandez WD, Hansen AS, Gouw AM, Felsher DW. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Jan;19(1):23-36.
9. Damjanov I, Seiwert S, Jukić S, Nola M. Patologija, peto preuređeno i dopunjeno izdanje. Zagreb, Medicinska naklada; 2018.
10. Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer letters*. 2014; 355(2): 176-183.
11. Zhang J, Yang C, Wu C, Cui W, Wang L. DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 31;12(8):2123.
12. Delaunay S, Pascual G, Feng B, Klann K, Behm M, Hotz-Wagenblatt A, et al. Mitochondrial RNA modifications shape metabolic plasticity in metastasis. *Nature*. 2022 Jul;607(7919):593-603.

13. Liu Y, Sun Y, Guo Y, Shi X, Chen X, Feng W, et al. An Overview: The Diversified Role of Mitochondria in Cancer Metabolism. *Int J Biol Sci.* 2023 Jan 16;19(3):897-915.
14. Schug ZT, Peck B, Jones DT, Zhang Q, Grosskurth S, Alam IS, et al. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell.* 2015; 27: 57-71.
15. Stuani L, Sabatier M, Saland E, Cognet G, Poupin N, Bosc C, et al. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2021; 218.
16. Tran TQ, Hanse EA, Habowski AN, Li H, Ishak Gabra MB, Yang Y, et al. alpha-Ketoglutarate attenuates Wnt signaling and drives differentiation in colorectal cancer. *Nat Cancer.* 2020; 1: 345-58.
17. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell.* 2016 Oct 6;167(2):457-470.e13.
18. Ma YC, Tian PF, Chen ZP, Yue DS, Liu CC, Li CG, et al. Urinary malate dehydrogenase 2 is a new biomarker for early detection of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 2349-60.
19. Sedlic F, Seiwerth F, Sepac A, Sikiric S, Cindric M, Milavic M, et al. Mitochondrial ROS Induce Partial Dedifferentiation of Human Mesothelioma via Upregulation of NANOG. *Antioxidants (Basel).* 2020 Jul 10;9(7):606.
20. Iglesias JM, Gumuzio J, Martin AG. Linking Pluripotency Reprogramming and Cancer. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Feb;6(2):335-339.
21. Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, et al. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol.* 2005 Sep 26;170(7):1021-7.
22. Guha M, Srinivasan S, Ruthel G, Kashina AK, Carstens RP, Mendoza A, et al. Mitochondrial retrograde signaling induces epithelial-mesenchymal transition and generates breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2014 Nov 6;33(45):5238-50.
23. Sessions DT, Kashatus DF. Mitochondrial dynamics in cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Apr;78(8):3803-3816.

24. Agarwal E, Altman BJ, Ho Seo J, Bertolini I, Ghosh JC, Kaur A, et al. Myc Regulation of a Mitochondrial Trafficking Network Mediates Tumor Cell Invasion and Metastasis. *Mol Cell Biol*. 2019 Jun 27;39(14):e00109-19.
25. Jung J, Zhang Y, Celiku O, Zhang W, Song H, Williams BJ, et al. Mitochondrial NIX Promotes Tumor Survival in the Hypoxic Niche of Glioblastoma. *Cancer Res*. 2019 Oct 15;79(20):5218-5232.
26. Kong B, Tsuyoshi H, Orisaka M, Shieh DB, Yoshida Y, Tsang BK. Mitochondrial dynamics regulating chemoresistance in gynecological cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Sep;1350:1-16.
27. Inigo JR, Chandra D. The mitochondrial unfolded protein response (UPRmt): shielding against toxicity to mitochondria in cancer. *J Hematol Oncol*. 2022 Jul 21;15(1):98.
28. Deng P, Haynes CM. Mitochondrial dysfunction in cancer: potential roles of ATF5 and the mitochondrial UPR. *Semin Cancer Biol*. 2017;47:43–9.
29. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2008 Feb 22;283(8):5188-94.
30. Zhang J, Zhou X, Chang H, Huang X, Guo X, Du X, et al. Hsp60 exerts a tumor suppressor function by inducing cell differentiation and inhibiting invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Oct 18;7(42):68976-68989.
31. Yun CO, Bhargava P, Na Y, Lee JS, Ryu J, Kaul SC, et al. Relevance of mortalin to cancer cell stemness and cancer therapy. *Sci Rep*. 2017 Feb 6;7:42016.
32. Park SJ, Shin JH, Jeong JI, Song JH, Jo YK, Kim ES, et al. Down-regulation of mortalin exacerbates A β -mediated mitochondrial fragmentation and dysfunction. *J Biol Chem*. 2014 Jan 24;289(4):2195-204.
33. Jin H, Ji M, Chen L, Liu Q, Che S, Xu M, et al. The clinicopathological significance of Mortalin overexpression in invasive ductal carcinoma of breast. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016 Mar 9;35:42.
34. Liu C, et al. Inhibition of LONP1 suppresses pancreatic cancer progression Via c-Jun N-terminal kinase pathway-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Pancreas*. 2019;48(5):629–35.
35. Luo B, et al. ATP-dependent Lon protease contributes to helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis. *Neoplasia*. 2016;18(4):242–52.

36. Grasso D, Zampieri LX, Capelôa T, Van de Velde JA, Sonveaux P. Mitochondria in cancer. *Cell Stress*. 2020 May 11;4(6):114-146.
37. Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett*. 2014 Dec 28;355(2):176-83.
38. Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, De Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T, et al. A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep*. 2014 Aug 7;8(3):754-66.
39. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell*. 2008 Feb;14(2):193-204.
40. Yue W, Chen Z, Liu H, Yan C, Chen M, Feng D, et al. A small natural molecule promotes mitochondrial fusion through inhibition of the deubiquitinase USP30. *Cell Res*. 2014 Apr;24(4):482-96.
41. Zuccoli G, Marcello N, Pisanello A, Servadei F, Vaccaro S, Mukherjee P, et al. Metabolic management of glioblastoma multiforme using standard therapy together with a restricted ketogenic diet: Case Report. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Apr 22;7:33.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17.01.2000. godine u Bjelovaru. Pohađala sam II. osnovnu školu u Bjelovaru, nakon čega sam 2014. godine upisala Opću Gimnaziju u Bjelovaru. Paralelno sa srednjoškolskim obrazovanjem završila sam i Glazbenu školu Vatroslav Lisinski u Bjelovaru za francuski rog, kao najbolja učenica generacije. 2018. godine sam upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. Tijekom studija bila sam predsjednica Studentske sekcije za hipertenziju, vodila studentski dio projekta „Lov na tihog ubojicu“ Hrvatske lige za hipertenziju i sudjelovala u brojnim javnozdravstvenim akcijama diljem Hrvatske. Za sudjelovanje u projektu nagrađena sam Rektorovom nagradom za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici 2022. godini. Kao prvi autor nekoliko radova držala sam izlaganje na međunarodnim kongresima u Milanu 2023. i u Berlinu 2024. godine, „32nd“ i „33rd Scientific Meeting of the European Society of Hypertension (ESH) on “Hypertension and Cardiovascular Protection” te na drugim kongresima. 2024. godine položila sam ILS tečaj (Immediate Life Support).

Godine 2022. u Švedskoj i godine 2023. na Azorima sam sudjelovala kao član EMSOC-a (European Medical Students' Orchestra and Choir). Aktivno se bavim sviranjem roga u Zagrebačkom orkestru ZET-a.