

Univerzitet u Beogradu
Medicinski fakultet

Anđelka M. Isaković

Uticaj etil estra cikloheksil analoga
etilendiamin dipropanske kiseline na ćelije
melanoma miša *in vitro* i *in vivo*

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

University of Belgrade
Faculty of Medicine

Anđelka M. Isaković

Effects of ethyl ester cyclohexyl analog of
ethylene diamine dipropanoic acid against
mouse melanoma cells *in vitro* and *in vivo*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentor:

dr Sonja Misirlić Denčić, docent
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Članovi komisije:

dr Aleksandra Isaković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Maja Misirkić Marjanović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Insitut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

dr Ivanka Zelen, vanredni profesor
Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka

Datum odbrane: _____

U eksperimentalnom radu iz kojeg je proistekla ova disertacija pomogle su kolege iz Galenike AD, kolege sa Instituta za mikrobiologiju i imunologiju i Instituta za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kolege sa Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu i kolege sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Posebnu zahvalnost dugujem doc. dr Saši Petričeviću za zajedničke sate rada u vivarijumu provedene u prijateljskoj atmosferi.

Zahvalna sam rukovodiocu projekta u okviru kog je urađena ova disertacija, prof. dr Vladimiru Trajkoviću, i rukovodiocu istraživačkog tima kome pripadam, prof. dr Ivanki Marković, na ukazanom poverenju.

U završnoj fazi izrade pomogli su i korisnim sugestijama i savetima značajno doprineli da teza dobije ovakav finalni oblik članovi komisije: prof. dr Ivanka Zelen, naučni saradnik Maja Misirkić-Marjanović i prof. dr Aleksandra Isaković kojoj sam zahvalna i na dugogodišnjoj uspešnoj saradnji.

Zahvalnost dugujem svim članovima kolektiva Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, profesorkama, docentkinjama, asistentkinjama, saradnicima u nastavi, istraživačima, laborantima, administrativnim i pomoćnim radnicima, koji su imali razumevanja, bili podrška i učinili da moje vreme provedeno na poslu ima karakter prijateljskog okruženja.

Ulogu u privođenju kraju ovog poduhvata su imali Mimi, Tihomir, Vesna, Mara i Maja na koje mogu da se oslonim bilo da je potrebno da me saslušaju, završe eksperiment, pomognu sa administracijom ili održe nastavu umesto mene. Za prijateljsku podršku - od srca im hvala! Hvala i svim bivšim studentima koji su proveli neko vreme u laboratoriji sa mnom, i uz koje sam, učeći njih, ja puno naučila. Pre svega hvala Ivani R. i Milici S., a hvala i "novim nadama", Jovanu, Kasji i Mariji J., čiji su mi entuzijazam, vedrina i želja za novim saznanjima stalna inspiracija.

Moj doživljaj studiranja i nauke sigurno ne bi bio isti bez Nine, Ivane i Tijane. Od davnog oktobra u Dr Subotića do danas - hvala im što su mi životni prijatelji. Moj ujak i moji Markovići u proširenom sastavu, uz moju tetku Vidu, životna su podrška i zato u ovom za mene bitnom događaju želim da znaju koliko su mi važni. Isto se odnosi i na moje drugare Mariju C., Ivku, Dejana, Jelenu, Sanju i Ivanu M. - hvala vam za godine ljubavi i podrške i što znam da ste uvek tu!

Uloga moje Mentorke, doc. dr Sonje Misirlić Denčić u ovoj disertaciji i mojoj naučnoj karijeri jasna je već pogledom na prethodnu stranu pa je zahvalnost za sve što me je naučila i za to što smo došle do ovog trenutka zato neupitna. Moje osećanje povodom količine podrške, topline, ljubavi i suštinskog poverenja i poštovanja koje mi pruža je ono što ne staje lako u reči. Sonjina uloga u mom životu daleko prevazilazi profesionalne okvire i zato naš odnos svrstavam u one koji se opisuju kao porodični.

U svako slovo, reč, brojku i grafik ove teze i svaki trenutak koji je do njih doveo, utkana je beskrajna vera, stalni podstrek, bezgranična podrška i razumevanje i bezuslovna ljubav moje majke Svetlane i moje Nataše. Umesto reči zahvalnosti njima posvećujem ovaj rad.

Anđelka Isaković

Beograd, mart 2018.

**UTICAJ ETIL ESTRA CIKLOHEKSIL ANALOGA ETILENDIAMIN DIPROPANSKE
KISELINE NA ČELIJE MELANOMA MIŠA *IN VITRO* I *IN VIVO***

Melanom je visoko agresivni maligni tumor kože. Incidenca melanoma se značajno povećala u poslednjih 30 godina, stope morataliteta su visoke, a i pored napretka u hemio-/imuno-/ i radioterapiji odgovor pacijenata sa uznapredovalim stadijumom bolesti je svega 15-25%. Veliki napori se ulažu u otkrivanje, sintezu, karakterizaciju i ispitivanje mehanizma delovanja novih jedinjenja - potencijalnih antitumorskih agenasa. Među njima se izdvajaju derivati etilendiamin dipropanske kiseline, posebno etil ester cikloheksil analog etilendiamin dipropanske kiseline (EE), čiji antimelanomski efekat do sada nije detaljnije objašnjen. Cilj ovog rada je bio da se ispita citotoksični potencijal EE na ćelijskom i animalnom modelu melanoma kao i molekularni mehanizam dejstva koji EE pokreće.

U eksperimentima su korišćene ćelijske linije mišjeg melanoma (B16), mišjih makrofaga (RAW264.7), humanog melanoma (518A2), humanih plućnih fibroblasta (MRC-5) i humanih keratinocita (HaCaT). Vijabilitet ćelija je ispitan testom aktivnosti kisele fosfataze, sulforodamin B testom, MTT testom i bojenjem tripan plavim, dok je integritet ćelijske membrane utvrđen testom oslobađanja laktat dehidrogenaze. Molekularni mehanizam dejstva EE na melanom miša je ispitan utvrđivanjem produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, depolarizacije mitohondrija, aktivacije kaspaza, eksternalizacije fosfatidil serina, fragmentacije DNK i prisustva kiselih vezikula u ćelijama, korišćenjem odgovarajućih fluorohroma i analizom na protočnom citofluorimetru. Nivoi proteina značajnih za apoptozu i autofagiju su mereni imunoblot metodom. Morfološke karakteristike ćelija su ispitane fluorescentnom i transmissionom elektronskom mikroskopijom. U *in vivo* eksperimentima miševima soja C57Bl/6 je indukovano primarno i metastatski melanom injektiranjem B16 ćelija supkutano, odnosno intravenski. Sistemska toksičnost EE je ispitana praćenjem funkcije kostne srži, jetre i bubrega. Ispitan je efekat EE na progresiju supkutanog melanoma u pogledu veličine, a zatim su tumori izolovani i u tumorskom tkivu analizirana ekspresija gena i količina proteina od značaja za apoptozu i autofagiju metodom kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja sa reverznom transkripcijom, odnosno metodom imunoblota. Uticaj

EE na metastatskom modelu melanoma je praćen brojem sekundarnih depozita u plućima miševa.

EE pokazuje citotoksično dejstvo na ćelije melanoma miša i čoveka i pokazuje izvesni nivo selektivnosti u odnosu na mišje i humane netumorske ćelije. EE uzrokuje morfološke promene koje odgovaraju ćelijskoj smrti po tipu apoptoze. Utvrđeni mehanizam dejstva EE na ćelije melanoma miša je depolarizacija mitohondrijalne membrane praćena produkcijom slobodnih kiseoničnih radikala. EE je indukovao aktivaciju kaspaza, eksternalizaciju fosfatidil serina ćelijske membrane i fragmentaciju DNK, što su događaji specifični za apoptozu. Nekroza, iako prisutna, nije primarni mehanizam kojim EE ostvaruje svoje citotoksično dejstvo. Broj kiselih vezikula i nivoi proteina ključnih za autofagiju ukazuju da ni ovaj proces nije od značaja za efekte koje EE indukuje. *In vivo*, EE ne pokazuje toksične efekte na normalnu funkciju kostne srži, jetre i bubrega miševa. EE smanjuje veličinu i zapreminu supkutanog melanoma tretiranih miševa, takođe pokretanjem apoptoze. EE menja ekspresiju gena *Bcl-2* familije u tumorskom tkivu i pomera ravnotežu na stranu proapoptotskih članova, uz dokazanu aktivaciju kaspaza i odsustvo autofagije. EE nije smanjio broj metastatskih nodusa melanoma u plućima tretiranih miševa.

Zaključak ovog istraživanja je da EE poseduje značajan antimelanomski potencijal pri čemu je rasvetljen molekularni mehanizam njegovog dejstva u *in vitro* i u *in vivo* uslovima. Pokretanje ćelijske smrti po tipu apoptoze uz odsustvo sistemskih toksičnih efekata su rezultati koji, i pored izostanka efekta u metastatskom modelu bolesti, otvaraju prostor za dalja ispitivanja EE koja bi mogla doprineti aktuelnim naporima u razvoju novog antimelanomskog agensa koji bi imao bolje karakteristike od onih koji su trenutno u upotrebi.

Ključne reči: antitumorski, apoptoza, etilendiamin dipropanska kiselina,
melanom, mišji model, ćelijska smrt

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: molekularna medicina

**EFFECTS OF ETHYL ESTER CYCLOHEXYL ANALOG OF ETHYLENE DIAMINE
DIPROPANOIC ACID AGAINST MOUSE MELANOMA CELLS *IN VITRO* AND *IN VIVO***

Melanoma is a highly aggressive skin malignant tumor. The incidence of melanoma is increasing for the last 30 years, mortality is high, and despite all the improvements in chemo-/immuno- and radiotherapy the response of patients with advanced disease is as low as 15-25 %. Great efforts are put into the discovering, synthesis, characterization and investigation of molecular mechanisms of action of these compounds - potential antitumor agents. Promising new potential cytotoxic agents are derivatives of ethylene diamine dipropanoic acid, specifically ethyl ester cyclohexyl analog of ethylene diamine dipropanoic acid (EE). Its antimelanoma effect was not previously investigated and thus the aim of this research was to assess cytotoxic potential and molecular mechanism of EE's action using cell and animal melanoma models.

Mouse melanoma (B16), mouse macrophages (RAW264.7), human melanoma (518A2), human pulmonary fibroblast (MRC-5) and human keratinocyte (HaCaT) cell lines were used in the experiments. Cell viability was assessed using acid phosphatase, sulphorhodamin B, MTT and trypan blue assays, whereas lactate dehydrogenase release assay was used for measuring cell membrane integrity. Molecular mechanism of action was investigated by measuring the production of reactive oxygen species, mitochondrial membrane depolarization, caspase activation, phosphatidyl serine externalization, DNA fragmentation, and number of acidic vesicles, using appropriate fluorochromes followed by flow cytometry analysis. Levels of apoptosis- and autophagy- related proteins were measured using immunoblot. Cell morphology was investigated using fluorescent and transmission electron microscopy. C57Bl/6 mice were used for *in vivo* experiments. Primary and metastatic melanoma were established by injecting B16 cells subcutaneously and into the tail vein of the mice. The bone marrow, liver, and kidney function were assessed for systemic toxicity of EE. The effect of EE on growth of subcutaneous melanoma was observed, tumors isolated, and apoptosis- and autophagy- related gene and protein expression in the tumor tissue was assessed using reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction and immunoblot, respectively.

The number of secondary metastatic lung deposits was counted in metastatic melanoma model.

EE was cytotoxic against mouse and human melanoma cell lines and showed certain level of selectivity regarding tumor/non-tumor cells, both of mouse and human origin. Observed changes in cell morphology induced by EE were typical for apoptosis. EE's mechanism of action in mouse melanoma cells comprised of mitochondrial membrane depolarisation followed by reactive oxygen species production. EE induced caspases activation, externalization of phosphatidyl serine and DNA fragmentation, all hallmarks of apoptosis. Necrosis was present, but not the primary mechanism of EE's cytotoxic action. The number of acidic vesicles and the levels of autophagy-related proteins suggested that autophagy was not involved in EE-induced effects. *In vivo*, EE was not toxic to the bone marrow, kidneys and liver of the mice. EE decreased size and volume of subcutaneous melanomas by inducing apoptosis. The expression of the members of *Bcl-2* gene family was changed with the shift of proapoptotic/antiapoptotic balance towards the proapoptotic side. The activation of caspase 3 and lack of autophagy activation were also confirmed in melanoma tissue. EE failed to reduce number of metastatic deposits in the lungs of mice.

The conclusion of this research is that EE does possess significant antimelanoma potential. Molecular mechanism of its action is now elucidated both *in vitro* and *in vivo*. Even though EE was not effective in metastatic melanoma model, activation of apoptosis and the lack of systemic toxic effects are the reasons why it should be further investigated as a contribution to the ongoing efforts in developing new antimelanoma agent with better properties than those currently available.

Key words: apoptosis, antitumor, cell death, ethylene diamine dipropanoic acid, melanoma, mouse model

Scientific field: medicine

Scientific subfield: molecular medicine

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Melanom.....	2
1.1.1. Melanom - istorijat.....	2
1.1.2. Melanociti	3
1.1.3. Genetička osnova melanoma	5
1.1.4. Poremećaji u prenosu signala u ćelijama melanoma	9
1.1.5. Epidemiologija melanoma i faktori rizika za nastanak bolesti	11
1.1.6. Dijagnostika i prognoza malignog melanoma	12
1.1.7. Terapija malignog melanoma	14
1.2. Pretklinički modeli u ispitivanju novih lekova u terapiji malignih bolesti	16
1.2.1. Ćelijske linije kao modeli malignih bolesti	18
1.2.2. Animalni modeli malignih bolesti.....	21
1.2.3. Ćelijski i animalni modeli melanoma.....	24
1.3. Mehanizmi ćelijske smrti u patogenezi i terapiji malignih bolesti.....	25
1.3.1. Apoptoza.....	27
1.3.2. Autofagija	34
1.3.3. Nekroza/nekroptoza.....	38
1.3.4. Međusobna povezanost mehanizama ćelijske smrti.....	40
1.4. Nova antitumorska jedinjenja koja sadrže etilendiaminsku grupu.....	41
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	44
3. MATERIJAL I METODE	46
3.1. Hemikalije, reagensi i oprema	47
3.2. Etil ester cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline (EE).....	47
3.3. Ćelijske linije.....	48
3.3.1. Odmrzavanje, gajenje, pasažiranje i zamrzavanje ćelija	48
3.3.2. Brojanje ćelija	51

3.4. Testovi vijabiliteta.....	51
3.4.1. Test aktivnosti kisele fosfataze	52
3.4.2. MTT test.....	52
3.4.3. SRB test.....	53
3.5. Test ispitivanja integriteta ćelijskih membrana - LDH test	53
3.6. Ispitivanje tipa ćelijske smrti i oksidativnog stresa metodom protočne citofluorimetrije	54
3.6.1. Ispitivanje fragmentacije DNK.....	54
3.6.2. Ispitivanje eksternalizacije fosfatidil serina.....	55
3.6.3. Ispitivanje prisustva aktivnih kaspaza	57
3.6.4. Ispitivanje prisustva aktivne kaspaze 3, 8 i 9.....	57
3.6.5. Ispitivanje prisustva kiselih vezikula u citoplazmi ćelija.....	58
3.6.6. Ispitivanje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala	59
3.6.7. Ispitivanje depolarizacije mitohondrijalne membrane.....	59
3.7. Ispitivanje prisustva kiselih vezikula i fragmentacije jedra primenom fluorescentne mikroskopije	60
3.8. Ispitivanje migratorne sposobnosti ćelija - <i>scratch</i> esej	61
3.9. Ispitivanje morfologije ćelija transmisijom elektronskom mikroskopijom	61
3.10. Ispitivanje proteina ključnih za autofagiju i apoptozu u ćelijama metodom imunoblota	62
3.10.1. Izolacija ćelijskog sadržaja	62
3.10.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima	63
3.10.3. Priprema uzoraka za elektroforezu	63
3.10.4. Elektroforeza proteina	64
3.10.5. Transfer	65
3.10.6. Imunoblot i detekcija proteina.....	66
3.11. Model mišjeg melanoma, <i>in vivo</i>	67
3.11.1. Eksperimentalne životinje	67
3.11.2. Ispitivanje toksičnosti EE	67

3.11.3. Priprema B16 ćelija za indukovanje melanoma	68
3.11.4. Indukovanje primarnog melanoma	69
3.11.5. Ispitivanje ekspresije gena u tumorskom tkivu metodom kvantitativnog PCR sa reverznom transkripcijom (RT-qPCR)	69
3.11.5.1. Izolacija RNK iz tumorskog tkiva i merenje koncentracije RNK.....	70
3.11.5.2. Reverzna transkripcija.....	70
3.11.5.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-qPCR).....	71
3.11.6. Ispitivanje proteina ključnih za autofagiju i apoptozu u tumorskom tkivu metodom imunoblota.....	72
3.11.6.1. Izolacija tkivnog sadržaja	72
3.11.7. Indukovanje metastatskog melanoma.....	73
3.12. Statistička analiza	73
4. REZULTATI	74
4.1. EE deluje citotoksično na B16 ćelije melanoma miša.....	75
4.1.1. EE smanjuje vijabilitet B16 ćelija melanoma miša više nego RAW264.7 makrofaga miša.....	75
4.1.2. EE smanjuje vijabilitet ćelijske linije humanog melanoma više nego netumorskih humanih ćelijskih linija.....	76
4.2. EE izaziva apoptozu B16 ćelija koja je posredovana kaspazama	77
4.2.1. EE primarno ne uzrokuje nekrozu B16 ćelija.....	78
4.2.2. EE dovodi do morfoloških promena B16 ćelija koje odgovaraju apoptozu	79
4.2.3. EE dovodi do eksternalizacije fosfatidil serina, aktivacije kaspaza i fragmentacije jedarne DNK u B16 ćelijama	80
4.2.4. EE indukuje depolarizaciju mitohondrijalne membrane i produkciju slobodnih kiseoničnih radikala u B16 ćelijama.....	85
4.2.5. EE ne dovodi do aktivacije autofagije u B16 ćelijama	88
4.2.6. EE smanjuje sposobnost B16 ćelija da migriraju	90

4.3.	EE usporava rast melanoma <i>in vivo</i>	93
4.3.1.	EE ne pokazuje toksične efekte na kostnu srž i jetru i bubrege miševa	93
4.3.2.	EE smanjuje rast primarnog melanoma <i>in vivo</i>	95
4.3.3.	EE ne smanjuje broj metastaza u plućima miševa <i>in vivo</i>	101
5.	DISKUSIJA	103
6.	ZAKLJUČCI	116
7.	LITERATURA	118
	BIOGRAFIJA	134
	PRILOZI	136

Spisak shema:

Shema 1. Genske promene koje se sreću u familijarnim i sporadičnim formama melanoma kože.....	6
Shema 2. Signalni putevi koji su pojačano aktivirani u malignom melanomu	10
Shema 3. Koraci u pretkliničkoj evaluaciji novih jedinjenja kao potencijalnih lekova u terapiji malignih bolesti.	18
Shema 4. Najznačajniji događaji u spoljašnjem i unutrašnjem putu aktivacije apoptoze	29
Shema 5. Uloga proteina BCL-2 familije, proteina inhibitora apoptoze (IAP) i antagonista IAP-a u apoptozi	33
Shema 6. Hemijska struktura EE	47

Spisak grafika:

Grafik 1. Broj originalnih naučnih članaka koji prijavljuju nova jedinjenja sa antitumorskim dejstvom.....	42
---	----

Spisak tabela:

Tabela 1. Broj ćelija, radna zapremina medijuma i posude za gajenje ćelija korišćene u eksperimentima.....	50
Tabela 2. Analiza dvostrukog bojenja Annexin V-FITC/PI za utvrđivanje prisustva apoptoze/nekroze u ćelijama metodom protočne citometrije.....	56
Tabela 3. Kompletna krvna slika sa diferencijalnom formulom leukocita kontrolnih i miševa tretiranih EE-om.....	95
Tabela 4. Biohemijski pokazatelji funkcije bubrega i jetre kontrolnih i miševa koji su primali EE	96

Spisak slika:

Slika 1. EE pokazuje dozno-zavisan citotoksični efekat na B16 ćelijama melanoma miša.....	75
Slika 2. EE pokazuje dozno-zavisan citotoksični efekat na ćelijskoj liniji RAW264.7 makrofaga miša.76	
Slika 3. EE pokazuje dozno-zavisan citotoksični efekat na humanim ćelijskim linijama	77
Slika 4. EE dovodi do dozno-zavisnog povećanja procenta mrtvih B16 ćelija mišjeg melanoma..	78
Slika 5. EE dovodi do smanjenja broja i promena u morfologiji jedara B16 ćelija melanoma miša.....	79
Slika 6. EE dovodi do kondenzacije i fragmentacije jedra B16 ćelija melanoma miša.....	80
Slika 7. EE povećava procenat B16 ćelija sa eksternalizovanim fosfatidil serinom nakon 8 h tretmana.....	81
Slika 8. EE povećava procenat B16 ćelija sa eksternalizovanim fosfatidil serinom nakon 24 h tretmana.....	81
Slika 9. EE rano aktivira kaspaze u ćelijama melanoma miša.....	82
Slika 10. Aktivacija kaspaza koju EE indukuje u ćelijama melanoma miša se održava nakon 24 h tretmana.	83

Slika 11. EE dovodi do povećanja nivoa aktivirane kaspaze 3 u B16 ćelijama.....	84
Slika 12. EE dovodi do povećanja procenta B16 ćelija sa fragmentisanom jedarnom DNK.	85
Slika 13. EE dovodi do depolarizacije mitohondrija B16 ćelija već 30 minuta nakon tretmana.	86
Slika 14. EE indukuje porast slobodnih kiseoničnih radikala u ćelijama melanoma miša 2 h nakon tretmana.....	87
Slika 15. EE ne pokreće autofagiju u ćelijama melanoma miša.....	88
Slika 16. EE ne menja kiselost citoplazme B16 ćelija..	89
Slika 17. EE ne dovodi do povećanja broja kiselih vezikula u B16 ćelijama.....	89
Slika 18. EE ne dovodi do promena u nivoima beklina-1, LC3-II i p62 tipičnim za autofagiju u B16 ćelijama melanoma miša.....	90
Slika 19. EE smanjuje sposobnost B16 ćelija da migriraju.....	91
Slika 20. EE u potpunosti sprečava migraciju B16 ćelija melanoma miša.....	92
Slika 21. Supkutani model mišjeg melanoma - izgled životinja sa tumorskim promenama.....	95
Slika 22. EE nije doveo do promene u telesnoj masi miševa sa supkutanim melanomom.....	96
Slika 23. Supkutani model melanoma - makroskopski izgled izolovanih tumorskih promena.....	97
Slika 24. EE smanjuje masu i zapreminu primarnog supkutanog mišjeg melanoma.	97
Slika 25. EE dovodi do povećanja ekspresije proapoptotskih gena u modelu primarnog supkutanog melanoma miša.....	98
Slika 26. EE povećava nivo aktivirane kaspaze 3 u tumorskom tkivu.	99
Slika 27. EE ne menja značajno ekspresiju gena povezanih sa autofagijom u modelu primarnog supkutanog melanoma miša.	100
Slika 28. EE ne dovodi do promena u nivou proteina značajnih za proces autofagije u modelu primarnog supkutanog melanoma miša.....	100
Slika 29. EE nije doveo do promene u telesnoj masi miševa sa metastatskim melanomom.....	101
Slika 30. EE nije uticao na masu pluća miševa sa metastatskim melanomom.....	101
Slika 31. Metastatski model melanoma miša- makroskopski izgled metastatskih promena u plućima... ..	102
Slika 32. EE ne dovodi do promena u broju sekundarnih depozita u plućima miševa sa metastatskim melanomom.....	102

1. UVOD

1.1. Melanom

Melanom je maligni tumor porekla melanocitnih ćelija koji se najčešće javlja u koži, ali i u oku (uvea, konjuktiva i cilijarno telo), meningeama i različitim mukoznim površinama [1]. Kožni melanom je visoko agresivni tumor koji čini manje od 1 % svih karcinoma kože, ali je odgovoran za većinu smrtnih ishoda kod pacijenata sa ovom dijagnozom. Prema podacima Američkog udruženja za maligne bolesti (engl. *American Cancer Society*), incidenca melanoma se značajno povećala u poslednjih 30 godina. Pretpostavljeni broj novoobolelih u Sjedinjenim Američkim Državama za 2016. godinu je nešto više od 76 hiljada, a broj smrtnih ishoda se procenjuje na oko 10 hiljada [2].

Iako su saznanja o etiologiji, patogenezi, dijagnostici i terapiji melanoma značajno unapređena u poslednjoj deceniji, visoka stopa smrtnosti kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima u ovoj oblasti.

1.1.1. Melanom - istorijat

Prvi opisi ove bolesti datiraju još iz antičkog doba, opisane kao "fatalni crni tumor". Današnji naziv - melanom, skovao je dr Robert Karsvel 1838. godine, kao derivat grčkih reči: *melas*, što znači crno; i *-oma*, tipičan nastavak koji se odnosi na tumorsku promenu. Zapisi koji se odnose na ovaj "fatalni crni tumor" se mogu naći u spisima Hipokrata iz 5 veka pre nove ere. Prva resekcija melanoma se pripisuje Hanteru, 1787. godine. On je izveo operaciju "meke i crne" mase na vilici tridesetpetogodišnjeg muškarca i zabeležio promenu kao "kanceroznu fungiformnu izraslinu". Kasnije, 1804. godine, Rene Lanek je opisao ovaj patološki entitet i dao mu ime "melanoz". Heterogeni izgled tumora i njegova sklonost ka metastaziranju su prvi put opisani 1820. godine od strane dr Vilijema Norisa, koji je uočio i naslednu prirodu melanoma i opisao familijarni atipični multipli melanom. Takođe, zabeležio je i da najveći broj njegovih pacijenata ima svetao ten i svetle oči, kao i to da je korisnost hirurgije i terapije uopšte u slučaju postojanja udaljenih metastaza bez većeg uspeha. Koristi od ranog uklanjanja primarne promene i neizlečivu

prirodu uznapredovale bolesti je prvi prepoznao britanski hirurg Semjuel Kuper 1844. godine [3].

1.1.2. Melanociti

Melanociti su ćelije koje imaju sposobnost produkcije melanina i stoga su odgovorni za pigmentaciju i fotoprotekciju. Nalaze se u koži, oku, mukoznim epitelima i meningeama. Melanociti su neuroektodermalnog porekla i nastaju od progenitornih ćelija nervne kreste.

Naime, u 4. nedelji embrionalnog razvića formira se najpre neuralna ploča izgrađena iz neuroektoderma. Po formiranju neuralnog tubusa, jedna grupa ćelija sa ivica neuralne ploče se odvaja i menja fenotip iz epitelijalnog u mezenhimni. Ove ćelije zatim migriraju u različite delove embriona i nazivaju se ćelijama nervne kreste. One su inicijalno multipotentne, ali vremenom postaju opredeljene i diferencijacijom i specijalizacijom mogu dati različite ćelijske tipove - neurone, glija ćelije, ali i hondrocite, osteocite, miocite, endokrine ćelije. Smatra se da je prethodnik melanocita jedna bipotentna ćelija koja se dalje može diferencirati ili u ćelije glije, ili u direktne prethodnike melanocita, melanoblaste. Migracija melanoblasta u kožu se odvija u periodu kada je embrion star između 6 i 8 nedelja, zajedno sa rastom kutanih nerava [4]. Tokom kretanja kroz dermis, melanoblasti se umnožavaju, i sekvencijalno dolazi do ekspresije tzv. melanogenih gena od kojih je najvažniji onaj koji kodira za enzim tirozinazu, ključan za sintezu melanina. Melanoblasti se konačno zaustavljaju u koži i folikulu dlake, oralnoj mukozi, oku, irisu, kao i na nekim mestima u unutrašnjosti tela poput meningeja i unutrašnjeg uha (*stria vascularis*) [5].

Od značajnih faktora rasta koji utiču na melanoblaste, izdvaja se faktor stem ćelija (SCF, engl. *Stem cell factor*) koji svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za tirozin kinazni receptor na membrani melanoblasta, receptor za faktor rasta mastocita i stem ćelija KIT (c-KIT). Ovaj receptor se smatra površnim markerom melanoblastnih ćelija. SCF sekretuju dermalne ćelije, a posledica aktivacije njegovih receptora na melanoblastima je izbegavanje apoptoze i proliferacija [6]. Pored ovog signalnog puta, normalno sazrevanje i sudbina melanoblasta zavise i od *Wnt/β-catenin*, kao i od

aktivacije *Notch* signalnog puta. Ulogu u diferencijaciji melanoblasta takođe ima signalni put mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*), a posebno je značajno da se ovaj signalni put povezuje sa nastankom maligne alteracije melanocita, tj. sa nastankom melanoma.

Zreli melanociti su dugoživeće ćelije koje se nalaze u bazalnom sloju epidermisa kao relativno male, ovalne ćelije sa dendritičnim produžecima kojima su u kontaktu sa 30 - 40 okolnih keratinocita, a što čini epidermalnu melaninsku jedinicu. Odnos broja melanocita i keratinocita je 1:10 u bazalnom sloju epidermisa. Kontakt između dendritičnih nastavaka diferentovanih melanocita i keratinocita je neophodan za transfer melanina u keratinocite, što određuje boju kože i uključeno je u fotoprotekciju ćelija kože. Zreli melanociti se odlikuju prisustvom posebnih membranskih organela u kojima se sintetise melanin, melanozoma. Sinteza melanina nastaje kao posledica delovanja α -melanocitnog stimulišućeg hormona (α -MSH) na melanokortin 1 receptor (MC1R) na melanocitima. MC1R su receptori povezani sa G-proteinom. Po stimulaciji ovih receptora u ćelijama raste koncentracija cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), aktivira se transkripcioni faktor CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*) što dovodi do transkripcije transkripcionog faktora povezanog sa mikrooftalmijom (MITF, engl. *microphthalmia-associated transcription factor*). MITF dalje reguliše ekspresiju brojnih gena važnih za ćelijsku diferencijaciju i proliferaciju, gena čiji proizvodi učestvuju u sintezi melanina: tirozinaza (TYR, engl. *tyrosinase*), protein 1 povezan sa tirozinazom (TYRP1, engl. *tyrosinase-related protein 1*), dopahrom tautomeraza (DCT, engl. *dopachrome tautomerase*), premelanozomni protein (PMEL), melaninski protein koji prepoznaju T ćelije 1 (MART-1, engl. *melanoma antigen recognised by T-cells 1*); kao i nekih ubikvitarno eksprimiranih gena koji su značajni za preživljavanje melanocita (npr. BCL-2) i proliferaciju (npr. CDK2) [7].

Proces melanogeneze podrazumeva nastajanje dve osnovne forme melanina - braon-crnog eumelanina i crvenog feomelanina. Melanin ima brojne osobine koje su od koristi organizmu - sposobnost apsorbovanja i rasipanja ultraljubičastog (UV, engl. *ultraviolet*) zračenja, neutralizacija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*), povezivanje reakcija oksido-redukcije, skladištenje jona [8]. Melanin nastaje serijom enzimski katalisanih i spontanih reakcija koje se nazivaju

Raper-Mason put [9]. Supstrat za sintezu melanina je amino kiselina L-tirozin koja se pod dejstvom TYR hidroksiliše, nastaje L-3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) koji se odmah oksiduje u DOPAhinon. U prisustvu cisteina, od DOPAhinona nastaje cisteinilDOPA čijom oksidacijom i polimerizacijom preko serije intermedijera nastaje žućkasto crveni, rastvorljivi feomelanin. U odsustvu tiola (cisteina, glutationa ili tioredoksina), stvara se braon crni eumelanin. DOPAhinon spontano ciklizuje u DOPAhrom. DOPAhrom zatim spontano gubi karboksilnu kiselinu i nastaje 5,6-dihidroksiindol (DHI). Brzom oksidacijom i polimerizacijom se stvara tamno braon-crni, nerastvorljivi DHI-melanin. Sa druge strane, ukoliko je prisutan enzim DOPAhrom tautomeraza, od DOPAhroma će nastati DHI-2-karboksilna kiselina (DHICA). Pod dejstvom TYR i TYRP1 i daljim konverzijama, nastaje nešto svetliji braon DHICA-melanin [10]. Ljudska koža sadrži kombinaciju svih tipova melanina, a njihov odnos delom određuje vidljivu pigmentaciju. Različitosť boje kože među različitim etničkim grupama zavisi prvenstveno od sadržaja eumelanina. Smatra se da eumelanin u poređenju sa feomelaninom ima bolje fotoprotektivne osobine - veću otpornost na degradaciju i sposobnost da neutralizuje ROS [11].

1.1.3. Genetička osnova melanoma

Najveći broj dijagnostikovanih melanoma pripadaju tzv. sporadičnoj formi bolesti, dok se svega 10 % svrstava u familijarnu formu [12]. Smatra se da je aktivacija protoonkogeni u kombinaciji sa supresijom tumor-supresornih gena uz defekte u mehanizmima popravke DNK u melanocitima posledica dejstva sredinskih faktora. Nemogućnost imunskog sistema da na odgovarajući način odreaguje na ove promene dovodi do nastanka melanoma. Veza između UV zračenja i povećanog rizika za nastanak melanoma je opisana pre više od 50 godina, ali je još tada isticana i važnost karakteristika same kože kao faktor rizika za razvoj melanoma [13]. Ovo je dovelo do velikih otkrića na polju genetike melanoma (Shema 1).

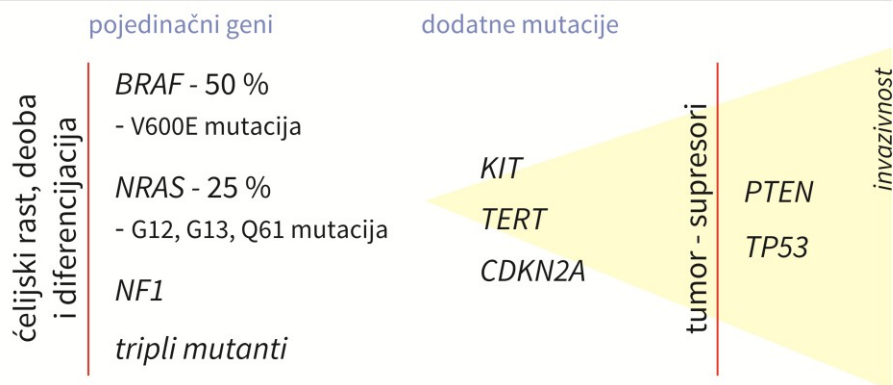
GENSKE PROMENE FAMILIJARNE FORME MELANOMA

pojedinačni geni

ćelijski ciklus	<i>CDKN2A</i> - 40 %	melanociti	<i>MITF</i>	razviće/ metabolizam	<i>SOX9</i>
	<i>CDK4</i>		<i>MC1R</i>		<i>SOX10</i>
	<i>BAP1</i>				<i>PAX3</i>
	<i>POT1</i>				<i>PLA2G6</i>

mutacije
SNP polimorfizmi

GENSKE PROMENE SPORADIČNE FORME MELANOMA



Shema 1. Genske promene koje se sreću u familijarnim i sporadičnim formama melanoma kože

Kada su u pitanju familijarne forme melanoma, česti su visokorizični aleli sa visokom penetracijom koji se nasleđuju autozomno-dominantno. Oko 40 % ovih slučajeva melanoma ima naslednu mutaciju u genu za ciklin zavisnu kinazu (CDK), *CDKN2A*. Ovaj gen kodira dva tumor-supresorna proteina koji nastaju alternativnim splajsovanjem - P16Ink4a i P14Arf. U slučaju mutacije *CDKN2A* inhibirana je funkcija tumor-supresornih proteina, retinoblastom 1 (RB1) i P53, što stimuliše ulazak ćelije u ćelijski ciklus i njenu deobu [14]. Nešto ređe se sreću mutacije gena *CDK4*, čija je uloga takođe u progresiji ćelijskog ciklusa iz G₁ u S fazu. Mutacije *BAP1* gena koji pripada familiji gena deubikvitinišućih enzima i ponaša se kao tumor-supresor i *POT1* gena koji ima ulogu u održavanju telomera, javljaju se češće u porodicama u kojima se pored melanoma javljaju i tumori bubrega, mezoteliom i gliom [15]. Kao faktor rizika za familijarnu formu bolesti potvrđene su i mutacije u genima koji imaju ulogu u nastanku i sazrevanju melanocita - *MITF*, *MC1R*. Supstitucija u genu

MITF po tipu *missense* mutacije dovodi do petostrukog povećanja rizika za nastanak ne samo melanoma već i karcinoma bubrežnih ćelija. Ova mutacija povećava vezivanje *MITF* proteina za promotor gena za *HIF1A*, i dovodi do povećane klonogenosti, migracije i invazivnosti melanocita [16]. Analize celog genoma u studijama slučajeva i kontrola su ukazale na to da brojni niskopenetrantni polimorfizmi pojedinačnih nukleotida takođe mogu biti faktori rizika. U literaturi se spominje gen za fosfolipazu, *PLA2G6*, koji se dodatno povezuje i sa nastankom Parkinsonove bolesti [17]. Takođe, od značaja je nekoliko gena koji imaju ključnu ulogu u razviću: *PAX3*, gen uključen u razvoj kosti i hrskavice, zatim *SOX9* i *SOX10*, geni značajni za nastanak melanocita [18].

U sporadičnim slučajevima melanoma, pored već navedenih mutacija koje se sreću u familijarnoj formi bolesti, opisana je i uloga gena čiji su proizvodi komponente *N-RAS* signalnog puta, kao i *MAPK* / kinaza regulisana vanćelijskim signalima (*ERK*, engl. *extracellular signal-regulated kinase*) i fosfatidil-inozitol 3 kinaza (*PI3K*) / *AKT* signalnih puteva [19–21]. Posebno je značajno otkriće mutacija u okviru *B-RAF* gena, i to tzv. *V600E* mutirana varijanta, utvrđena 2002. godine sistematičnom genotipizacijom uzoraka pacijenata koja dovodi do konstitutivne aktivacije *MAPK* signalnog puta [22]. Tačkaste mutacije u *V600* kodonu *BRAF* gena se nalaze u ~50 % svih melanoma, dok su mutacije u *G12*, *G13* i *Q61* kodonima *NRAS* gena prisutne u ~25 % [23]. Od mutacija drugih gena koji se povezuju sa melanomom izdvaja se gen *NF1* koji dovodi do naslednog multisistemskog genskog oboljenja neurofibromatoze tip 1. Produkt ovog gena je *RAS-GTP*-paza-aktivirajući protein koji negativno reguliše *RAS* signalnu kaskadu. Pokazano je da skoro 40-50 % melanoma koje nemaju *BRAF* ili *NRAS* mutaciju poseduju *NF1* mutaciju koja dovodi do gubitka funkcije [24]. Stoga se melanom kože može kategorisati u 4 genetičke grupe u odnosu na mutaciju u nekom od gena *MAP* kinaznog signalnog puta: *BRAF*, *RAS*, *NF1* i takozvani tripli mutant. Brojne molekularne i kliničke karakteristike bolesti su povezane sa ovim genetičkim podtipovima. Na primer, svega oko 30 % triplih mutanata imaju tzv. UV potpis (tipične promene u dezoksiribonukleinskoj kiselini - *DNK*, koje su posledica dejstva UV zračenja), u odnosu na preko 90 % onih koji pripadaju nekom od ostala tri podtipa. Takođe, kod triplih mutanata se češće nalaze dodatne mutacije u *KIT* genu. Zahvaljujući tome, može se smatrati da ove razlike u

genomu tj. u mutacijama gena MAPK puta, mogu biti od pomoći u donošenju odluka vezanih za terapiju melanoma a u cilju personalizacije lečenja i očekivano boljih ishoda bolesti [25].

Melanom kože ima jednu od najvećih stopa mutacija u odnosu na bilo koji drugi maligni tumor koji je do danas sekvenciran. Prema poslednjim procenama broj mutacija iznosi ~ 17 na milion baza u sastavu DNK [26]. Takođe, više od 75 % melanoma kože poseduje tzv. UV potpis, koji se definiše kao tranzicija citozina u timin (C→T) na dipirimidinskim mestima u više od 60 % ovih mesta, ili CC→TT mutacija u više od 5 % mesta ukupnog broja mutacija. Nastanak UV potpisa je posledica delovanja UVB zraka na DNK pri čemu nastaju ciklobutanski pirimidinski dimeri. Mehanizam kojim se mutacija objašnjava je deaminacija citozina ili 5-metilcitozina u sastavu ciklobutanskih pirimidinskih dimera u uracil ili timidin. Nakon naredne replikacije dolazi do C→T tranzicije na dipirimidinskim mestima [27].

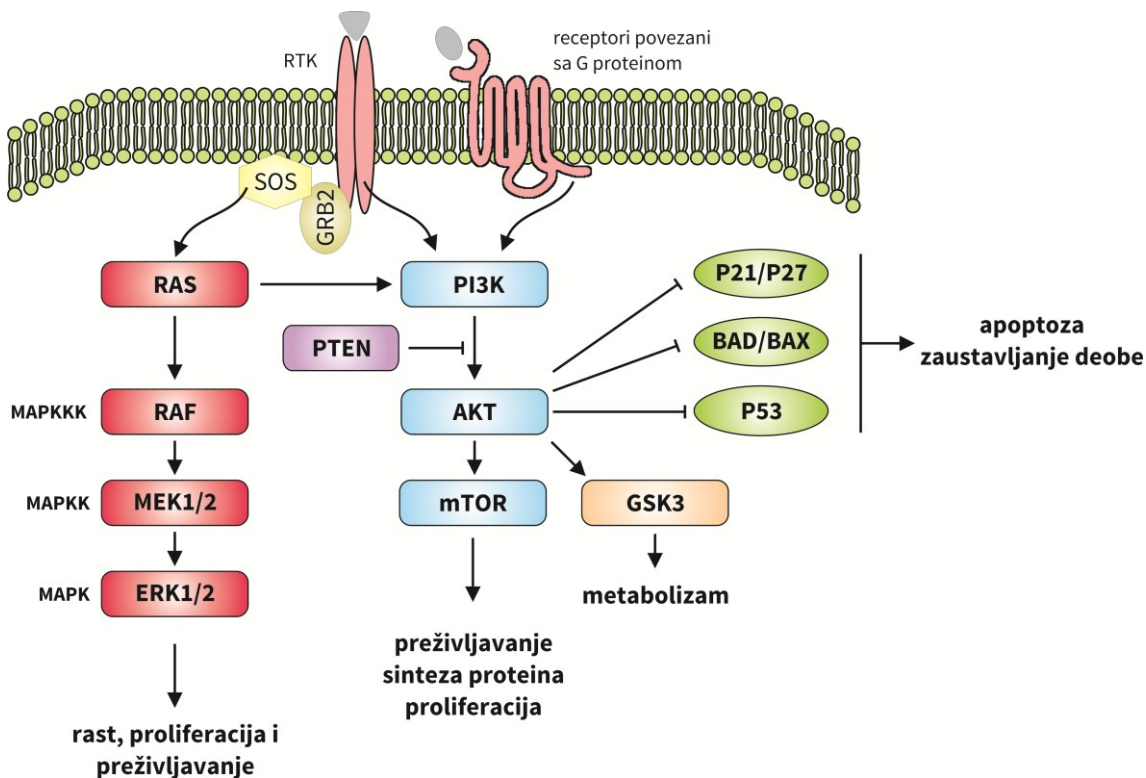
U različitim histološkim podtipovima melanoma utvrđene su mutacije u različitim genima, što ukazuje na izrazitu genetičku heterogenost melanoma i verovatno ima značajan uticaj na uspeh kako molekularne, tako i imunološke terapije melanoma. Značajno za patogenezu melanoma je i vreme nastanka ovih genskih promena. Sveobuhvatnim istraživanjem koje je uključilo sekvenciranje 290 gena povezanih sa malignim bolestima u uzorcima tkiva melanoma i prekursornih lezija, utvrđeno je da benigne lezije poseduju isključivo *BRAF* mutacije, dok su intermedijerne lezije nosile *BRAF* i *NRAS* mutacije, kao i neke dodatne mutacije u genu reverzne transkriptaze telomeraze (*TERT*). Mutacije u genima vezanim za produžavanje telomera se takođe često sreću i u intraepidermalnim promenama (melanoma *in situ*), dok su u invazivnim i uznapredovalim tumorima otkrivene bilalelska inaktivacija gena *CDKN2A*, zatim mutacija u genima koji učestvuju u remodelovanju hromatina, kao i mutacije gena fosfataza i tenzin homolog (*PTEN*) i *TP53* gena [28].

Sekvenciranje egzoma primarnih i metastatskih uzoraka istih pacijenata je ukazalo na neke bitne procese koji su uključeni u metastaziranje tumora. Naime, pokazano je da primarni tumor istovremeno metastazira na različite anatomske lokacije, i to kao potomak iste roditeljske populacije [29]. Sa druge strane, pojedinačni sekundarni depoziti mogu sadržati više od jedne populacije ćelija

primarnog tumora. Ovim se može objasniti različit odgovor pojedinih metastaza na terapiju. Takođe, genetička heterogenost tumora je potvrđena i sekvenciranjem ribonukleinskih kiselina (RNK), jer je pokazano da različite maligne ćelije u tumoru mogu biti u potpuno različitim transkripcionim stanjima što takođe uslovljava senzitivnost ili rezistenciju na terapiju [30].

1.1.4. Poremećaji u prenosu signala u ćelijama melanoma

Kada su u pitanju poremećaji na nivou ekspresije proteina i normalnog unutarćelijskog prenosa signala, najčešće (u skoro dve trećine melanoma) se može detektovati hiperaktivacija signalnog puta koji uključuje signalnu kaskadu MAP kinaza. Ovaj signalni put (Shema 2) sadrži tri kinaze koje se sekvencijalno aktiviraju fosforilacijom i deo su vitalnih procesa unutraćelijskog prenosa signala koji reguliše ćelijsku diferencijaciju, ćelijsku proliferaciju i ćelijsku smrt. Aktivacija MAPK signalnog puta se odvija posredstvom receptorskih tirozin kinaza (RTK), kao što su receptor za epidermalni faktor rasta, faktor rasta fibroblasta, faktor rasta hepatocita ili SCF, koji se aktiviraju od strane odgovarajućih vanćelijskih liganada. Vezivanje liganda za receptor dovodi do aktivacije tirozin kinaznog, citoplazmatskog, domena receptora, što uzrokuje fosforilaciju tirozinskih rezidua samog receptora i dalje do regrutacije adapternih proteina: protein 2 vezan za receptor za faktor rasta (GRB2, engl. *growth factor receptor-bound protein 2*) i SOS. Po formiranju kompleksa tirozin kinazni receptor-GRB2-SOS, aktivira se SOS protein što dalje uzrokuje aktivaciju RAS proteina (na primer H-RAS, N-RAS, K-RAS) koji vezuje guanozin trifosfat (GTP). Aktivirani RAS dalje aktivira RAF protein koji je serin-treonin kinaza i predstavlja prvi član u kaskadi MAP kinaza, tzv. kinaza kinaze MAPK, odnosno MAPKKK. U melanocitima je dominantno prisutan tzv. B-RAF. RAF će fosforilisati i time aktivirati nishodne tirozin/treonin kinaze MEK1/2 (kinaze MAP kinaza, MAPKK), a daljim prenosom signala MEK1/2 će fosforilisati i aktivirati MAP kinaze ERK1/2 koje će zatim imati ključnu ulogu u rastu, proliferaciji i preživaljavanju ćelije [31,32].



Shema 2. Signalni putevi koji su pojačano aktivirani u malignom melanomu

Drugi značajan unutarćelijski signalni put koji se spominje u literaturi kao konstitutivno aktivan u melanomu, ali i u brojnim drugim malignim tumorima, je signalni put PI3K/AKT. Ovaj put se može pokrenuti aktivacijom RTK, receptora povezanih sa G proteinom, kao i aktivacijom RAS proteina (Shema 2). Aktivacija PI3K dovodi do fosforilacije inozitola u lipidima ćelijske membrane pri čemu od fosfatidilinozitol 4,5-difosfata nastaje fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3). Posledično, proteini koji sadrže domen pod nazivom plekstrin homologija se regrutuju i prilaze membrani. Jedan od ovih proteina je i AKT koji po regrutaciji biva dvostruko fosforilisan čime postaje aktivan. AKT je serin-treonin kinaza koja se javlja u tri homologe izoforme (AKT1, AKT2, AKT3). Supstrati AKT kinaze su brojni i regulišu veći broj značajnih unutarćelijskih procesa. Među njima treba spomenuti kinazu 3 glikogen sintaze (GSK3), enzim važan za metabolizam glikogena. AKT povećava preživljavanje time što fosforilacijom inhibira proteine uključene u proces apoptoze, kao što su proapoptotski članovi BCL-2 familije proteina BAD i BAX, zatim inhibira regulatore ćelijskog ciklusa P21 i P27 i indirektno inhibira proapoptotsku

ulogu P53 proteina. Važan nishodni efektor PI3K/AKT signalnog puta je i protein mehanistička meta rapamicina (mTOR kinaza, engl. *mechanistic target of rapamycin kinase*), regulator kako ćelijskog metabolizma i rasta, tako i preživaljavanja ćelija. Aktivnost PI3K/AKT signalnog puta je negativno regulisana lipidnom fosfatazom PTEN koja defosforiliše PIP3 čime se inhibira aktivacija AKT-a i samim tim cele nishodne kaskade [33,34].

1.1.5. Epidemiologija melanoma i faktori rizika za nastanak bolesti

Melanom je bolest čija je incidencija u stalnom porastu u protekle tri decenije, a u prethodnih deset godina je zabeležno povećanje novodijagnostikovanih slučajeva od 2,6 % godišnje. U Kvinslendu, Australija, se beleži najveći broj slučajeva godišnje, 56 na 100 000 osoba za muškarce i 41 na 100 000 za žene. U Sjedinjenim Američkim državama ovi brojevi se kreću između 15 i 20 novoobolelih godišnje na isti broj ljudi. Broj novoobolelih u Evropi se takođe povećava zadnjih godina, a najveća incidenca se beleži u Švajcarskoj, Norveškoj, Švedskoj, Danskoj, i kreće se između 10 i 20 slučajeva na 100 000 stanovnika [35]. Neki autori navode da se veliko povećanje broja obolelih u poslednjim decenijama delom može objasniti pojačanim skriningom, povećanjem broja slučajeva koji se prijavljuju, promenama u histološkim kriterijumima za postavljanje dijagnoze i povećanim brojem izvedenih biopsija kože [36].

Osobe bele boje kože imaju desetostruko veći rizik za nastanak melanoma u odnosu na druge rase, dok je kutani melanom kod osoba crne boje kože izrazito redak. Rizik za nastanak bolesti raste sa godinama, pri čemu je medijana godina starosti u vreme postavljanja dijagnoze malignog melanoma 57, ali se bolest sreće i kod mlađih od 30 godina - naročito mladih žena. Melanom u dečijem uzrastu se dijagnostikuje ekstremno retko. U pogledu razlike između polova, do 45 godine života incidencija je veća kod žena, ali kod osoba starosne dobi od 75 godina melanom se dijagnostikuje tri puta češće kod muškaraca, te oni stoga imaju ukupno veći rizik da razviju bolest u toku života [37].

Od fenotipskih faktora rizika, broj i tip nevusa imaju najveću prediktivnu vrednost, kao i svetla koža i oči (posebno riđa kosa i prisustvo pega) [38,39]. Većina

melanoma nastaje kao nova lezija kože, međutim u oko 25 % slučajeva bolest se može razviti iz već postojećeg melanocitnog nevusa [40]. Ukupan broj nevusa na koži pozitivno korelira sa rizikom za nastanak melanoma, a pokazano je i da osobe sa više od 100 nevusa imaju do 7 puta povećan relativni rizik za obolevanje od bolesti. Prisustvo velikih (>5 mm) i gigantskih kongenitalnih (>20 cm) nevusa na koži takođe predstavljaju faktore rizika [12].

Najznačajniji sredinski faktor rizika za nastanak melanoma predstavlja UV zračenje. Još pedesetih godina prošlog veka lekari su uočili vezu između izlaganja suncu i melanoma, a potvrda je došla pre četiri decenije kada je u deskriptivnoj epidemiološkoj studiji preseka utvrđeno da visoka incidencija melanoma može biti povezana sa kratkotrajnom ekspozicijom visokointenzitetnom UV zračenju. Ovaj nalaz je postao osnova tzv. hipoteze intermitentne ekspozicije koja objašnjava nastanak melanoma [41]. Istih godina je pokazano i da se melanom češće javlja na otkrivenim delovima tela, da rizik raste sa smanjenjem geografske širine i sa povećanjem dužine života u oblastima sa klimom koja podrazumeva veliki broj sunčanih sati godišnje [42]. Usledile su studije koje su ukazale da je intermitentna ekspozicija suncu mnogo veći faktor rizika u odnosu na kontinuiranu izloženost koja se povezuje sa drugim tipovima karcinoma kože. Ukazano je i na to da postoje aditivne interakcije između broja nevusa, povremenog izlaganja suncu i rizika od melanoma [43]. Takođe, intenzivna intermitentna ekspozicija UV zracima i opekotine od sunca u dečijem uzrastu pokazuju najveći rizik za kasniji nastanak melanoma [44]. Kauzalna veza između UV zračenja i melanoma se danas objašnjava uticajem UV zračenja na genetički materijal (ranije navedene mutacije po tipu UV potpisa), indukcijom oksidativnog stresa, promenama u imunskim funkcijama kože i produkcijom faktora rasta [45].

1.1.6. Dijagnostika i prognoza malignog melanoma

Rana dijagnoza melanoma se nameće kao važan faktor jer je prognoza bolesti u direktnoj vezi sa stadijumom u kom je bolest dijagnostikovana. Takozvani ABCDE kriterijumi su uvedeni u praksu 1985. godine [46]. Akronim se odnosi na karakteristike kožne promene koje pobuđuju sumnju na melanom: A - asimetrija, B -

nejasne ivice (engl. *border*), C - varijacije boje (engl. *colour*), D - dijametar > 6 mm, E - evolucija promena. Dermoskopija se takođe koristi u dijagnostici i podrazumeva korišćenje optičkih uređaja kojima se procenjuju karakteristike promena na koži sa većom preciznošću poput postojanja atipične pigmentne mreže, prisustva iregularnih globula, iregularne pigmentacije, regresionih struktura i slično [47]. U skorije vreme se koristi i konfokalna mikroskopija koja još uvek nije u široj upotrebi. Zlatni standard u dijagnostici predstavlja histopatološka potvrda melanoma, a po preporuci Američke akademije za dermatologiju potrebno je uraditi ekscizionu biopsiju sa uklanjanjem cele promene [48]. Boje koje se tradicionalno koriste za identifikaciju ćelija melanoma su S100B, MART1, HMB-45 i tirozinaza. U skorije vreme koriste se i imunohistohemijska bojenja na SOX10 i MITF. Podela melanoma u odnosu na anatomsku lokalizaciju kategoriše melanom na kutani, mukozni, uvelani i akralni. Kožni (kutani) melanom se u zavisnosti od načina širenja i rasta može podeliti na površinsko šireći tip koji je najčešći, nodularni, akralni lentiginozni i lentigo maligna melanom [3].

Utvrđivanje stadijuma bolesti je zasnovano na TNM klasifikaciji Američkog udruženog komiteta za maligne bolesti koja u obzir uzima specifičnosti melanoma. U zavisnosti od prisustva/veličine primarne lezije (T), prisustva/odsustva makro ili mikro depozita u drenirajućim limfnim čvorovima (N) i prisustva/odsustva udaljenih metastaza (M) uz informacije o Klarkovom nivou (anatomski nivo invazije kože), Breslovljevom skor (debljina tumora u mm), prisustvu ulceracija i mikrosatelitskih promena na koži, aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu kao i mitotskom indeksu i statusu granica resekcije, bolest se kategoriše u stadijume od I-IV na osnovu kojih se utvđuje način lečenja i od kojih zavisi prognoza bolesti [48]. Utvrđivanje prisustva genskih mutacija je od značaja u višim stadijumima bolesti.

Pacijenti koji imaju lokalizovanu bolest (bez prisustva depozita u limfnim čvorovima), tj. koji su kategorisani u stadijume I i II, imaju relativno dobru višegodišnju prognozu, uz stopu preživljavanja od preko 90 % za stadijum IA odnosno oko 40 % za stadijum IIC kada je reč o desetogodišnjem preživljavanju. U slučaju obolelih kod kojih je došlo do regionalnog širenja bolesti (stadijum III), petogodišnje stope preživljavanja iznose između 40 % i 80 %. Pacijenti kod kojih

postoje udaljene metastaze (stadijum IV) imaju vrlo lošu prognozu, sa stopom jednogodišnjeg preživljavanja od svega 30-60 % [49].

1.1.7. Terapija malignog melanoma

U slučaju postojanja lokalizovane bolesti (stadijum I) melanom se leči kompletnom hirurškom ekscizijom. Medikamentna, farmakološka, sistemska terapija se primenjuje kao adjuvantna (nakon hirurgije, a u cilju dejstva na eventualno postojeće mikrometastaze) ili neoadjuvantna (pre glavnog vida lečenja - hirurgije) kod pacijenata u nižim stadijumima bolesti koji imaju visok rizik od relapsa i onih sa regionalnim širenjem bolesti (stadijumi II i III), odnosno kao jedini vid u slučaju uznapredovale, sistemske, metastatske bolesti (stadijum IV).

Hemioterapija podrazumeva davanje lekova koji imaju citotoksični efekat na ćelije tumora. U lečenju se danas koristi dakarbazin, netipični alkilirajući agens koji zaustavlja ćelijsku deobu i dovodi do ćelijske smrti, i temozolomid, oralni analog dakarbazina. Od ostalih hemioterapeutika, platinski agensi (cisplatin, kaboplatin), alkaloidi vinke (vindezin, vinrolebin, vinflunin), derivati nitrozouree (fotemustin, lomustin), taksani (paklitaksel i docetaksel), u fazi III kliničkih studija nisu pokazali prednost u odnosu na dakarbazin, bilo kao monoterapija ili u okviru različitih protokola sa više lekova, i to kako u pogledu odgovora tumora na terapiju (RR, engl. *response rate*), tako i u pogledu preživljavanja bez progresije bolesti (PFS, engl. *progress free survival*) i ukupnog preživljavanja (OS, engl. *overall survival*) [3]. Pretpostavlja se da je razlog slabom terapijskom efektu ovih agenasa brzo razvijanje rezistencije. Takođe, klasični hemioterapeutici dovode do brojnih neželjenih efekata. Ipak, u toku su mnogobrojne kliničke studije u kojima se ispituje efikasnost hemioterapeutika u kombinaciji sa ostalim vidovima sistemske terapije u uznapredovalim stadijumima melanoma [50].

Imunološka terapija za cilj ima aktivaciju imunskog sistema i time prepoznavanje i uništavanje tumorskih ćelija u organizmu. Naime, smatra se da citotoksični agensi pokazuju kinetiku prvog reda, i zbog toga se ne može očekivati da deluju na svaku tumorski izmenjenu ćeliju, efekat koji bi imunski sistem u okviru tzv. imunskog nadzora, mogao da ostvari. Ova hipoteza, prema kojoj bi adaptivni

imunski sistem mogao da spreči razvoj i progresiju maligne bolesti, u skladu je sa opažanjem da postoji značajno viša incidencija melanoma kod imunosuprimiranih pacijenata. Otkriće prisustva imunskih infiltrata, i postojanja tumor-specifičnih antitela kao pozitivnih prognostičkih faktora je dodatno ukazalo na vezu između imuniteta i melanoma [8]. Prva odobrena imunološka terapija uznapredovale bolesti je interleukin-2 u visokoj dozi, citokin koji aktivira citotoksične T-limfocite. Trenutno je u toku veliki broj kliničkih studija koji ispituju efikasnost i toksičnost interferona α kao adjuvantnog ili neoadjuvantnog agensa u različitim dozama i protokolima [51]. Još jedan od pristupa u lečenju koji je pokazao umereni uspeh je tzv. adoptivni transfer ćelija, gde se T-limfociti koji infiltriraju tumor izdvoje, *ex vivo* propagiraju i aktiviraju, i zatim ponovo vrata u krvotok pacijenta [52]. Upotreba vakcina koje sadrže cele tumorske ćelije ili ćelijske lizate, peptidnih vakcina i vakcina sa gangliozidnim antigenima nije uspela da pokaže velike koristi u odnosu na standardnu terapiju [51]. Najuspešnijim, u smislu imunoterapije, se za sada pokazao pristup inhibicije imunskih kontrolnih tačaka (engl. *immune checkpoint*). Naime, za aktivaciju T-limfocita je neophodno prepoznavanje T-ćelijskog receptora i antigena u sastavu glavnog kompleksa tkivne podudarnosti na antigenprezentujućoj ćeliji, uz kostimulatornu interakciju između ove dve vrste ćelija. Ovaj korak kostimulacije koji se naziva imunskom kontrolnom tačkom može biti posredovan ili stimulatornim ili inhibitornim parom receptor-ligand [53]. Dve, za melanom, najznačajnije kontrolne tačke uključuju koinhibitorne T-ćelijske receptore: antigen 4 T-citotoksičnih limfocita (CTLA-4, engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) i programirana ćelijska smrt 1 (PD-1, engl. *programmed cell death-1*). Humanizovano blokirajuće antitelo protiv CTLA-4 pod nazivom ipilimumab se koristi u terapiji uznapredovalog melanoma od 2011. godine i dovodi do produženja OS [54]. Antitelo protiv PD-1, pembrolizumab, u upotrebi je od 2015. godine i takođe za sada pokazuje dobre rezultate u smislu boljeg RR i manjeg broja toksičnih efekata povezanih sa autoimunošću [55].

Ciljana terapija se značajno razvija poslednjih godina, i posledica je velikog napretka u otkrivanju genskih mutacija u osnovi melanoma, kao i utvrđivanja poremećaja u signalnim putevima MAPK i signalnog puta PI3K/AKT koji su konstitutivno aktivirani u velikom broju melanoma (videti odeljak 1.1.3 i 1.1.4). U

upotrebi su inhibitori BRAF proteina, vemurafenib od 2011. godine i dabrafenib od 2013. godine i to u slučaju potvrde postojanja BRAF mutacije [56,57]. Inhibitor MEK proteina, trametinib, od 2014. godine je u kliničkoj upotrebi na osnovu studija koje su pokazale pozitivne efekte u kombinaciji sa BRAF inhibitorima [58]. Inhibicija BRAF proteina može dovesti do paradoksalne hiperaktivacije C-RAF i time MAP kinaznog puta, čime se objašnjava uspeh kombinacije BRAF i MEK inhibitora uz manji broj neželjenih toksičnih efekata [59]. U III fazi kliničkih istraživanja ovi i noviji inhibitori pokazuju značajne efekte kako u pogledu PFS, tako i u pogledu OS u poređenju sa standardnim protokolima lečenja, te se očekuje registracija novih agenasa.

Terapija uznapređovalog i metastatskog melanoma je do pre desetak godina bila praktično nepostojeća, a trenutno je na raspolaganju više različitih terapijskih modaliteta. U toku su brojne studije koje porede efekat različitih protokola i kombinacija lekova iz grupe hemio-, imuno- i ciljane terapije. Prvi rezultati ovih studija ukazuju na to da, i pored sveg napretka, problem rezistencije na terapiju i dalje postoji i da još uvek nema agensa ili kombinacije agenasa koji bi značajno produžili život ovih pacijenata. Stoga je potrebno da dalja istraživanja obuhvate kako molekularne mehanizme nastanka melanoma, tako mehanizme sticanja i prevazilaženja rezistencije, ali i otkrivanje novih, potencijalno boljih agenasa.

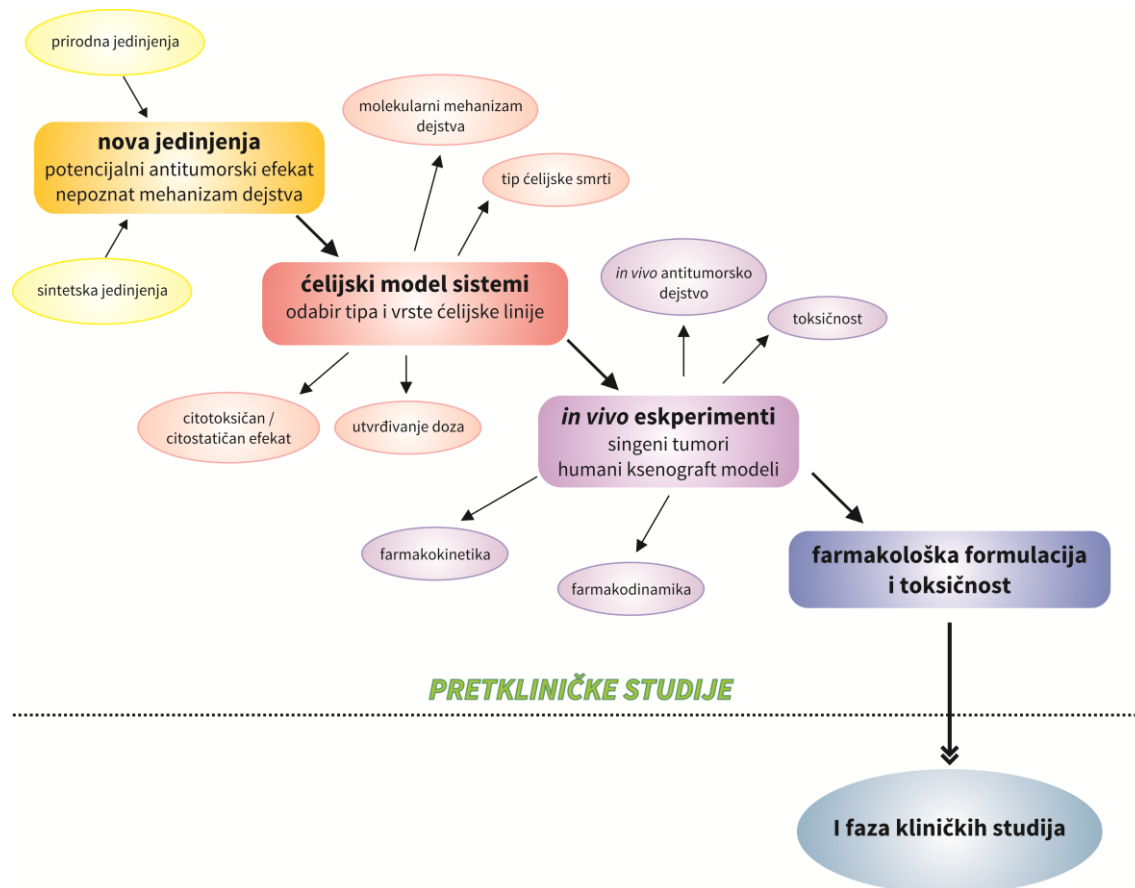
1.2. Pretklinički modeli u ispitivanju novih lekova u terapiji malignih bolesti

Ubrzani razvoj tehnologije u prethodnim decenijama i napredak u istraživanjima na polju molekularne biologije su omogućili bolji uvid u kompleksne promene koje se događaju u malignim bolestima i pružili značajna objašnjenja koja se tiču heterogenosti malignih tumora, heterogenosti pojedinih pacijenata i njihovog različitog odgovora na hemioterapiju. Detaljno i sveobuhvatno razumevanje mehanizama odgovora na lekove je od esencijalnog značaja u cilju molekularno zasnovane personalizovane antitumorske terapije. Sa druge strane, napredak u svim poljima istraživanja malignih bolesti, od optimizacije ćelijskih modela i eseja koji ispituju hemiosenzitivnost preko proteomike i genomike otkriva

sve veći broj determinanti individualne hemiosenzitivnosti tumora. Ovi modeli se stalno unapređuju i optimizuju kako bi bolje oponašali tumor od koga potiču kao i mikrosredinu u kojoj se tumor razvija.

Modeli malignih bolesti koji podrazumevaju *in vitro* ćelijske kulture i linije su najčešće korišćeni sistemi za ispitivanje ćelijskog odgovora na tretman lekom. Utvrđivanje karakteristika odgovora tumora na potencijalni lek i molekularnih mehanizama koje dati agens pokreće u *in vitro* okolnostima nastavlja se na životinjskim modelima bolesti. Kao eksperimentalne životinje najčešće se koriste glodari, zdravi ili genetički izmenjeni, a u upotrebi su modeli spontanog nastanka maligne bolesti i različite vrste graftova. Ovi *in vivo* modeli su neophodni kako bi se ispitala farmakološka aktivnost novog potencijalnog leka koji se distribuira ne samo u neoplastično, već i u normalna tkiva, metaboliše i eliminiše iz organizma. Dakle, cilj rada na eksperimentalnim životinjama jeste utvrđivanje dejstva leka na organizam kao celinu, a ne samo na tumorske ćelije, sa uzimanjem u obzir svih specifičnosti uloga imunskog sistema, ispitivanje farmakokinetike i farmakodinamike, kao i ispitivanje neželjenih štetnih i toksičnih efekata [60].

Tipičan sled u istraživanju novog antitumorskog agensa podrazumeva sekvencijalne korake: *in vitro* ispitivanja koja identifikuju osetljivi tip ćelija i molekularne mehanizme efekta, *in vivo* ispitivanja kako bi se utvrdila potencijalna antitumorska aktivnost na celom organizmu, farmakološke studije u cilju definisanja načina apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije, i konačno toksikološke studije u kojima se definišu sigurne početne doze za primenu na ljudima (Shema 3).



Shema 3. Koraci u pretkliničkoj evaluaciji novih jedinjenja kao potencijalnih lekova u terapiji malignih bolesti. Adaptirano prema Damia G, *European Journal of Cancer*, 2009. [60]

1.2.1. Ćelijske linije kao modeli malignih bolesti

Tumorske ćelijske linije koje su dobijene izolacijom iz tkiva humanih ili životinjskih tumora predstavljaju fundamentalne modele koji se koriste kako u istraživanjima tumorske biologije, tako i u onim koje se bave ispitivanjima novih, potencijalno antitumorskih, agenasa [61]. Prva tumorska maligna ćelijska linija koja je uzgajana u kulturi je HeLa, linija karcinoma grlića materice koja je izolovana iz tumora pacijentkinje Henrijete Laks još 1951. godine [62]. U današnje vreme, postoje hiljade različitih ćelijskih linija porekla različitih tipova tumora koje su komercijalno dostupne u različitim bankama ćelija, npr. [63–65]. One su okarakterisane u pogledu genetičkog profila, morfologije, vremena dupliranja i

slično. S obzirom na to da su relativno stabilni sistemi, tumorske ćelijske linije se koriste u utvrđivanju ćelijskih mehanizama osetljivosti/rezistencije na terapiju i pokretanja signalnih puteva, u ispitivanju mehanizama metastaziranja. Relativno je lako i dostupno izolovati određene ćelijske kompartmane (mitohondrije, jedro, membransku frakciju) i time detaljnije ispitati pojedine procese od interesa. Takođe, ćelijske linije koje se uzgajaju *in vitro* su pogodne za manipulaciju u smislu promene ekspresije gena i proteina, kontrolisano izazivanje mutacija, kao i modulaciju hemiosenzitivnosti.

Jasna prednost upotrebe ćelijskih tumorskih linija u istraživanjima vezanim za nove potencijalne agense protiv malignih bolesti predstavlja jednostavnost njihove upotrebe. S obzirom na to da su u pitanju klonovi jedne ćelije i da stoga predstavljaju visoko homogene sisteme, sva istraživanja su visoko reproducibilna. Iako postoje neke razlike u odnosu na tumore od kojih su potekle, studije su pokazale da ćelijske linije imaju brojne genomske sličnosti sa svojim izvorom [66,67]. Sa druge strane, poznati su i nedostaci i ograničenja rada sa ćelijskim kulturama. Pre svega, ograničenje predstavlja izbor ćelijske linije koja ima sposobnost rasta van živog organizma i na podlozi od plastike, što utiče na odabir i samim tim može kompromitovati generalizaciju dobijenih zaključaka. Jedna od očiglednih mana upotrebe ćelijskih linija je i to što one predstavljaju samo jedan ćelijski klon heterogene tumorske populacije koji je prilagođen na život u *in vitro* uslovima [68]. Takođe, još uvek nije do kraja poznato na koji način kultivisanje ćelija *in vitro* i njihovo multiplo umnožavanje i pasažiranje zapravo utiče na karakteristike i ponašanje. Takođe, rast ćelija u uslovima *in vitro* je zavisian od vezivanja za podlogu, za razliku od *in vivo* okolnosti gde iako tumorske ćelije formiraju kontakt jedne sa drugima i okolinom, ne moraju biti pričvršćene za podlogu. U dvodimenzionalnim kulturama, u kojima tumorske ćelije najčešće rastu u monosloju, verovatno dolazi do promene bar nekih njihovih osobina. Gubitak trodimenzionalne arhitekture, nepostojanje tumorske strome, interakcija sa komponentama vanćelijskog matriksa, bliskog prisustva krvnih sudova u okolini tumora i ćelija imunskog sistema u *in vitro* uslovima su još neki od nedostataka ćelijskih modela tumora. U solidnim tumorima, naročito centralnim delovima, tipično se uočava smanjena koncentracija kiseonika - hipoksija, dok se tumorske

linije uzgajaju u uslovima sa 21 % kiseonika, što verovatno može imati uticaja na ponašanje ćelija i njihov odgovor na terapiju [69]. Kod istraživanja koja se bave antitumorskim efektima novih jedinjenja, nije moguće ni ispitati različite načine administracije potencijalnog agensa, kao ni farmakokinetičke parametre koji su potrebni za utvrđivanje maksimalne tolerabilne doze potencijalnog leka [68].

U cilju prevazilaženja bar nekih od ovih nedostataka u skorije vreme se razvijaju novi modeli zasnovani na ćelijama koji više odgovaraju ponašanju tumora *in vivo*. Prisutni su modeli ko-kultura, kao i tridimenzionalni sistemi. Ovi 3D modeli se zasnivaju na uzgoju ćelija na sintetskom ili vanćelijskom matriksu napravljenom izolacijom iz bioloških izvora, i omogućavaju kontakt tumorskih sa drugim ćelijama poput fibroblasta, endotelnih ćelija ili makrofaga. U pitanju su takozvani sferoidni modeli kod kojih se uspostavlja mikroarhitektura tumora, postoje hipoksične i nekrotične zone u centru tumora, uspostavljaju se veze sa okolnim ćelijama, kao i ponašanje koje je nalik onome *in vivo* u pogledu ćelijske proliferacije i ćelijske smrti. Takođe, ovi modeli su se pokazali kao pogodni za ispitivanje potencijalnih antitumorskih lekova jer ovako dobijeni podaci mnogo bolje korelišu sa rezultatima koji se ostvaruju *in vivo* [70].

Poslednjih godina postoji tendencija uspostavljanja kultura koje sadrže primarne linije ćelija tumora pacijenata (engl. *patient-derived primary tumor cells*). Njihova prednost je u tome što zadržavaju tumorsku heterogenost i tumorsku mikrosredinu i stoga su bolji model tumora u odnosu na tipične linije. S druge strane, izolacija je tehnički zahtevna, ove kulture pored tumorskih često sadrže i netumorske ćelije, životni vek ovih kultura je ograničen, ne postoji način za njihovo dugotrajno čuvanje, reproducibilnost eksperimenata je smanjena, a metode koje se koriste nisu standardizovane [71].

Bez obzira na navedene nedostatke, upotreba ćelijskih linija kao modela u istraživanjima koja se tiču biologije tumora i dalje ima najznačajnije mesto u pokušajima poboljšanja lečenja malignih bolesti. Translacija rezultata *in vitro* istraživanja u primenu koja bi bila od kliničkog značaja je do sada imala relativno skroman učinak ukoliko se posmatra broj istraživanja koji je od ćelijskih modela stigao do kliničkih studija. Sa druge strane, ćelijski modeli su dali neprocenjive informacije o ponašanju tumora, mehanizmima rezistencije na terapiju,

mehanizmima metastazarinja, i doveli do registracije i upotrebe određenih lekova koji se danas koriste u terapiji malignih bolesti [66].

1.2.2. Animalni modeli malignih bolesti

Animalni modeli malignih bolesti i biološke, farmakodinamičke, farmakokinetičke i farmakološke informacije koje obezbeđuju su od velikog značaja za razumevanje patofiziologije ovih bolesti, za identifikaciju novih terapijskih agenasa, za ispitivanje korisnosti novih lekova u kombinaciji sa već poznatim, kao i za istraživanja koja se tiču rezistencije na terapiju. Animalni modeli imaju svoja ograničenja kada je u pitanju modelovanje humanih bolesti, ali ukoliko je analiza i interpretacija dobijenih rezultata odgovarajuća, oni imaju odlučujuće mesto u otkriću lekova u onkologiji [72–74]. Među animalnim modelima malignih bolesti izdvajaju se modeli sa ektopičnim ksenograftom, ortotopski modeli, modeli sa transgenim životinjama, modeli sa primarnim humanim tumorskim graftom i modeli bolesti izazvani kancerogenima [75].

Model ektopičnog tumorskog ksenografta podrazumeva implantaciju komercijalnih tumorskih linija najčešće supkutano (s.c.), a nešto ređe intraperitonealno (i.p.) ili intramuskularno (i.m.). U pitanju su modeli u kojima se najčešće koriste miševi ili drugi glodari. U slučaju korišćenja humane tumorske ćelijske linije životinje moraju biti imunokompromitovane - najčešće atimični miševi, tzv. *nu/nu* soja, zatim *scid* miševi, *nod/scid* miševi, kako ne bi došlo do odbacivanja tumorskog ksenografta od strane imunskog sistema domaćina. Ovi modeli su dobro okarakterisani i decenijama su bili standard u ispitivanju novih potencijalnih hemioterapeutika. Uspostavljanje modela je tehnički nezahtevno, a praćenje efekata terapije je relativno lako uzimajući u obzir da se tumorske ćelije najčešće ubrizgavaju potkožno te je moguće meriti rast/inhibiciju rasta promene. Ipak, otvoreno je pitanje koliko ovakav model verno reprezentuje malignu bolest kod ljudi. Tumorske ćelije se implantiraju na mesto drugačije od onog gde se tumor inače razvija, koriste se tumorske linije koje su uzgajane *in vitro* i koje ne pokazuju klinički prisutnu heterogenost, spontano metastaziranje je retko, a imunokompromitovanost domaćina onemogućava ispitivanje lekova u čijim bi

efektima posredovao i imunski sistem. Klinička prediktabilnost je relativno niska, ali sa druge strane, model ektopičnog tumorskog ksenografta je od neprocenjive koristi kada su u pitanju mehanističke studije ispitivanja mehanizama dejstva novih agenasa, studije u kojima se ispituje zajednički efekat više lekova, istraživanja koja ispituju tolerabilnost agenasa i podnošljive doze i slično. Nešto ređe se koriste imunokompetentni miševi kojima se implantiraju tumorske ćelije koje su genetički istog porekla. Tada govorimo o singenim modelima. Prethodno navedena ograničenja i prednosti važe i za ove modele, ali je njihova dodatna dobra strana u tome što omogućavaju ispitivanje interakcije imunski sistem-tumor kao i imunski sistem-agens [75,76].

Ortotopski animalni modeli malignih bolesti se mogu uspostaviti na singenim ili imunokompromitovanim glodarima i podrazumevaju implantaciju tumorskih ćelija gajenih *in vitro* na mesto i u tkivo iz kog su potekle, što dovodi do mnogo češćeg metastaziranja i nastanka patološkog fenotipa koji više odgovara kliničkom toku metastatske bolesti kod ljudi. Ovi modeli služe za istraživanje progresije maligne bolesti, lokalno-invazivnih karakteristika tumora, kao i nastanka udaljenih metastaza. U kombinaciji sa prikupljanjem i izolovanjem ćelija iz udaljenih sekundarnih depozita moguće je napraviti varijante ćelija koje imaju visok metastatski potencijal. Ovi modeli se mogu koristiti u pretkliničkim studijama za ispitivanje preživljavanja u slučaju različitog doziranja lekova, ili primene nove kombinacije lekova. Pored nedostataka koji se odnose na korišćenje ćelijskih linija, ovi modeli su tehnički zahtevni, varijabilnost uspeha uspostavljanja tumorskog modela je promenljiva i zbog potrebe za hirurškim pristupom u implantaciji tumorskih ćelija, i ukupno zahtevaju više vremena u odnosu na ektopične ksenograft modele. Stoga još uvek nisu u najširoj upotrebi. Međutim, nekoliko singenih ortotopskih modela je imalo velikog uspeha u translacionim istraživanjima i kasnijim stadijumima studija novih lekova što je dovelo do farmakološke karakterizacije i optimizacije i dalje upotrebe. Izdvajaju se model *Lewis* karcinoma pluća na C57BL/6 miševima, 4T1 karcinom dojke na Balb/c miševima, L210 i P338 modeli akutnih leukemija na DBA/2 miševima, CT-26 karcinom kolona na Balb/c miševima i B16 melanom na C57BL/6 miševima [75,77,78].

Transgeni animalni modeli malignih bolesti su važni za rasvetljavanje kompleksnih bioloških procesa koji su povezani sa disregulacijom molekularnih procesa u ovim bolestima. Koriste se životinje koje imaju germinativne mutacije ili one koje je moguće uslovno aktivirati. Ovi modeli su verni pokazatelji celokupnih genetičkih, biohemijskih, histoloških i fenotipskih promena koje se događaju u malignoj bolesti. Tumor se razvija na očekivanom mestu, spontano, uz postojanje interakcija sa stromom i imunskim sistemom, a napredak bolesti odgovara onom kod ljudi. Problem predstavlja relativno niska penetrantnost modela, kao i heterogenost u pogledu učestalosti javljanja tumora, latentnog perioda do pojave bolesti i brzine rasta maligne promene. Praćenje efekata terapije često mora da podrazumeva sofisticirane metode vizuelizacije, dok je manipulisanje genetičkim materijalom životinja proces koji je dugotrajan i zahteva ulaganje velikih finansijskih sredstava te nije lako dostupan [79].

Modeli sa primarnim humanim tumorskim graftom su ušli u upotrebu tek nedavno. Oni podrazumevaju direktnu implantaciju, serijsku transplantaciju i propagaciju tumorskih ćelija pacijenta neposredno nakon operacije u imunodeficientnog miša, uz mogućnost kasnije krioprezervacije. Time se dobija tumorski graft koji zadržava genotipske i fenotipske karakteristike originalnog humanog tumora. Ovi modeli imaju značajnu prediktivnu vrednost kada je u pitanju otkrivanje novih lekova u terapiji malignih bolesti. Mane ovakvog pristupa su pre svega dostupnost hirurškog materijala, tehnička opremljenost, potreba da se tumori serijski transplantiraju kroz životinje za uspostavljanje stabilnosti što traje i po 6-9 meseci, kao i visoka cena. Neki od ovih nedostataka će verovatno biti prevaziđeni tehnološkim napretkom i optimizacijom protokola za izolaciju i implantaciju [75,80].

Životinjski modeli malignih bolesti koje su indukovane kancerogenima postoje za različite vrste solidnih tumora i malignih bolesti krvi. Ovi modeli pokazuju vremenski sled i patogenezu maligne bolesti kao odgovor na određene etiološke sredinske kancerogene i agense koji ubrzavaju razvoj tumora. Najčešće se koriste aromatični policiklični ugljovodonici, kancerogeni povezani sa duvanskim dimom, nitrozamini, koji se primenjuju peroralno, intraperitonealno ili topikalno na imunokompetentnim glodarima. Značajna prednost je što se na ovaj način

oponaša nastanak maligne bolesti, od hiperplazije, displazije, preko premalignih lezija, pa do karcinoma *in situ* i niskodiferentovanih tumora sa visokom stopom metastaziranja. Sa druge strane, ograničen je broj vrsta malignih bolesti koje se na ovaj način mogu izazvati. Takođe, vreme od početka eksperimenata do pojave bolesti nekada može trajati i do godinu dana što predstavlja tehničku i finansijsku poteškoću [75].

1.2.3. Čelijski i animalni modeli melanoma

U cilju ispitivanja novih jedinjenja kao potencijalnih lekova u terapiji melanoma danas je u upotrebi veći broj humanih i mišjih čelijskih linija. Od humanih tumorskih linija komercijalno su dostupne SK-MEL-1, A375, G-361, koje su dobro okarakterisane i poseduju mutacije u bar nekom od sledećih gena: *BRAF*, *CDKN2A*, *STK11*, *CTNNB1*. Humane melanomske linije koje imaju metastatski potencijal su SK-MEL-3, SH-4, SK-MEL-24, RPMI-7951 za koje se zna da poseduju mutacije u jednom ili više od sledećih gena: *BRAF*, *CDKN2A*, *TP53*, *PTEN* [63]. Takođe, brojne banke ćelija izoluju i formiraju nove čelijske tumorske linije porekla pacijenata koje su jasno okarakterisane [81–83].

Melanomske čelijske linije miša su u upotrebi od sedamdesetih godina prošlog veka kada je prva linija, B16, izolovana iz spontano nastalog melanoma kod miša soja C57BL/6. Čelijska linija je zatim pasažirana *in vivo* intravenskim injektiranjem tumorskih ćelija i izolacijom plućnih metastaza deset puta, čime su ćelije dobile visoko metastatski potencijal, a linija nazvana B16-F10 [84]. Upotreba B16 ćelija je verovatno najviše korišćeni model u istraživanjima vezanim za maligni melanom, naročito uzimajući u obzir mogućnost uspostavljanja singenog animalnog modela korišćenjem ove čelijske linije.

Danas postoji veliki broj različitih mišjih modela melanoma. U literaturi se spominju modeli indukovani kancerogenima (npr. UV zračenje, dimetilbenz-a-antracen) i transgeni modeli sa mutiranim različitim genima koji imaju varijabilnu stopu uspešnosti, penetrantnost i sposobnost metastaziranja (pregled dat u [85]). Singeni model sa B16 ćelijama je dobro poznat i u širokoj upotrebi kako za modelovanje primarnog melanoma, tako i za modelovanje metastatske bolesti. Po

supkutanoj implantaciji B16 ćelija, tumorska promena postaje makroskopski uočljiva i palpabilna između 5. i 10. dana i dostiže veličinu od 1 cm³ u periodu između 14. i 21. dana. Sugestija je da se eksperiment završi u ovom periodu jer u slučaju dužeg trajanja bolesti i većeg rasta, tumorska masa često postaje nekrotična, ulcerira ili krvari. Za indukovanje metastatskog modela se koristi linija B16-F10, gde se nakon injektovanja ćelija u repnu venu miša formiraju metastatski depoziti u plućima. Nakon 2-3 nedelje od injektiranja, životinje se žrtvuju, pluća izoluju, a tumorski nodusi prebroje, uz očekivani broj od 50-250 koji se uočava na površini pluća. U slučaju većeg broja metastaza promene se slivaju i nemoguće ih je izbrojati, te se obeležavaju kao TNTC (engl. *too numerous to count*) i arbitrarno im se dodeljuje broj od 250 [86].

1.3. Mehanizmi ćelijske smrti u patogenezi i terapiji malignih bolesti

Cilj antitumorskih lekova je da dovedu do smrti tumorskih ćelija i/ili da kontrolišu njihovu proliferaciju kako bi se produžio životni vek i kvalitet života obolelih. Nekoliko je različitih mehanizama kojima se ovo može postići: inhibicijom sinteze nukleinskih kiselina, ometanjem strukture i funkcije DNK, blokadom transkripcije i sinteze RNK, inhibicijom sinteze i funkcije proteina, uticajem na homeostazu hormona i modulacijom imunskog sistema. Antitumorski lekovi su stoga klasifikovani u četiri velike grupe - citotoksični agensi (u koje spadaju alkilirajući agensi, antimetaboliti, antibiotici, ekstrakti biljaka i ostali citotoksici), ciljani agensi (koji najčešće podrazumevaju antitela na određenu molekularnu metu), hormoni i hormonski antagonisti i imunomodulatori [87].

Preživljavanje ćelija, ćelijska proliferacija i ćelijska smrt su važni bazični biološki procesi čije je poznavanje od ključnog značaja u naporima koji se ulažu u cilju postizanja bolje terapije malignih bolesti [88]. Poznato je da u nastanku tumora značajnu ulogu igra nekontrolisana ćelijska proliferacija koja je potpomognuta sposobnošću tumorskih ćelija da izbegnu smrt. Razumevanje molekularnih događaja koji do ovoga dovode, kao i utvrđivanje signalnih puteva koji su disregulisani omogućava prepoznavanje potencijalnih mesta modulacije koja bi bila od koristi u

sprečavanju progresije tumora. Takođe, uzimajući u obzir visok nivo bilo urođene bilo stečene rezistencije koje tumorske ćelije pokazuju u odnosu na korišćene citotoksične lekove u kliničkim okolnostima, potrebno je da pretklinička istraživanja novih potencijalnih agenasa uključe detaljno ispitivanje njihovog molekularnog mehanizma dejstva.

Tradicionalno, tip ćelijske smrti je određivan na osnovu morfoloških promena koje se mogu uočiti, te je od sedamdesetih godina prošlog veka u upotrebi bila klasifikacija prema kojoj postoje tri različita modaliteta: programirana ćelijska smrt tip I - apoptoza, programirana ćelijska smrt tip II - autofagija i tip III ćelijske smrti - nekroza [89]. Za apoptozu i autofagiju je bilo poznato da se odvijaju po unapred određenom sledu događaja koji je zapisan u genetičkom kodu, dok se nekroza dugo smatrala za akcidentalni tip ćelijske smrti definisan odsustvom promena koje odgovaraju apoptozi ili autofagiji [90]. Tehnološki razvoj i napredak u biohemijskim i tehnikama molekularne biologije je doveo do saznanja da isti morfološki tip ćelijske smrti u osnovi može imati sasvim različite funkcionalne, biohemijske i imunološke karakteristike. Stoga je u poslednjih desetak godina nomenklatura tipova ćelijske smrti više puta revidirana. Prema poslednjoj klasifikaciji Komiteta za nomenklaturu ćelijske smrti (engl. *Nomenclature Committee on Cell Death*) iz 2015. godine, ćelijska smrt se može podeliti u dve široke, međusobno isključujuće kategorije - akcidentalnu i regulisanu. Akcidentalna ćelijska smrt nastaje kao posledica delovanja različitih jakih noxi, fizičkih (visoka temperatura, visoki pritisak), hemijskih (ekstremne varijacije pH, dejstvo jakih deterdženata) i mehaničkih. Događa se gotovo trenutno, nije posledica aktivacije bilo kakve molekularne mašinerije i nije je moguće zaustaviti bilo kakvim farmakološkim ili genetičkim intervencijama. Regulisana ćelijska smrt podrazumeva pokretanje molekularnih procesa koji su genetički kodirani. Stoga se njen tok može promeniti farmakološkim i/ili genetičkim manipulacijama. Uglavnom se pokreće relativno odloženo u odnosu na stimulus koji je do nje doveo, a kao posledica adaptivnog odgovora na poremećaj ćelijske homeostaze koji se neuspešno završava. Ukoliko se regulisana ćelijska smrt odigrava u potpuno fiziološkim okolnostima, kao u slučaju embrionalnog razvića i održavanja tkivne homeostaze, onda se označava terminom programirana ćelijska smrt [91]. Regulisana ćelijska smrt je dalje klasifikovana u

odnosu na biohemijske i funkcionalne promene na tipične forme kao što su apoptoza sa podtipovima i autofagija, ali i neke ređe oblike - mitotska katastrofa, entoza, netoza, piroptoza, anoikis, partanatos, kornifikacija. Treba napomenuti da je sugestija da se termin nekroza zameni terminom nekroptoza, jer je pokazano da se, za razliku od prethodnog stava, ovaj tip ćelijske smrti odvija na regulisan način uz učešće tačno određenih signalnih molekula [92].

1.3.1. Apoptoza

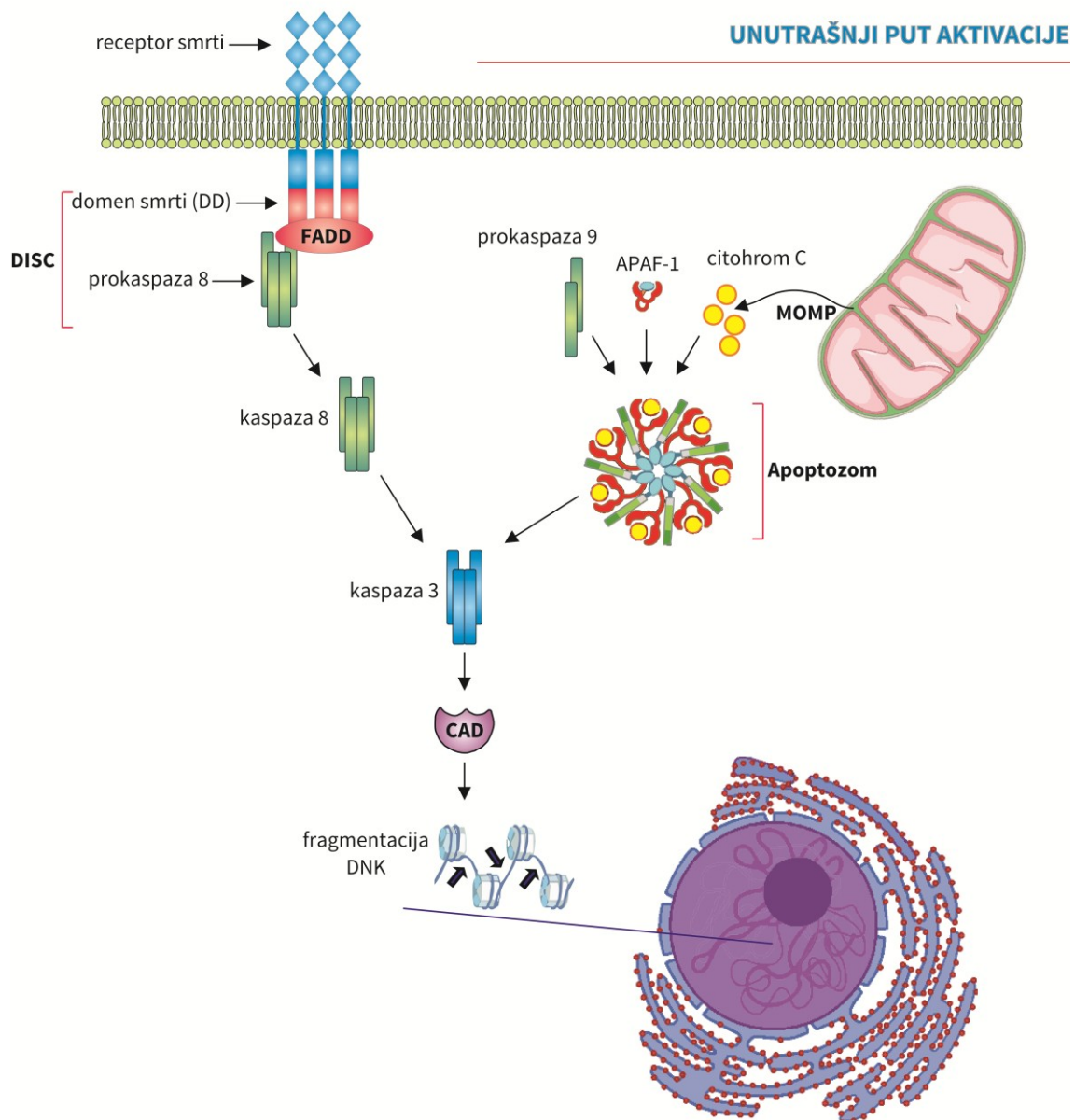
Apoptoza je mehanizam ćelijske smrti koji se sreće kod višćelijskih organizma u cilju uklanjanja neželjenih ćelija u različitim okolnostima. Odlikuje se jasnim i preciznim kontrolisanim nizom molekularnih događaja koji kao ishod imaju ćelijsku smrt uz visoku efikasnost i minimalno oštećenje okolnih struktura. Zaostali ćelijski debris uklanjaju profesionalni fagociti. Dramatične promene koje se događaju u ćeliji koja je ušla u apoptozu su dobro okarakterisane, kako morfološki, tako i biohemijski [93].

Sa morfološkog aspekta, ćelija u kojoj je otpočet apoptotični proces menja svoj oblik, postaje više zaokružena, i gubi kontakt sa okolnim ćelijama. Ovo je praćeno formiranjem protruzija na ćelijskoj membrani (engl. *membrane blebbing*) koje će se odvojiti od ćelije u obliku vezikula sa ćelijskim sadržajem nazvanim apoptotska tela. Najtipičnija promena u unutrašnjosti ćelije je kondenzacija jedra koja je praćena njegovom fragmentacijom. Ovo se smatra jednim od događaja karakterističnih za apoptozu jer se ne sreće u drugim okolnostima. Promene i fragmentacija drugih ćelijskih organela, mitohondrija, Goldži kompleksa, endoplazmatičnog retikuluma, takođe su prisutne [90,94,95]. Membrana ćelija u apoptozi, iako podleže određenim promenama, ostaje očuvana tokom celog procesa. Najznačajniji događaj u membrani ćelije je eksternalizacija fosfatidil serina (PS). Ovaj fosfolipid ćelijske membrane se normalno nalazi isključivo u unutrašnjem sloju membranskog dvosloja ali se po aktivaciji apoptoze pojavljuje u spoljašnjem sloju. Smatra se da je prisustvo PS na površini ćelije signal za fagocitozu, odnosno signal pomoću kojeg fagociti prepoznaju i uklanjanju takvu ćeliju ili apoptotsko telo [96]. Biohemijski, u apoptozi se aktivira veliki broj enzima koji pripadaju klasi hidrolaza među kojima su

najznačajnije proteaze kaspaze i različite deoksiribonukleaze (DNAze). Ovi enzimi će dovesti do razgradnje komponenata citoskeleta, jedarne membrane, adhezionih molekula koji povezuju ćeliju sa drugim ćelijama ili ekstracelularnim matriksom, ali i do hidrolize ključnih molekula koji su deo signalnih kaskada za preživljavanje ćelija, faktora transkripcije i translacije, čime se ovi procesi zaustavljaju [97]. Razgradnja ćelijskih proteina, zajedno sa hidrolizom naslednog materijala, procesi su koji ćeliju nepovratno vode u smrt. Tradicionalno, način aktivacije apoptoze se može podeliti na spoljašnji i unutrašnji put (Shema 4).

Spoljašnji put aktivacije apoptoze (engl. *extrinsic pathway*) se pokreće aktivacijom tzv. receptora smrti (engl. *death receptors*). Receptori smrti se nalaze na ćelijskoj membrani i pripadaju superfamiliji receptora za faktor nekroze tumora (TNF, engl. *tumor necrosis factor*). Unutarćelijski delovi ovih receptora sadrže tzv. domen smrti (DD, engl. *death domain*) preko koga se pokreće signalna kaskada apoptoze. Najbolje opisani receptori smrti i ligandi koji se za njih vezuju su: TNFR1-TNF α , FAS (CD95)-FasL, TRAILR1 (DR4)-TRAIL. Po vezivanju liganda i aktivaciji receptora, dolazi do trimerizacije i konformacionih promena samog receptora što omogućava izloženost DD i interakciju sa, odnosno regrutaciju adapternih proteina koji sadrže isti domen, pri čemu se formira signalni kompleks koji indukuje smrt (DISC, engl. *death-inducing signaling complex*). U sastav DISC kompleksa ulaze proteini FADD (engl. *FAS-associated death domain*) i prokaspaza 8, a on može sadržati i dodatne molekule poput TRADD proteina (engl. *TNFR-associated death domain*) i TRAF2 proteina (engl. *TNFR-associated factor 2*). Isecanje i aktivacija prokaspaze 8 u kaspazu 8 koja se događa u DISC-u dalje prenosi signal smrti aktivirajući egzekutorne, izvršne, kaspaze 3, 6 i 7. Kaspaza 3 će aktivirati DNAzu koju aktiviraju kaspaze (CAD, engl. *caspase-activating DNase*), koja će otići u jedro i dovesti do hidrolize DNK na internukleozomalne fragmente veličine oko 180 bp. Alternativno, jedan od supstrata kaspaze 8 je i protein iz BCL-2 familije proteina, BID. Isečeni BID dovodi do uključivanja mitohondrija u proces ćelijskog umiranja, odnosno uključivanja i unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze [98–102].

SPOLJAŠNJI PUT AKTIVACIJE



Shema 4. Najznačajniji događaji u spoljašnjem i unutrašnjem putu aktivacije apoptoze

Unutrašnji put aktivacije apoptoze (engl. *intrinsic pathway*) je posredovan unutarćelijskim signalima koji se susreću na nivou mitohondrija, a kao odgovor na različita stresna stanja. Unutrašnji stimulusi su, između ostalog, oštećenje genetičkog materijala koje se ne može ispraviti, oštećenje mitohondrija, hipoksija, visoke koncentracije kalcijuma u citosolu, intenzivan oksidativni stres. U tim okolnostima, promena u ravnoteži proapoptotskih i antiapoptotskih članova BCL-2

familije proteina u korist proapoptotskih dovodi do permeabilizacije spoljašnje mitohondrijalne membrane (MOMP, engl. *mitochondrial outer membrane permeabilization*). Proteini koji se normalno nalaze u prostoru između dve mitohondrijalne membrane stoga izlaze u citosol. Među njima je i citohrom c koji dalje sprovodi signal smrti. Naime, citohrom c, kada se nađe u citosolu, indukuje oligomerizaciju citosolnog proteina faktor-1 koji aktivira apoptotične proteaze (APAF-1, engl. *apoptosis protease activating factor-1*) i vezivanje inicijatorne prokaspaze 9. Na ovaj način se formira kompleksna struktura izgrađena od citohroma c, APAF-1 i prokaspaze 9 nazvana apoptozom. Učestće prokaspaze 9 u izgradnji apoptozoma dovodi do njene autoaktivacije i nastanka aktivne kaspaze 9 koja dalje iseca i time aktivira egzekutorne kaspaze 3, 6 i 7. Ovo za posledicu ima hidrolizu velikog broja ćelijskih proteina, prethodno pomenutu aktivaciju CAD i konačno ćelijsku smrt [103–105].

Kaspaze su enzimi koji pripadaju klasi hidrolaza, potklasa peptidaze. Specifično, u pitanju su cisteinil aspartat proteinaze (engl. *caspase*) koje u kataličkom centru sadrže amino kiselinu cistein, tj. njenu sulfhidrilnu grupu, a deluju na peptidnu vezu u čijem formiranju učestvuje amino kiselina aspartat. Kod čoveka je do sada opisano 11 različitih kaspaza [106]. Skoro sve ćelije sadrže različite vrste kaspaza koje se nalaze u neaktivnoj, zimogenoj formi, kao prokaspaze. U slučaju započinjanja apoptotskog signala, ovi enzimi podležu parcijalnoj kontrolisanoj proteolizi i prelaze iz neaktivnog u aktivni oblik. Aktivne kaspaze su strukturno heterotetrameri sastavljeni iz dva heterodimera koji su derivati proenzimskih oblika. Pored regiona koji će u obradi dati dve subjedinice koje izgrađuju heterodimer, svaka prokaspaza sadrži i prodomen različite dužine na amino kraju proteina. Kaspaze sa dugačkim N-terminalnim prodomenom sadrže mesta odgovorna za protein-protein interakcije i posreduju u vezivanju molekula prokaspaza za komplekse signala smrti (DISC ili apoptozom) što dovodi do autokatalitičke aktivacije odgovarajuće kaspaze. Ove vrste kaspaza se nazivaju inicijatornim kaspazama, i tu spadaju kaspaza 2, kaspaza 8, kaspaza 9 i kaspaza 10. Kaspaze čiji je N-terminalni prodomen kratak nemaju sposobnost autoaktivacije već se aktiviraju od strane aktivnih inicijatornih kaspaza. Nazivaju se izvršnim, egzekutornim ili efektornim kaspazama i u njih spadaju kaspaza 3, kaspaza 6 i

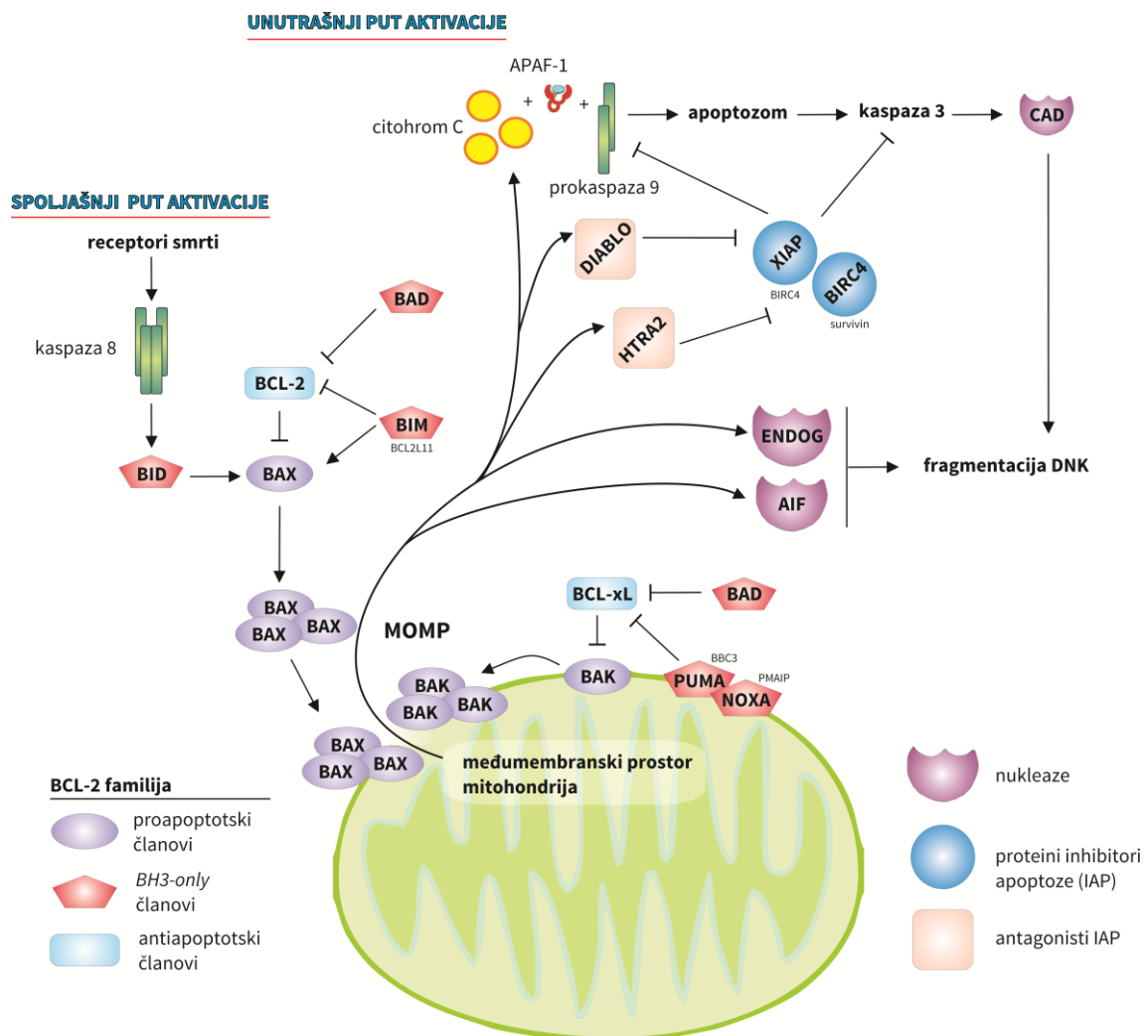
kaspaza 7 [107]. Uloga kaspaze 2 nije u potpunosti jasna, ali je sigurno da učestvuje u apoptozi, verovatno delujući i na mitohondrijalni (unutrašnji) put pokretanja ovog procesa. Pored toga, u poslednje vreme se spekuliše o njenoj ulozi u supresiji tumorogeneze [108]. Kaspaza 8 je inicijatorna kaspaza spoljašnjeg puta apoptoze posredovanog receptorima smrti. Takođe, ima ulogu i u urođenom imunskom odgovoru, supresiji nekroptoze i regulaciji produkcije citokina [109]. Za inicijaciju unutrašnjeg puta apoptoze je odgovorna kaspaza 9, verovatno najviše proučavana kaspaza. Skorašnje studije sugerišu da je moguće da se ona u određenim okolnostima može ponašati i kao izvršni molekul u procesu apoptoze [110]. Kaspaza 10 ima slično poreklo, strukturu i specifičnost kao kaspaza 8, mada sve njene uloge još uvek nisu detaljno rasvetljene [111]. Kaspaza 3 je glavna efektorska kaspaza odgovorna za razgradnju unutarćelijskih proteina u procesu apoptoze. Ona se aktivira parcijalnom proteolizom od strane kaspaze 8 ili kaspaze 9. Smatra se da ima oko 180 različitih supstrata [112]. Kaspaza 6 ima sličnu strukturu kao kao kaspaza 3, ali drugačiju supstratnu specifičnost i čini se da nije uvek neophodna za odvijanje apoptoze u slučaju delovanja različitih agenasa na ćeliju [113]. Kaspaza 7 je po strukturi i supstratnoj specifičnosti nalik kaspazi 3 [114].

Familija proteina pod nazivom B-ćelijski limfom 2 (BCL-2) uključuje više od 20 različitih proteina (Shema 5) koji regulišu unutrašnji put apoptoze i koji regulišu ravnotežu između ćelijskog preživljavanja i ćelijske smrti [115]. BCL-2 familija je podeljena u tri grupe u odnosu na njihovu funkciju: antiapoptoski proteini (BCL-2, BCL-xL, BCL-W, MCL-1, BFL-1/a1), proapoptoski proteini koji formiraju poru na mitohondrijalnoj membrani (BAX, BAK, BOK) i proapoptoski proteini koji sadrže samo BH3 (domen 3 Bcl-2 homologije, engl. *Bcl-2 homology domain 3*) domen, tzv. *BH3-only* proteini (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA) [116]. Prve dve grupe (antiapoptoski i proapoptoski koji formiraju poru) imaju jedan do četiri BH domena, a njihova tercijerna struktura formira hidrofobni usek pomoću koga se vezuju za BH3 domene drugih članova familije. Antiapoptoski članovi familije sprečavaju MOMP i izlazak mitohondrijalnih međumembranskih proteina u citosol, dok proapoptoski olakšavaju ovaj proces [98]. Glavnu ulogu u nastanku MOMP imaju BAX i BAK proteini. U slučaju signala koji pokreću unutrašnji put aktivacije apoptoze, citosolni protein BAX se translocira u mitohondrijalnu membranu, menja

konformaciju i oligomeriše. Istovremeno, BAK koji je integralni protein spoljašnje mitohondrijalne membrane takođe podleže konformacionim promenama i oligomeriše. Zajedno, ova dva proteina formiraju pore na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, tj. dovode do MOMP, što uzrokuje izlazak proteina međumembranskog mitohondrijalnog prostora u citosol [117]. Među ovim proteinima pored citohoroma c (koji će zajedno sa APAF-1 i prokaspazom 9 formirati apoptozom, kao što je ranije pomenuto) nalaze se i faktor koji indukuje apoptozu (AIF, engl. *apoptosis-inducing factor*) i endonukleaza G (EndoG). Kada AIF napusti mitohondrije on odlazi u jedro i dovodi do kondenzacije hromatina kao i hidrolize DNK na velike fragmente, nezavisno od prisustva/aktivacije kaspaza [118]. Enzim EndoG je takođe deoksiribonukleaza i ima sličnu funkciju kao AIF, tj. on odlazi u jedro i dovodi do nukleozomalne fragmentacije DNK [119]. Dodatno, iz međumembranskog prostora će se osloboditi grupa proteina koji u citosolu inhibiraju proteine inhibitore apoptoze, poput DIABLO i HTRA2 proteina. Od antiapoptoskih članova BCL-2 familije treba spomenuti BCL-2 i BCL-xL koji su normalno vezani za BAX i BAK proteine i sprečavaju njihovu oligomerizaciju i MOMP, tj. imaju ulogu u preživljavanju. BH3 *only* članovi familije svoju proapoptotsku funkciju obavljaju tako što inhibiraju inhibitorno dejstvo antiapoptotskih članova, dok neki imaju i direktan aktivacijski uticaj na proapoptotske članove familije. BID, kao što je već spomenuto, može biti aktiviran i spoljašnjim putem apoptoze, a njegova aktivacija indukuje oligomerizaciju BAX proteina i time MOMP. Protein BIM (koji se naziva i BCL2L11) je normalno vezan za mikrotubule ali se u slučaju aktivacije apoptoze vezuje za antiapoptotski BCL-2, inhibira ga i istovremeno direktno aktivira proapoptotski BAX, što ukupno promoviše apoptozu. Citosolni BAD takođe vezuje i time inhibira antiapoptoske članove familije, i to BCL-2 i BCL-xL. Članovi familije PUMA (koji se naziva i BBC3) i NOXA (nazvan i PMAIP) koji se nalaze u mitohondrijalnoj membrani inhibiraju BCL-2 i BCL-xL, odnosno MCL-1 i BFL-1/a1 te preko inhibicije antiapoptoskih proteina zapravo aktiviraju apoptozu [116].

U regulaciji apoptoze važnu ulogu imaju i proteini inhibitori apoptoze (IAP, engl. *inhibitor of apoptosis protein*) kao i njihovi antagonisti (Shema 5). Do sada najbolje opisan IAP je X-vezani IAP (XIAP, nazvan još i BIRC4) koji inhibira aktivnost kaspaze

3, kaspaze 7 i kaspaze 9 i time pokazuje antiapoptotske efekte [120]. Survivin (BIRC5) svoju antiapoptotsku ulogu verovatno ostvaruje povezivanjem sa P21 (inhibitor 1a ciklin zavisne kinaze, engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1a*) i centromerom na početku mitoze, a moguće je i da zajedno sa XIAP inhibira kaspazu 9 [121,122]. Sa druge strane, aktivnost IAP proteina može biti inhibirana tzv. antagonistima IAP. U njih se ubrajaju ranije spomenuti HTRA2 (OMI) i DIABLO (SMAC). Oni se normalno nalaze u prostoru između dve mitohondrijalne membrane i po aktivaciji unutrašnjeg puta apoptoze i MOMP izlaze u citosol gde se vezuju za IAP proteine. Vezani za antagoniste, IAP proteini gube sposobnost inhibicije kaspaza, što ukupno vodi nastavku započetog apoptotskog procesa [123].



Shema 5. Uloga proteina BCL-2 familije, proteina inhibitora apoptoze (IAP) i antagonista IAP-a u apoptozi

Poremećaji u regulaciji apoptoze su direktno povezani sa nekontrolisanom ćelijskom proliferacijom, odnosno rastom i progresijom tumora. Dodatno, izbegavanje apoptoze je jedna od karakteristika malignih ćelija [124] što rezultuje visokom stopom bilo urođene bilo stečene rezistencije na brojne hemioterapeutske agense. Međutim, iako prisutne u nekim tumorima, broj mutacija u genima koji kodiraju proteine direktno uključene u apoptozu je relativno mali [125,126], pa se nameće zaključak da je apoptotska mašinerija strukurno očuvana ali inhibirana u malignim bolestima. Stoga se reaktivacija apoptoze čini kao dobra strategija za antitumorsko delovanje [127]. Uzimajući u obzir različite nivoe kontrole apoptotskog procesa i međusobnu povezanost različitih puteva aktivacije, ispitivanje potencijalnog agensa u lečenju malignih bolesti treba da obuhvati široki spektar mogućih efekata na ove procese.

1.3.2. Autofagija

Autofagija je evoluciono konzerviran katabolički proces prisutan kod eukariota koji podrazumeva razgradnju citoplazmatskog sadržaja u lizozomima. Tipično, autofagija ima protektivnu ulogu, tj. ulogu u ćelijskom preživljavanju. U okolnostima kada je neodgovarajuće i previše aktivirana ona postaje mehanizam ćelijske smrti [128]. Glavni pokretači autofagije su različite vrste unutrašnjih ili spoljašnjih stresora - nedostatak nutrijenata tj. gladovanje, hipoksija, oksidativni stres, stres endoplazmatičnog retikuluma. U uslovima gladovanja ovim mehanizmom se obezbeđuju neophodni nutrijenti tako što se neesencijalne i/ili nepotrebne ćelijske komponente razgrađuju [129]. Takođe, autofagija je mehanizam kojim se uklanjanju oštećene ili nepotrebne organele, neodgovarajuće savijeni proteini i strane čestice. Razvoj tkiva, diferencijacija i održavanje homeostaze organizma uključuju i autofagiju [130]. Autofagija je genetički regulisana grupom gena koji se nazivaju geni povezani sa autofagijom (ATG, engl. *autophagy-related genes*). Poremećaji u normalnom odvijanju autofagije stoga imaju ulogu u nastanku različitih bolesti, uključujući maligne bolesti [131].

U zavisnosti od načina dopremanja ćelijskog sadržaja do lizozoma razlikuju se tri tipa autofagije: autofagija posredovana šaperonima (CMA, engl. *chaperone-mediated autophagy*), mikroautofagija i makroautofagija (koja će u nastavku teksta biti označena kao autofagija). CMA podrazumeva obeležavanje proteina koji treba da se razgrade šaperonima, zatim njihovu translokaciju i posledičnu degradaciju u lizozomima [132], dok u mikroautofagiji membrana lizozoma pravi protruzije, obuhvata deo citoplazmatskog sadržaja koji internalizuje i zatim razgrađuje [133].

Autofagija (makroautofagija) podrazumeva *de novo* stvaranje vezikule sa dvostrukom membranom, autofagozoma, koja sadrži ćelijski sadržaj spreman za razgradnju, njeno spajanje sa lizozomom i zatim degradaciju sadržaja [129]. Nastanak autofagozoma započinje stvaranjem tzv. izolacione membrane i njenom ekspanzijom. Smatra se da su inicijaciona mesta za nastanak izolacione membrane strukture povezane sa endoplazmatičnim retikulumom [134]. Izolaciona membrana se zatim širi i u ovom stadijumu se naziva fagofora. Zatim dolazi do savijanja membrane i konačno formiranja sferičnog autofagozoma. U slučaju tzv. selektivne autofagije, fagofora se savija oko dela citoplazme namenjenog za razgradnju, prilagođavajući svoju strukturu sadržaju koji treba da se nađe u autofagozomu [135]. Po formiranju autofagozoma, dolazi do fuzije sa lizozomom i nastanka autolizozoma (autofagolizozoma) [136]. Unutrašnja membrana autofagozoma se prvo razgradi pod dejstvom kisele sredine lizozoma i prisutnih lizozomalnih hidrolaza, a zatim se razgrađuje ćelijski sadržaj koji se nalazio u autofagozomu. Nastali produkti razgradnje se dalje transportuju kroz lizozomalnu membranu putem permeaza i koriste u citosolu u biosintetskim reakcijama ili služe kao izvor energije [129].

Proces autofagije se može podeliti u nekoliko faza: inicijacija, nukleacija, elongacija i fuzija. Za inicijaciju stvaranja autofagozoma je odgovoran kinazni kompleks koji se sastoji od nekoliko komponenata. U njegov sastav ulazi kinaza slična Unc-51 (ULK1/2, engl. *Unc-51-like kinase*), zatim protein ATG13, protein RB1CC1 (FIP200) neophodan za indukciju i protein C12orf44/ATG101 koji se direktno veže za ATG13 i esencijalan je za autofagiju. Ovaj kompleks postoji nezavisno od metaboličkog stanja ćelije. U okolnostima sitosti, ovaj ULK1/2-ATG13-RB1CC1 kompleks je povezan sa kompleksom 1 mehanističke mete rapamicina (MTORC1,

engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*). MTORC1, koji je kinaza, fosforiliše ULK1/2 i ATG13 i time ih inhibira. U uslovima gladovanja, MTOR se odvaja od kompleksa inicijacije koji postaje aktivan i inicira pokretanje autofagije [137]. Za naredni korak, nukleaciju, tj. stvaranje izolacione membrane, neophodan je kompleks koji sadrži protein ATG14, i komponente fosfatidilinozitol 3-kinaze klase III (PI3K). Aktivnost ovog enzima će dovesti do nastanka fosfatidilinozitol 3-fosfata, što je neophodan korak u autofagiji. Kompleks se sastoji iz komponentata PI3K: katalitičke subjediničice tipa 3 fosfatidilinozitol 3-kinaze (PIK3C3, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*), regulatorne subjediničice 4 fosfoinozimid 3-kinaze (PIK3R4, engl. *phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4*), spomenutog ATG14 i proteina nazvanog beclin-1 (BECN1). BECN1, koji je inače inhibiran antitapoptotskim BCL-2, u uslovima gladovanja aktivira ceo kompleks nukleacije i PI3K, te se proces autofagije nastavlja. Za elongaciju fagofore je potrebno nekoliko različitih ATG proteina. U pitanju su dva sistema koji uključuju enzime koji funkcionišu nalik konjugujućem sistemu pri ubikvitinaciji [138]. Prvi sistem zahteva prisustvo ATG7 koji ima funkciju E1, tj. aktivirajućeg enzima i ATG10 koji funkcioniše kao E2, tj. konjugujući enzim. Ova dva enzima zajedno dovode do kovalentne konjugacije ATG12 proteina za ATG5. Protein ATG16L1 se zatim nekovalentno vezuje za ATG5, a ovaj trimerni kompleks zatim dimerizuje i ima ulogu u drugom sistemu konjugacije [139]. Drugi sistem konjugacije dovodi do obrade LC3 ili GABARAP proteina, koji su homolozi Atg8 kod kvasca. Laki lanac 3 povezan sa mikrotubulima (LC3, engl. *microtubule-associated light chain 3*) najpre podleže isecanju pod dejstvom ATG4 i prevodi se u LC3-I. Sa njim se konjuguje ATG3, uz učeće konjugujućeg enzima ATG7. Konačno, prethodno pomenuti dimer ATG16L1-ATG5-ATG12 posreduje u vezivanju fosfatidil etanolamina za LC3-I koji se istovremeno vezuje za membranu nastajućeg autofagozoma. Ova lipidovana forma LC3-I se naziva LC3-II i kao takva je jedan od specifičnih markera autofagičnog procesa. Na sličan način se obrađuje i protein povezan za receptorom gama-aminobuterne kiseline (GABARAP, engl. *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*), s tim da se ovo događa nešto kasnije u formiranju autofagozoma u odnosu na obradu LC3 [140]. Formirani autofagozom se kreće ka lizozomu uz učeće

mikrotubula, dok je za samu fuziju sa lizozomom potrebno učešće GTPaze RAB7, a verovatno i SNARE mašinerije [141].

U pogledu regulacije autofagije, kao što je već pomenuto, ulogu glavnog represora faze inicijacije ima MTORC1 koji kada je aktivan fosforiliše ULK1/2 i time inhibira inicijacioni kompleks. U uslovima hipoksije, gladovanja ili smanjenja faktora rasta dolazi do inhibicije MTORC1 i time posledično do aktivacije autofagije [137]. Značajan aktivator autofagije je protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (AMPK, engl. *adenosine monophosphate-activated kinase*). Ovu kinazu aktivira smanjenje odnosa adenozin trifosfata i adenozin monofosfata (ATP/AMP), odnosno nizak unutarćelijski nivo energije. Aktivna AMPK fosforiliše proteine tuberozne skleroze 1 i 2 (TSC1/2, engl. *tuberous sclerosis protein 1/2*) koji postaju aktivni, formiraju kompleks i inhibiraju signalnu kaskadu MTORC1 čime se pokreće autofagija. AMPK može imati i direktno inhibitorno dejstvo na MTORC1, a može i aktivirati ULK1/2, što dovodi do istog efekta [142,143]. Još jedan od načina aktivacije autofagije je stres endoplazmatičnog retikuluma što dovodi do povećanja koncentracije kalcijuma u citosolu. To aktivira kinazu 2 kalcijum/kalmodulin zavisne kinaze (CAMKK2, engl. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2*). Ona zatim fosforiliše i aktivira AMPK čime se dalje prenosi signal za aktivaciju autofagije [144].

Kao i u zdravim, tako i u tumorskim, tj. maligno izmenjenim ćelijama autofagija može imati citoprotektivnu ali i citotoksičnu ulogu. Poznato je da se autofagija može pokrenuti u tumorskom tkivu kao odgovor na manjak nutrijenata ili smanjenog dejstva faktora rasta. U tim okolnostima, autofagija može blokirati apoptozu koja bi se inače pokrenula, obezbeđivanjem neophodne energije [145,146]. Takođe, u slučajevima hemio- i radio- terapije, autofagija se može pokrenuti kao protektivni mehanizam koji posreduje u rezistenciji na ove vidove terapije [147]. Stoga farmakološki inhibitori autofagije potencijalno mogu da nađu mesto u terapiji malignih bolesti [148]. Sa druge strane, bazalni nivoi autofagije u nekim tumorima su niži u odnosu na maligno neizmenjeno tkivo. Tako uvođenje gena za BECN1 u ćelije tumora dojke koje inače imaju nizak nivo ovog proteina dovodi do značajnog smanjenja rasta tumora u prekliničkim okolnostima [149].

Kompleksnost samog procesa autofagije, njene regulacije, dualne prirode, ali i složenih veza sa drugim tipovima ćelijske smrti, nameću potrebu za detaljnim razumevanjem ovog procesa u kontekstu ispitivanja novih agenasa u terapiji malignih bolesti.

1.3.3. Nekroza/nekroptoza

Ćelijska smrt po tipu nekroptoze se najbolje može definisati morfološki - karakterišu je ćelijski edem, disfunkcija sa edemom i ruputurama mitohondrija, narušavanje integriteta ćelijske membrane i liza ćelije uz rasipanje ćelijskog sadržaja u vanćelijski matriks. Kao posledica toga dolazi do aktivacije imunskog sistema i nastanka inflamatorne reakcije [150]. Iako je dugo smatrana u potpunosti nereguliranim fenomenom, danas su poznati molekularni događaji koji kontrolišu ovaj tip ćelijske smrti [151].

Molekularni mehanizam pokretanja nekroptoze uključuje receptore smrti. Kao što je ranije navedeno, aktivacija ovih receptora uobičajeno vodi u signalnu kaskadu spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze (odjeljak 1.3.1). Međutim, pod određenim okolnostima, i kada je apoptoza blokirana, signalni put se usmerava u nekroptozu, a neophodna komponenta tog put je aktivacija proteina 1 koji interreaguje sa receptorom (RIP1, engl. *receptor-interacting protein 1*), koji je po funkciji kinaza [152]. Najbolje je objašnjen mehanizam pokretanja nekroptoze u slučaju aktivacije TNF receptora. Po njegovoj aktivaciji formira se kompleks koji sadrži FADD i kaspazu 8 (kao u slučaju DISC kompleksa), ali i RIP1 kinazu [153]. U ovom slučaju kaspaza 8 je neaktivna, a RIP1 kinaza aktivna zahvaljujući dejstvu proteina cilindromatoza (CYLD, engl. *cylindromatosis*) koji vrši deubikvitinaciju RIP1 kinaze i time je čini aktivnom [154]. Aktivacija RIP1 kinaze dovodi do regrutacije proteina 3 koji interreaguje sa receptorom (RIP3, engl. *receptor-interacting protein 3*) u kompleks. RIP3 kinaza zatim biva fosforilisana od strane RIP1, čime postaje aktivna i dolazi do njene dimerizacije [155]. Zatim se celom kompleksu pridružuje pseudokinaza mešovitog porekla nalik kinaznom domenu (MLKL, engl. *mixed-lineage kinase domain-like pseudokinase*) koja je do sada poslednji opisani član nekroptotičnog puta ćelijske smrti [156]. Ova struktura koja se sastoji iz FADD, kaspaze 8, RIP1, RIP3 i MLKL se

naziva nekroptozom. Aktivacija fosforilacijom MLKL od strane RIP3 kinaze dovodi do njene oligomerizacije i translokacije do ćelijske membrane, što je praćeno njenom permeabilizacijom [157]. Nije u potpunosti jasno da li aktivnost MLKL na ćelijskoj membrani specifično dovodi do ulaska natrijuma i kalcijuma u ćeliju, ili je to posledica formiranja neselektivnih pora, ali je sigurno da influks kalcijuma dalje posreduje u nekroptozu [158,159]. Pored ćelijske membrane, permeabilizacija unutarćelijskih membrana - endoplazmatskog retikuluma, mitohondrija, lizozoma - takođe je posredovana aktivnošću MLKL [160].

Značajna osobina nekroptoze je i proinflamatorna priroda ovog procesa. Oštećenje ćelijske membrane dovodi do izlaska molekula koji se nazivaju molekularni obrasci povezani sa oštećenjem (DAMP, engl. *damage-associated molecular pattern*) iz ćelije u vanćelijski prostor. To su jedinjenja koja u živim ćelijama nemaju proinflamatorne osobine, ali kada su oslobođena ili sekretovana iz ćelije, ili se nalaze na ćelijskoj membrani, ona stižu imunomodulatorne funkcije. Prepoznavanje ovih molekula od strane antigen-prezentujućih ćelija će dovesti do njihove aktivacije i sledstvenog pokretanja imunskog odgovora [161].

Pored direktnog nekroptotičnog puta, aktivacija TNF receptora dovodi do povećanja produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, koji oštećenjem DNK aktiviraju enzim poli-ADP-ribozo-polimeraza 1 (PARP1, engl. *poly(ADP-ribose) polymerase 1*). Ovaj enzim je uključen u popravku DNK, održavanje stabilnosti DNK i kontrolu translacije. Aktivnost PARP1 troši veliku količinu ATP-a, što ubrzava proces nekroptotične smrti [88]. Spomenuto povećanje koncentracije kalcijuma specifično u mitohondrijama dovodi do povećanog stvaranja ROS na nivou unutrašnje mitohondrijalne membrane. Takođe, visok nivo kalcijuma aktivira azot monoksid (NO) sintazu, a nastali NO inhibira IV kompleks respiratornog lanca što sa jedne strane smanjuje stvaranje ATP-a, a sa druge povećava produkciju ROS na nivou III kompleksa [151], što sve zajedno ubrzava umiranje ćelije.

U kontekstu malignih bolesti, brojne su studije koje su pokazale da nekroptoza suprimira inicijaciju i progresiju tumora kao i da može imati ulogu u terapiji. Sa druge strane, sve je više dokaza koji ukazuju na to da nekroptoza može imati ulogu i u progresiji maligne bolesti, odnosno da može pokazivati dualno dejstvo [162]. Veliki je broj humanih tumorskih ćelijskih linija i humanih tumora u kojima je

utvrđeno da postoje defekti u prenosu signala koji dovodi do nekroptoze, uključujući ćelijske linije malignog melanoma. Smanjena ekspresija RIPK3 i MLKL u nekim tumorima čoveka se dovodi u vezu sa lošijom prognozom pacijenata. Stoga bi modulacija i aktivacija ovih signalnih puteva potencijalno mogla da bude od koristi u terapiji. Smatra se i da indukcija nekroptoze i posledična aktivacija imunskog sistema dovodi do stvaranja tumor-specifičnog imuniteta koji će biti usmeren samo na tumorski izmenjene ćelije i na taj način pomoći u terapiji tumora [161]. Međutim, pokretanje imunskog odgovora je istovremeno proinflamatorni proces koji može da obezbedi mikrosredinu koja olakšava rast, širenje i progresiju tumora. U posebno agresivnom duktalnom karcinomu pankreasa je ekspresija RIPK3 i MLKL značajno povećana, a na različitim ćelijskim tumorskim linijama i mišjim modelima malignih bolesti je pokazano da nishodna regulacija nekroptotskog signalnog puta smanjuje tumorigeni potencijal ćelija, odnosno rast samog tumora [163,164]. Tek nedavno su se u literaturi pojavili podaci koju ukazuju da nekroptoza može imati ulogu i u nastanku udaljenih metastaza. Naime, pretpostavlja se da tumorske ćelije mogu pokrenuti nekroptoza u endotelnim ćelijama krvnih sudova što otvara put ekstravazacije tumorskih ćelija i njihovo metastaziranje. Dodatno, oslobađanjem DAMP i pokretanjem imunskog odgovora povećava se propustljivost endotelne barijere i time pojačava ovaj proces [165]. Uzimajući u obzir kontradiktorne literaturne podatke o ulozi nekroptoze u rastu, progresiji i metastaziranju tumora, potrebna su nova istraživanja kako bi se razumela uloga ovog procesa u složenom mehanizmu nastanka i progresije malignih bolesti.

1.3.4. Međusobna povezanost mehanizama ćelijske smrti

Uprkos velikom napretku u klasifikaciji tipova ćelijske smrti i poznavanju morfoloških karakteristika, uključenih signalnih molekula i tipa stimulusa koji ih pokreću, ćelijska smrt *in vivo* je najčešće posledica kompleksnih međusobnih veza i apoptoze i nekroptoze i autofagije. Svaki od ovih tipova ćelijske smrti se može javiti potpuno nezavisno od ostalih, ali je moguće da se u jednom trenutku pokrenu sva tri. Pojedinačan stimulus može aktivirati samo jedan proces, ali taj isti stimulus u drugačijim okolnostima može dovesti do kombinovanog efekta svih tipova ćelijske

smrti. U određenim okolnostima, jedan od ovih puteva će biti dominantan u odnosu na ostala dva, koja će se aktivirati ako prvi bude inhibiran [100]. Ovo je dodatno komplikovano dualnom prirodom autofagije, ali i nekroptoze u slučaju tumorski izmenjenih ćelija.

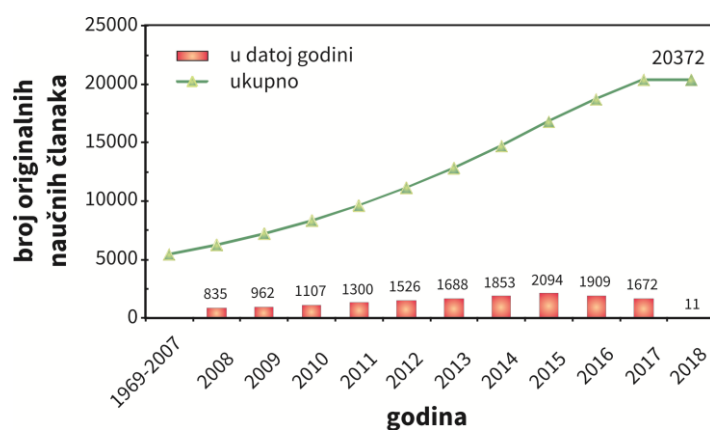
Smatra se da energetska nivo ćelije ima opredeljujuću ulogu u određivanju dominantnog puta ćelijske smrti. Naime, apoptoza je energetska zahtevan proces u kome aktivacija kaspaza i formiranje apoptozoma zavise od raspoloživosti ATP-a. Stoga u uslovima smanjenja količine ATP-a u ćeliji dolazi do nemogućnosti odvijanja apoptoze i sledstvene aktivacije nekroptoze. Sa druge strane, smanjenje ATP-a u ćeliji je glavni pokretač autofagije koja obnavlja energetske rezerve pa time može inhibirati nekroptozu. A pokazano je i da se autofagija i nekroptoza mogu paralelno odigravati u ćeliji, i to oba procesa kao modaliteti ćelijske smrti. Ukoliko govorimo o vezi apoptoze i autofagije, autofagija može biti citoprotektivni odgovor na apoptozu, a može i olakšati pokretanje apoptoze ili se aktivirati paralelno sa apoptozom i pomoći u izvršavanju mehanizma smrti ćelije [88].

Kompleksnost i raznovrsnost mehanizama ćelijske smrti, njihovo preplitanje ali i antagonizam, kao i raznovrsnost ćelijskog odgovora na različite hemioterapeutike, ukazuju na potrebu da se svaki novi potencijalno citotoksični agens detaljno ispita u definisanim eksperimentalnim uslovima a u cilju veće prediktivne vrednosti dobijenih rezultata u narednim fazama pretkliničkih i kliničkih istraživanja.

1.4. Nova antitumorska jedinjenja koja sadrže etilendiaminsku grupu

Sinteza i karakterizacija novih jedinjenja koja bi potencijalno mogla imati antitumorsku aktivnost je u stalnom porastu od 70-tih godina prošlog veka i uvođenja prvih hemioterapeutika u lečenje uznapredovalih stadijuma malignih bolesti. Pretragom MEDLINE baze podataka (engl. *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*) koja je slobodno dostupna putem pretraživača *PubMed* (www.pubmed.com), u međunarodnim naučnim časopisima je objavljeno više od dvadeset hiljada originalnih naučnih članaka koji su se bavili temom novih jedinjenja, od čega čak tri četvrtine u prethodnih deset godina (Grafik 1).

Među ovim jedinjenjima najviše su zastupljene različite vrste organometalnih kompleksa, koji u svom sastavu sadrže neki od teških metala - najčešće platinu (Pt), ali i paladijum, rutenijum, vanadijum, zlato, bakar i druge metale [166–168]. Jedna od grupa ovih organometalnih kompleksa za koje je pokazano da mogu imati antitumorsko dejstvo je i grupa Pt(II) i Pt(IV) kompleksa čiji je organski deo cikloheksil derivat etilendiamin diacetatne ili dipropionske kiseline ili neki od estara (metil-, etil-, propil- i butil-) ovih kiselina. Antitumorska aktivnost ovih kompleksa, ali i organskog dela, tj. liganda, ispitana je na različitim humanim i mišjim tumorskim ćelijskim linijama, kao i na tumorski neizmenjenim ćelijama [169–175].



Grafik 1. Broj originalnih naučnih članaka koji prijavljuju nova jedinjenja sa antitumorskim dejstvom. Grafikon prikazuje broj originalnih naučnih radova u poslednjih 10 godina (predstavljeno stubićima) i ukupan kumulativan broj od 1969. godine do danas (predstavljeno linijom) koji se bave novim jedinjenjima sa antitumorskim dejstvom prema *PubMed* bazi podataka. Pretraga je izvršena na dan 27. novembar 2017. godine, prema ključnim rečima: novi (engl. *novel*) i antitumorski (engl. *antitumor*) uz isključivanje preglednih radova (engl. *review*).

Kao posebno interesantno jedinjenje se izdvojio etil ester cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline (EE), tj. *O,O*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid. Naime, ovo organsko jedinjenje koje je sintetisano u cilju kompleksiranja sa Pt je u odsustvu metala pokazalo značajnu citotoksičnu aktivnost. EE indukuje apoptozu u ćelijama humane promijelocitne leukemije koja je nezavisna od kaspaza, posredovana aktivnošću AIF-a i pokrenuta

depolarizacijom mitohondrijalne membrane [176]. Takođe, dokazano je da ovo jedinjenje pokazuje citotoksično dejstvo na ćelijske linije humanog i pacovskog glioma, mišjeg fibrosarkoma i mišjeg melanoma, ali molekularni mehanizam delovanja nije ispitivan. U sastavu Pt(IV) kompleksa, EE uzrokuje masivnu vakuolizaciju citoplazme i ćelijsku smrt nalik nekrozi na humanom gliomu [177], kao i nekrozu u slučaju humane promijelocitne leukemijske ćelijske linije [178].

Ova saznanja su ukazala na potrebu za daljim ispitivanjem antitumorskog potencijala EE i to za utvrđivanjem i preciziranjem njegovog molekularnog mehanizma delovanja kao antimelanomskog agensa *in vitro* i ispitivanjem njegove antimelanomske efikasnosti *in vivo*.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uzimajući u obzir potrebu za pronalaženjem novih lekova koji bi bili uspešni u lečenju malignog melanoma čija su incidenca i mortalitet u stalnom porastu, i do sada pokazano citotoksično dejstvo etil estra cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline (EE) na drugim tumorskim ćelijskim linijama, svrha ovog istraživanja je bilo ispitivanje citotoksičnog potencijala EE na melanomskim ćelijama miša u kulturi, kao i njegovo dejstvo na rast melanoma *in vivo*.

U skladu sa tim, postavljeni su sledeći pojedinačni ciljevi ovog rada:

1. Ispitati citotoksičan efekat EE na B16 ćelijama melanoma miša
2. Ispitati tip ćelijske smrti i molekularne mehanizme citotoksičnog dejstva koji pokreće EE u B16 ćelijama melanoma miša
3. Ispitati antitumorsko dejstvo EE na animalnom modelu supkutanog i metastatskog melanoma miša

3. MATERIJAL I METODE

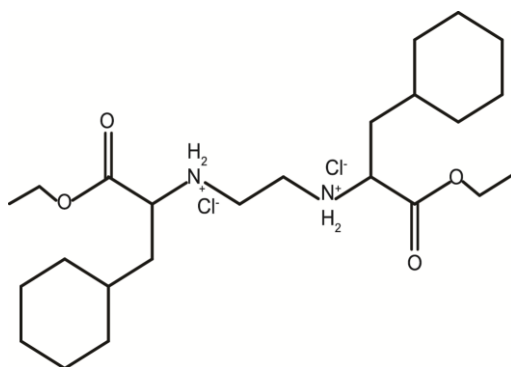
3.1. Hemikalije, reagensi i oprema

Hemikalije, reagensi i njihovi proizvođači koji su korišćeni u izradi ovog rada su dati u prilogu (Prilog II).

Potrebni aparati, uređaji i potrošna oprema koja je korišćena u izradi ovog rada su navedeni u prilogu (Prilog III).

3.2. Etil ester cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline (EE)

Etil ester cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline (EE) je sintetisan i okarakterisan od strane istraživača sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. EE u suvoj supstanci je rastvaran u dimetilsulfoksidu (DMSO) u skladu sa utvrđenom rastvoriljivošću i na taj način je dobijen osnovni rastvor EE čija je koncentracija 10 mM. Radni rastvori EE koji su korišćeni u eksperimentima su dobijani razblaženjem osnovnog rastvora u odgovarajućem medijumu za ćelijske kulture. Struktura EE je prikazana na shemi (Shema 6). Svi izvedeni eksperimenti na ćelijskim kulturama su pored negativne kontrole (netretirane ćelije) obavezno imali i kontrolu rastvarača (najveća koncentracija DMSO korišćena u eksperimentima). Kako nije utvrđena razlika između ove dve kontrole u rezultatima je prikazana samo negativna kontrola, radi jasnije prezentacije.



Shema 6. Hemijska struktura EE

3.3. Čelijske linije

Komercijalna linija mišjeg melanoma B16 i čelijska linija mišjih makrofaga RAW264.7 su nabavljene od Evropske kolekcije čelijskih kultura (*European Collection of Animal Cell Cultures*, Ujedinjeno Kraljevstvo). Čelijska linija humanog melanoma 518A2 je dobijena od dr Danijele Maksimović-Ivanić sa Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu. Humani imortalizovani keratinociti HaCaT su nabavljeni zahvaljući dr Milici Pešić sa Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu. Humani plućni fibroblasti MRC-5 su dobijeni ljubaznošću prof. dr Ivanke Zelen sa Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu.

Sve eksperimentalne procedure na živim ćelijama su izvođene u biološki sigurnom kabinetu sa laminarnim protokom vazduha (engl. *laminar flow cabinet*), nivo bezbednosti 2, poštujući pravila sterilnog rada sa kulturama i pravila lične zaštite u laboratorijskom radu. Čelije su gajene u standarnim laboratorijskim uslovima, u inkubatoru na 37 °C sa vlažnom atmosferom i 5 % CO₂. Hranljivi medijum u kom su gajene melanomske čelijske linije je RPMI 1640 puferovan HEPES-om, sa dodatkom 5 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum* - FBS), 2 mM glutamina, 10 mM natrijum-piruvata i 1 % rastvora antibiotik/antimikotik (A/A). Čelijska linija RAW264.7 je gajena u DMEM medijumu za čelijske kulture sa dodatkom 10 % FBS i 1 % A/A, HaCaT ćelije su gajene u DMEM medijumu sa dodatkom 10 % FBS, 4,5 g/L glukoze, 2 mM glutamina i 1 % A/A, dok su MRC-5 ćelije rasle u MEM medijumu sa dodatkom 10 % FBS i 1 % A/A. Hranljivi medijumi i svi ostali rastvori koji dolaze u kontakt sa ćelijama su pre korišćenja zagrejani na 37 °C, kako bi se izbegao stresni efekat niske temperature rastvora na žive ćelije.

3.3.1. Odmrzavanje, gajenje, pasažiranje i zamrzavanje ćelija

Čelijske linije su čuvane zamrznute u tečnom azotu. Odmrzavanje ćelija je vršeno prema standarnom protokolu. Mikro-epruveta koja služi za zamrzavanje ćelija (engl. *crio-vial*) koja sadrži ćelije u rastvoru za zamrzavanje se uzme iz tečnog azota i zatim u toku par minuta stavi u vodeno kupatilo na 37 °C. Sadržaj mikro-

epruvete se potom prenese u epruvetu sa prethodno zagrejanim kompletnim medijumom u zapremini 9 puta većoj od zapremine ćelijske suspenzije koja se odmrzava. Ćelije se zatim centrifugiraju 5 minuta na 500 g na sobnoj temperaturi, supernatant aspirira pomoću vakuum pumpe ili odlije, a ćelijski pelet resuspenduje u svežem medijumu i konačno ćelijska suspenzija prenese u posudu za uzgajanje ćelija (Petri šolja ili flask).

Ćelije nisu korišćene za eksperimente u prvih 7 dana od odmrzavanja u cilju postizanja njihovog prilagođavanja na život i rast u kulturi i oporavka od stresa izazvanog odmrzavanjem. Jednom odmrznuta ćelijska linija je u kontinuitetu korišćena najduže 3 meseca, jer se smatra da u dužem vremenskom periodu kontinuirano u kulturi ćelije menjaju svoje genotipske i fenotipske osobine. Rast ćelijskih linija je obezbeđivan redovnim menjanjem hranljivog medijuma 2-3 puta nedeljno, odnosno pasažiranjem (presejavanjem) ćelija 1-2 puta nedeljno u razmeri 1:3 do 1:10 u zavisnosti od tipa ćelije, a prema preporuci proizvođača.

Pasažiranje ćelija, tj. njihovo odlepljivanje od podloge i ponovno zasejavanje, neophodno je u cilju njihovog održavanja u logaritamskoj fazi rasta. Neposredno nakon postavljanja u posudu za uzgoj ćelija, rast ćelija je usporen (engl. *lag phase*), da bi zatim počele da se umožavaju eksponencijalno. Ukoliko ćelije ispune površinu suda u kome rastu - postignu potpunu konfluentnost, ili dođe do potrošnje hranljivih materija iz medijuma, rast ćelija će dostići plato i one će ubrzo početi da umiru. Sve ćelije su pasažirane konvencionalnom procedurom tripsinizacije korišćenjem rastvora 0,25 % (w/v) tripsin - 0,53 mM etilendiamin tetrasirćetna kiselina (EDTA) [179]. Po postizanju odgovarajuće gustine u posudi u kojoj se ćelije uzgajaju, medijum se aspirira, i na ćelijski monosloj naspe pomenuti rastvor tripsina, u zapremini dovoljnoj da pokrije dno posude. Posuda se zatim stavi u inkubator na 3-5 minuta kako bi se obezbedila odgovarajuća temperatura za maksimalno dejstvo tripsina. Pod mikroskopom se zatim proveriti da li su se ćelije odlepile (uočavaju se kao okrugle), i zatim se u posudu sa ćelijama dodaje kompletni medijum u zapremini tri puta većoj u odnosu na zapreminu dodatog tripsina. Ceo sadržaj se prenese u epruvetu, centrifugira 5 minuta na 500 g na sobnoj temperaturi, supernatant odlije, a ćelijski pelet resuspenduje u svežem medijumu.

Za potrebe održavanja kulture i izvođenja eksperimenata, ćelije su zasejavane u različitom broju u odgovarajuće plastične sudove za rad sa adherentnim ćelijskim kulturama, a eksperimenti izvođeni 24 sata nakon zasejavanja. Ćelijske linije RAW264.7 (15×10^3), A518 (3×10^3), MRC-5 (8×10^3) i HaCaT (5×10^3) su za sve eksperimente zasejavane isključivo u mikrotitarske ploče sa 96 bunara, i to u broju navedenom u zagradi u 100 μ L zapremine po jednom bunaru. Pregled broja ćelija B16 mišjeg melanoma koji je korišćen u eksperimentima je dat u tabeli (Tabela 1).

Tabela 1. Broj ćelija, radna zapremina medijuma i posude za gajenje B16 ćelija

Posuda za gajenje ćelija	Broj ćelija	Radna zapremina medijuma	Eksperimentalna metoda
Petri šolja (100 mm)	$1,5 \times 10^6$	10 mL	Održavanje kulture
Petri šolja (60 mm)	6×10^5	5 mL	Imunoblot Elektronska mikroskopija
Mikrotitarska ploča sa 6 bunara	2×10^5	2 mL (po bunaru)	Protočna citometrija Fluorescentna mikroskopija <i>Scratch</i> esej Broj živih/mrtvih ćelija
Mikrotitarska ploča sa 96 bunara	1×10^4	200 μ L (po bunaru)	Testovi vijabiliteta

U cilju dugotrajnog čuvanja ćelija, one se zamrzavaju pomoću rastvora koji sadrži FBS i DMSO. Nakon uobičajenog procesa odlepljivanja ćelija od podloge, centrifugiranja i odlivanja supernatanta, ćelije se resuspenduju u pomenutom rastvoru tako da finalna koncentracija DMSO bude 10 %, u zapremini koja odgovara željenoj gustini. Ovakva suspenzija se zatim razlije u mikro-epruvete za zamrzavanje, 24 h ostavi na -80 °C, a zatim se u tečnom azotu može čuvati više godina.

3.3.2. Brojanje ćelija

Utvrđivanje broja ćelija je vršeno pomoću supravitalne boje tripan plavo (TB) [180] pri svakom pasažiranju ćelija i postavljanju eksperimenata. Ćelijska suspenzija se pomeša sa rastvorom tripan plavog u fiziološkom rastvoru sa dodatkom fosfata (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) (0,4 % v/v), sipa u hemocitometar po *Neubauer*-u i posmatra pod svetlosnim mikroskopom. Svetle, prozračne ćelije su žive, dok su mrtve ćelije tamno plave boje. Ćelije su korišćene za eksperimente ukoliko broj mrtvih ćelija nije prelazio 5 %.

3.4. Testovi vijabiliteta

Za ispitivanje uticaja EE na vijabilitet, ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunara. Nakon adheriranja ćelija za podlogu preko noći, tretirane su u triplikatu ili šestplikatu različitim koncentracijama EE, a zatim su izvođeni testovi vijabiliteta zasnovani na principima spektrofotometrije kojima se mere aktivnosti kisele fosfataze i mitohondrijalnih dehidrogenaza i određuje broj živih, adheriranih ćelija. Vijabilitet B16 ćelija tretiranih EE-om je meren i u prisustvu inhibitora autofagije, bafilomicina A1 (BAF, 2,5 μM) i amonijum hlorida (AH, 20 mM). Rezultati svih testova vijabiliteta su predstavljeni kao procenat živih ćelija koje su tretirane u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije, čiji je vijabilitet arbitrarno postavljen na 100 %. Za svaki test vijabiliteta pomoću računarskog programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Software Inc.*, Sjedinjene Američke Države) matematički je izračunata ona koncentracija EE koja dovodi do pada vijabiliteta ćelija na 50 %, takozvana IC₅₀ vrednost. Nakon unosa podataka eksperimentalno dobijene vrednosti vijabiliteta se porede sa teorijskom dozno-zavisnom krivom u prisustvu inhibitora (engl. *dose-response - inhibitor*) čije su maksimalna i minimalna vrednost 100 %, odnosno 0 %. Svaki eksperiment je urađen u dva ili tri nezavisna ponavljanja.

Za tačno utvrđivanje broja živih/mrtvih ćelija nakon tretmana, ćelije su zasejavane u ploče sa 6 bunara, nakon inkubacije sa EE odlepljene od podloge,

ojojene TB kako je prethodno opisano (odjeljak 3.3.2) i određen je tačan broj živih i mrtvih ćelija. Eksperiment je urađen u 2 nezavisna ponavljanja u duplikatu.

3.4.1. Test aktivnosti kisele fosfataze

Princip testa aktivnosti kisele fosfataze (AcP) podrazumeva indirektnu procenu vijabilnosti ćelija na osnovnu sposobnosti unutarćelijskih kiselih fosfataza živih ćelija da hidrolizuju supstrat *p*-nitrofenilfosfat (PNPP). Ovaj test se može koristiti kao osetljiv pokazatelj ćelijske proliferacije, pri čemu je aktivnost enzima direktno proporcionalna broju živih ćelija [181].

Nakon tretmana, iz bunara se odlije medijum, u bunare sa ćelijama se doda 100 µL supstrata (15 mM PNPP, 0,1 % Triton X-100 u 0,1 M natrijum-acetatatu) i ćelije se inkubiraju na 37 °C u toku 1,5 časa. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 50 µL 1 M natrijum hidroksida, a intenzitet žute boje nastalog proizvoda reakcije se očitava na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče sa 96 bunara na talasnoj dužini od 405 nm.

3.4.2. MTT test

Princip MTT testa se zasniva na sposobnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza metabolički aktivnih ćelija da hidrolizuju supstrat 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT), pri čemu nastaje nerastvorni formazan u količini koja je direktno proporcionalna broju ćelija. Kristali formazana se zatim rastvaraju u DMSO, intenzitet nastale ljubičaste boje odgovara broju živih ćelija, i to u širokom opsegu. Stoga se merenje enzimske aktivnosti ovim testom može koristiti kao indirektni pokazatelj ćelijskog vijabiliteta [182].

Nakon tretmana, iz bunara se odlije medijum i zatim doda 50 µL supstrata (0,5 mg MTT / mL medijuma). Po isteku inkubacije od 3 sata na 37 °C, supernatanti se odliju, a nastali formazan se rastvara dodavanjem 50 µL DMSO. Intenzitet nastale ljubičaste boje se očitava na talasnoj dužini od 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče.

3.4.3. SRB test

Princip sulforodamin B (SRB) testa podrazumeva direktnu procenu broja ćelija na osnovu sposobnosti ove boje da se veže za proteinske komponente ćelija koje su fiksirane za podlogu trihlorsirćetnom kiselinom. SRB je ružičasta aminoksantenska boja koja sadrži dve sulfonilne grupe koje vezuju bazne aminokiselinske rezidue u blago kiseloj sredini, dok u baznoj sredini dolazi do odvajanja boje od proteina. Kako je vezivanje SRB stoihiometrijsko, količina boje koja se oslobodi iz obojenih ćelija je direktno proporcionalna masi ćelija [183].

Po isteku tretmana, ćelije se fiksiraju dodatkom 50 μ L 50 % trihlorsirćetne kiseline po bunaru u kom se već nalazi zapemina od 200 μ L, u toku 60 minuta na 4 °C. Ploče se zatim isperu destilovanom vodom, i nakon sušenja se dodaje 50 μ L rastvora SRB (0,4 % SRB u 1 % sirćetnoj kiselini) u svaki bunarić. Nakon inkubacije od 40 minuta na sobnoj temperaturi, višak boje se odstrani ispiranjem ploče u 1 % sirćetnoj kiselini. Ploče se osuše, i boja vezana za ćelijske proteine rastvori dodavanjem 100 μ L 10 mM Tris-baze u svaki bunar. Intenzitet nastale ljubičaste boje se očitava na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče na talasnoj dužini od 570 nm.

3.5. Test ispitivanja integriteta ćelijskih membrana - LDH test

Test aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u supernatantu ćelijske kulture je kolorimetrijski test koji se zasniva na merenju aktivnosti ovog unutarćelijskog enzima, pri čemu enzim u slučaju narušavanja integriteta ćelijske membrane izlazi iz ćelija i njegova aktivnost u supernatantu je direktno proporcionalna broju ćelija za koje se može smatrati da su u nekrozi. Princip metode podrazumeva dve uzastopne oksido-redukcije. U prvom koraku LDH oksiduje laktat u piruvat pri čemu se nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) redukuje u $\text{NADH}+\text{H}^+$. U drugom koraku reakcije elektroni sa $\text{NADH}+\text{H}^+$ se prenose na *p*-jodo-nitrotetrazolijum hlorid pod dejstvom fenazin metosulfata kao katalizatora, nastaje redukovani formazan i dolazi do promene boje rastvora iz žute u crvenu [184].

U 100 μ L supernatanta ćelijske kulture se dodaje 100 μ L supstrata (54 mM L-laktat, 0,28 mM fenazin metosulfat, 0,66 mM *p*-jodo-nitrotetrazolijum hlorid i 1,3 mM NAD⁺ u 0,2 M Tris-puferu pH 8,2). Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi apsorbancu se očitava na talasnoj dužini od 530 nm sa referentnom talasnom dužinom od 650 nm, na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Za ovaj test je pored negativne kontrole (netretirane ćelije) potrebno imati i pozitivnu kontrolu (100 % mrtve ćelije). Ćelije se liziraju dodatkom nejonskog deterdženta Triton X-100 (3 %). Rezultati su predstavljeni kao procenat citotoksičnosti i izračunati po formuli:

$$\% C = \frac{T - NK}{PK - NK} \times 100$$

C - citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

T - apsorbancu tretiranih ćelija

NK - negativna kontrola, apsorbancu netretiranih ćelija

PK - pozitivna kontrola, apsorbancu mrtvih ćelija liziranih pomoću Triton X-100

3.6. Ispitivanje tipa ćelijske smrti i oksidativnog stresa metodom protočne citofluorimetrije

U cilju ispitivanja mehanizma kojim EE ostvaruje citotoksično dejstvo, ćelije su nakon bojenja odgovarajućim fluorohromima analizirane na protočnom citofluorimetru (citometru). Svaka analiza je podrazumevala detekciju 10 000 događaja, tj. ćelija, pri čemu je ponavljana u duplikatu ili triplikatu. Za detekciju i obradu rezultata korišćen je kompjuterski program *BD CellQuest Pro* (BD Biosciences, Nemačka).

3.6.1. Ispitivanje fragmentacije DNK

Analiza ćelijskog sadržaja DNK je izvedena korišćenjem fluorohroma propidijum jodida (PI) koji ima sposobnost vezivanja za DNK i RNK, a koji fluorescira crveno (FL2 kanal protočnog citometra). Po degradaciji RNK u ćelijama količina vezane boje odgovara sadržaju DNK, pa se na taj način mogu razlikovati ćelije u različitim

fazama ćelijskog ciklusa kao i one koje sadrže hipodiploidnu količinu DNK, tj. fragmentisanu DNK, što se smatra karakterističnim za apoptozu [185].

Po isteku tretmana, supernatant ćelijske kulture se prikupi u epruvete za protočnu citofluorimetriju a ćelije tripsiniziraju i zatim skupe u iste epruvete. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 500 g, supernatant se odlije, a ćelije operu dodatkom 1 mL PBS-a, promešaju na vorteksu i ponovo centrifugiraju na isti način. Nakon još jednog pranja, ćelije se fiksiraju u 1 mL hladnog 70 % etanola (rastvor u PBS-u) dodavanjem kap po kap uz mešanje na vorteksu. Nakon inkubacije od najmanje 4 sata na 4 °C, pristupa se bojenju ćelija. Ćelije se najpre centrifugiraju 5 minuta na 800 g, supernatant se odlije i doda se 1 mL PBS-a. Nakon mešanja na vorteksu, centrifugiranja 5 minuta na 800 g i odlivanja supernatanta, u svaku epruvetu za protočnu citometriju se dodaje 300 µL rastvora PBS-a koji sadrži ribonukleazu (RNAza, 100 µg/mL) i 0,1 % Triton X-100, čime se obezbeđuje ulazak enzima za razgradnju RNK u ćelije i njena degradacija, i ćelije inkubiraju 15 minuta na 37 °C. Zatim se u svaku epruvetu dodaje PI (finalna koncentracija 50 µg/mL), i ćelije analiziraju na protočnom citometru. Tipični antitumorski lek cisplatin (CDDP) je korišćen kao pozitivna kontrola za apoptotske promene u koncentraciji od 75 µM. Ćelije sa hipodiploidnim sadržajem, tj. fragmentisanom DNK su one koje se na histogramskom zapisu distribucije intenziteta fluorescencije PI nalaze u SubG₀ segmentu, tj. prethode G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa. Rezultati su predstavljeni korišćenjem histograma distribucije intenziteta fluorescencije porekla PI i izraženi kao procenat ćelija u SubG₀ fazi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

3.6.2. Ispitivanje eksternalizacije fosfatidil serina

Fosfatidil serin (PS) je fosfolipid ćelijske membrane koji se normalno nalazi u unutrašnjem sloju membranskog dvosloja, a u uslovima pokretanja apoptoze dolazi do njegove eksternalizacije. *Annexin V* obeležen fluorescein izotiocijanatom (FITC) ima sposobnost vezivanja za fosfatidil serin i emituje zelenu fluorescenciju (FL1 kanal protočnog citometra). PI koji ima sposobnost vezivanja za DNK i emituje crvenu fluorescenciju (FL2 kanal protočnog citometra) je vitalna boja koja ne prolazi intaktnu ćelijsku i jedarnu membranu [186]. Dvostrukim bojenjem *Annexin V-*

FITC/PI se stoga dobija podatak o tome da li su ćelije žive, da li je u njima došlo do eksternalizacije PS i da li je integritet njihove plazma membrane očuvan (Tabela 2). Kao pozitivna kontrola, korišćen je CDDP u koncentraciji od 75 μ M.

Nakon tretmana, u epruvete za protočnu citometriju se skupi medijum u kom su ćelije bile, zatim se ćelije tripsiniziraju i prebace u iste epruvete. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 500 g, supernatant se prospe, ćelije resuspenduju u 1 mL PBS-a, promešaju na vorteksu i ponovo centrifugiraju na isti način. Nakon odlivanja supernatanta, pristupa se bojenju ćelija po uputstvu proizvođača. Ukratko, ćelije se resuspenduju u 100 μ L razblaženog aneksin-vezujućeg pufera (razblaženje 1:10 u destilovanoj vodi) kome je dodato 10 μ L PI (1 mg/mL) i 0,2 μ L *Annexin V-FITC*. Inkubacija je 30 minuta na 37 °C, nakon koje se u svaku epruvetu doda 400 μ L razblaženog pufera, i ćelije analiziraju na protočnom citometru. Rezultati su predstavljeni tačkastim dijagramom kao procenat odgovarajućih ćelijskih populacija u ukupnom broju analiziranih ćelija.

Tabela 2. Analiza dvostrukog bojenja *Annexin V-FITC/PI* za utvrđivanje prisustva apoptoze/nekroze u ćelijama metodom protočne citometrije

	<i>Annexin V-FITC</i>	PI	komentar
Žive ćelije	-	-	PS nije eksternalizovan, ćelijska membrana je intaktna
Rana apoptoza	+	-	PS je eksternalizovan, ćelijska membrana je intaktna
Kasna apoptoza / nekroza	+ /-	+	Ćelijska membrana je oštećena i/ili degradirana kao posledica nekroze ili sekundarno nakon apoptoze. PS se može ali ne mora detektovati a DNK je izašla iz oštećenih ćelija

3.6.3. Ispitivanje prisustva aktivnih kaspaza

Za ispitivanje prisustva aktivnih kaspaza, ključnih enzima u procesu apoptoze, korišćen je pankaspazni inhibitor *ApoStat* konjugovan FITC-om koji fluorescira zeleno (FL1 kanal protočnog citometra). Detektovana fluorescencija odgovara prisustvu aktivnih kaspaza.

Nakon tretmana, medijum iz bunara je odliven, ćelije isprane sa 1 mL PBS-a, a zatim tripsinizirane i skupljene u epruvete za protočnu citometriju. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 500 g i odlivanja supernatanta, ćelije se oboje tačno po uputstvu proizvođača. Ukratko, u epruvetu se doda *ApoStat* (100 µL) razblažen u kompletnom medijumu (1:100), ćelije inkubiraju 30 minuta na 37 °C, zatim operu i analiziraju na protočnom citometru. Rezultati su predstavljeni kao procenat ćelija koje su vezale *ApoStat* u odnosu na ukupni broj analiziranih ćelija ili kao srednji intenzitet fluorescence svih analiziranih ćelija porekla *ApoStat*-a. Porast ovog procenta, tj. porast srednjeg intenziteta fluorescence predstavlja povećanje broja aktivnih kaspaza u ćelijama.

3.6.4. Ispitivanje prisustva aktivne kaspaze 3, 8 i 9

Za utvrđivanje prisustva aktivne inicijatorne kaspaze 8 koja odgovara spoljašnjem putu apoptoze, aktivne inicijatorne kaspaze 9 koja odgovara unutrašnjem putu apoptoze i aktivne egzekutivne kaspaze 3, korišćen je odgovarajući *CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining Kit*. Korišćeni su specifični inhibitori: za kaspazu 8 IETD-FMK, za kaspazu 9 LEHD-FMK, i za kaspazu 3, DEVD-FMK; svi konjugovani FITC-om. Bojenje ćelija je izvedeno prema uputstvu proizvođača.

Ukratko, medijum se nakon tretmana ukloni, ćelije operu u 1 mL PBS-a, a zatim tripsiniziraju, prikupe u epruvete za protočnu citometriju i centrifugiraju 5 minuta na 500 g. Odlije se supernatant, a ćelije resuspenduju u 300 µL kompletnog medijuma kome je dodat 1 µL odgovarajućeg inhibitora i inkubiraju 60 minuta na 37 °C. Zatim se ćelije centrifugiraju na 3000 obrtaja u minutu (engl. *rotations per minute*, rpm) 5 minuta, supernatant odlije i resuspenduju u 500 µL pufera za pranje (engl.

washing buffer). Još jednom se ponovi procedura centrifugiranja na isti način i ispiranja u puferu, a zatim se ćelije finalno resuspenduju u 500 μ L pufera za pranje i analiziraju na protočnom citometru. Rezultati su predstavljeni kao porast srednjeg intenziteta fluorescence porekla FITC-obeležnog specifičnog inhibitora određene kaspaze (FL1), što ukazuje na aktivaciju date kaspaze.

3.6.5. Ispitivanje prisustva kiselih vezikula u citoplazmi ćelija

Kvantifikacija kiselih vezikula u citoplazmi tretiranih ćelija je izvedena bojenjem akridin oranžom (AO). AO je supravitalna, pH senzitivna boja koja u uslovima neutralnog pH fluorescira zeleno, dok u kiseloj sredini fluorescira narandžasto, pa se stoga može koristiti za procenu prisustva vezikula kiselog sadržaja (lizozomi, fagozomi, autofagolizozomi) u ćelijama i to kao odnos narandžaste i zelene fluorescence (FL3/FL1 odnos) [187]. U cilju izazivanja autofagije kao pozitivne kontrole, ćelije su bile izložene gladovanju kao tipičnom induktoru autofagije tako što su gajene u toku 16 h u *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS).

Nakon tretmana, iz bunara sa ćelijama se ukloni medijum i ćelije se operu sa 1 mL PBS-a koji se aspirira. Zatim se ćelije tripsinizuju, prenesu u epruvete za protočnu citometriju i centrifugiraju 5 minuta na 500 *g*. Nakon odlivanja supernatanta, pranja u 1 mL PBS-a, mešanja na vorteksu i ponovnog centrifugiranja na isti način, supernatant se odlije, a u svaku epruvetu doda 300 μ L rastvora AO (razblaženje 1:100 u kompletnom medijumu). Po isteku inkubacije od 30 minuta na 37 °C, ćelije se centrifugiraju 5 minuta na 500 *g*, supernatant odlije, operu u 1 mL PBS-a (mešanje na vorteksu, centrifuga 5 minuta na 500 *g*, odlivanje supernatanta), i finalno resuspenduju u 500 μ L PBS-a nakon čega se pristupa analizi na protočnom citometru. Rezultati su predstavljeni kao odnos srednjeg intenziteta narandžaste i zelene fluorescence (FL3/FL1) pri čemu porast ovog odnosa znači povećanje broja kiselih vezikula u citoplazmi ćelija što sugeriše aktivaciju autofagije.

3.6.6. Ispitivanje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala

Radi ispitivanja produkcije slobodnih kiseoničnih radikala tretirane ćelije su bojene neselektivnom redoks-senzitivnom bojom dihidrorodamin (DHR) i bojom koja je specifična za superoksid anjon radikal, dihidroetidijumom (DHE). Kao pozitivna kontrola, tj. jedinjenje koje indukuje povećanu produkciju slobodnih kiseoničnih radikala, korišćen je vodonik peroksid (H_2O_2) u koncentraciji od 75 μM [188]. Ćelije su obojene prema uputstvu proizvođača.

Ukratko, po isteku tretmana, medijum je aspiriran, bunari isprani sa 1 mL PBS-a, a zatim ćelije tripsinizirane i prikupljene u epruvete za protočnu citometriju. Nakon centrifugiranja od 5 minuta na 500 *g*, odlivanja supernatanta i pranja u 1 mL PBS-a uz mešanje na vorteksu, ćelije se ponovo centrifugiraju na isti način, a supernatanti odliju. Zatim se ćelijama doda 300 μL rastvorene boje u kompletnom medijumu (finalna koncentracija DHR je 2 μM , a DHE 20 μM), i inkubiraju 30 minuta na 37 °C. Po isteku inkubacije, ćelije se centrifugiraju (5 minuta/500 *g*), operu u 1 mL PBS-a (mešanje na vorteksu, centrifugiranje 5 minuta na 500 *g*, odlivanje supernatanta) i finalno resuspenduju u 500 μL PBS-a za analizu na protočnom citometru. Rezultati su prikazani kao histogrami distribucije fluorescence porekla DHR i DHE (zelena - FL1, odnosno crvena - FL2 fluorescencija), pri čemu povećanje intenziteta fluorescence, tj. pomeranje histogramskog zapisa u desno označava povećanje produkcije ukupnih slobodnih radikala odnosno superoksid anjon radikala.

3.6.7. Ispitivanje depolarizacije mitohondrijalne membrane

Za ispitivanje depolarizacije mitohondrijalne membrane korišćena je lipofilna katjonska boja JC-1. Ova boja ima sposobnost nakupljanja duž polarisane mitohondrijalne membrane gde emituje crvenu fluorescenciju koja se čita na FL2 kanalu protočnog citometra. Ukoliko je potencijal membrane narušen boja ne može da pristupi transmembranskom prostoru, tako da ostaje u citoplazmi gde emituje zelenu fluorescenciju (FL1 kanal citometra). Polarisanost unutrašnje mitohondrijalne membrane se stoga analizira kao odnos srednjeg intenziteta fluorescence FL1/FL2, pri čemu porast ovog odnosa ukazuje na depolarizaciju mitohondrija. Kao poznati

induktor depolarizacije mitohondrijalne membrane, tj. kao pozitivna kontrola, korišćen je karbonil cijanid 3-hlorofenilhidrazon (CCCP) u koncentraciji od 20 μM [189].

Nakon tretmana, iz bunara sa ćelijama se ukloni medijum i ćelije se operu sa 1 mL PBS-a koji se aspirira. Zatim se ćelije tripsinizuju, prebace u epruvete za protočnu citometriju i centrifugiraju 5 minuta na 500 g. Nakon odlivanja supernatanta, pranja u 1 mL PBS-a, mešanja na vorteksu i ponovnog centrifugiranja na isti način, supernatant se odlije, i pristupi se bojenju ćelija po uputstvu proizvođača. U svaku epruvetu se sipa 300 μL razblaženog pufera za JC-1 (10 puta razblaženje u destilovanoj vodi) kom je dodata boja (finalna koncentracija 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Nakon inkubacije od 30 minuta na 37 °C ćelije se centrifugiraju (5 minuta/500 g), operu u 1 mL PBS-a (mešanje na vorteksu, centrifugiranje 5 minuta na 500 g, odlivanje supernatanta) i finalno resuspenduju u 500 μL PBS-a za analizu na protočnom citometru. Rezultati su predstavljeni histogramom distribucije srednjeg intenziteta fluorescence i analizirani kao odnos intenziteta zelene i crvene (FL1/FL2), pri čemu porast ovog odnosa u odnosu na kontrolu (arbitrarno postavljen na jediničnu vrednost) znači depolarizaciju, a smanjenje odnosa hiperpolarizaciju unutrašnje mitohondrijalne membrane.

3.7. Ispitivanje prisustva kiselih vezikula i fragmentacije jedra primenom fluorescentne mikroskopije

Prisustvo kiselih vezikula u citoplazmi, tipičnih za autofagiju, utvrđeno je bojenjem ćelija AO. Metoda se izvodi dodavanjem rastvora AO direktno u medijum u bunare sa ćelijama (finalno razblaženje 1:100), inkubiranjem 30 minuta na 37 °C, nakon čega se ćelije posmatraju na fluorescentnom mikroskopu uz upotrebu plavog filtera i fotografišu. Citoplazma ćelija se vidi zeleno, a kisele vezikule narandžasto.

Promene jedra u smislu kondenzacije i fragmentacije su analizirane i fotografisane nakon bojenja ćelija PI i posmatranja pod fluorescentnim mikroskopom uz korišćenje zelenog filtera. Protokol za bojenje podrazumeva ispiranje bunara sa 1 mL PBS-a, zatim fiksiranje ćelija dodavanjem 1 mL 4 % paraformaldehida i inkubaciju 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se

bunari isperu sa 1 mL PBS-a i doda 500 μ L rastvora za bojenje: 0,1 % Triton X-100, 0,1 mM EDTA, 50 μ g/mL RNAza i 50 μ g/mL PI u PBS-u. Čelije se inkubiraju 30 minuta u mraku i zatim analiziraju.

U eksperimentima je korišćen invertni mikroskop sa faznim kontrastom koji sadrži filtere detekciju fluorescence i digitalna kamera za fotografisanje.

3.8. Ispitivanje migratorne sposobnosti ćelija - *scratch* esej

Ispitivanje sposobnosti ćelija da migriraju je vršeno takozvanim *scratch* esejem, koji se zasniva na opažanju da nakon veštački napravljenog praznog prostora (*scratch*) među ćelijama koje formiraju konfluentni sloj dolazi do kretanja ćelija sa ivice ovog prostora i postepenog popunjavanja praznine [190].

Ćelije su zasejavane u ploče sa 6 bunara i nakon postizanja potpune konfluencije napravljen je prazan prostor pomoću vrha nastavka za automatske pipete od 200 μ L. Svaki tretman je urađen u triplikatu. Kulture su slikane neposredno nakon formiranja praznog prostora i nakon 24 h pomoću kamere za mikroskop. Fotografije su zatim analizirane u programu *ImageJ*, korišćenjem dodatka *MRI_Wound_Healing_Tool* pomoću kojeg se izračuna površina postojećeg praznog prostora između ćelija. Uticaj ispitivane supstance na sposobnost ćelija da popune defekt je izražen kao procenat površine praznog prostora u odnosu na površinu defekta neposredno po nastajanju koja je izražena kao 100 %.

3.9. Ispitivanje morfologije ćelija transmisionom elektronskom mikroskopijom

Ultrastrukturne promene u ćelijama koje bi odgovarale promenama tipičnim za različite mehanizme ćelijske smrti su utvrđene analizom transmisionom elektronskom mikroskopijom.

Nakon tretmana, ćelije su tripsinizirane, prenete u odgovarajuće epruvete i centrifugirane (500 *g*, 5 minuta, 22 °C), a zatim oprane sa 1 ml PBS 2 puta (vorteksovanje, centrifugiranje na isti način, odlivanje supernatanta). Čelijski talog je zatim resuspendovan u 1 ml PBS-a i prenet u mikroeprevete i centrifugiran na

200 g 5 minuta na sobnoj temperaturi. Po odlivanju supernatanta, na ćelijski talog je sipan rastvor 2,5 % glutaraldehida u 100 mM PBS-u koji dovodi do fiksiranja ćelija. Nakon 1 h ćelije se centrifugiraju na 200 g 5 minuta na sobnoj temperaturi, a fiksativ izvuče iz epruvete pipetom. Ćelijski talog se opere u 1 ml 0,1 % kakodilatnog pufera 3 puta po 5 minuta (centrifugiranje 200 g, 5 minuta). Sledeći korak je postfiksacija u 1 % rastvoru osmijum tetroksida koji se sipa na ćelijski pelet i inkubira 1 h na 4 °C. Ćelije se ponovo ispiraju kakodilatnim puferom (3 puta po 5 minuta uz centrifugiranje na 200 g 5 minuta). Na ćelijski talog se zatim stavlja 1 ml 0,5 % vodenog rastvora uranil acetata koji služi za kontrastiranje i inkubira preko noći na 4 °C. Dehidratacija taloga se izvodi kroz seriju rastućih koncentracija etanola (50 %, 70 %, 90 %, 100 %). Prožimanje smolom se izvodi na sobnoj temperaturi, korišćenjem dve mešavine propilen oksida i EPON 812 smole (1:1, 1:3). Uzorci se zatim ukalupe u plastične kalupe i suše 24 h u sušnici na 60 °C. Nakon sušenja, uzorci se vade iz epruveta i seku na ultramikrotomu. Najpre se naprave semi-tanki isečci koji se boje toluidin plavim i tako se biraju delovi koji će biti sečeni za ultra-tanke isečke. Ultra-tanki isečci se zatim hvataju na bakarne mrežice i kontrastiraju uranil acetatom i olovo citratom. Zatim se isečci posmatraju i analiziraju transmisionim elektronskim mikroskopom (TEM).

3.10. Ispitivanje proteina ključnih za autofagiju i apoptozu u ćelijama metodom imunoblota

Analiza proteina koji su uključeni u procese apoptoze i autofagije je izvedena metodom imunoblota koji podrazumeva izolaciju unutarćelijskih proteina, elektroforetsko razdvajanje na poliakrilamidnom gelu i zatim detekciju koja je zasnovana na specifičnoj reakciji antigen-antitelo.

3.10.1. Izolacija ćelijskog sadržaja

Nakon tretmana, ćelijski sadržaj je izolovan procedurom liziranja ćelija koja se obavlja na ledu. Najpre se aspirira medijum, a ćelije zatim dva puta isperu sa 5 mL hladnog PBS-a koji se takođe aspirira. Na suv ćelijski talog se dodaje 50 µL rastvora

za liziranje (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA). Neposredno pred upotrebu, rastvoru za liziranje se dodaju inhibitori fosfataza i proteaza: 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), 10 mM NaF, 0,1 mM Na-vanadat i 10 μ l koktela inhibitora proteaza (PIC), a ćelijski lizat pomoću grebalice (engl. *scraper*) skupi u odgovarajuće epruvete. Nakon inkubacije od 30 minuta na ledu, uzorci se centrifugiraju 15 minuta na 14000 g na 4 °C. U talogu se nalaze ćelijske membrane a supernatant predstavlja rastvor ćelijskih proteina koji se prebaci u nove epruvete i zatim se odredi koncentracija proteina.

3.10.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Koncentracija proteina u uzorcima liziranih ćelija je određivana metodom po Bradfordu [191]. Metoda se zasniva na korišćenju boje *Comassie Brilliant Blue G-250* koja se vezuje za proteine u kiselj sredini i prelazi u anjonski oblik, tako da dolazi do promene boje iz crvene u plavu. Intenzitet dobijene plave boje je direktno proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku.

Standarna kriva za određivanje koncentracije proteina se dobija na osnovu apsorbanca rastvora albumina seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u Bradfordovom reagensu, koncentracija 2,5; 5; 7,5; 10; i 12,5 mg/mL. Bradfordov reagens je rastvor 0,1 mg/mL boje *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 5 % etanol, 10 % H_3PO_4 u vodi. Test se izvodi mešanjem 2 mL Bradfordovog reagens sa sa 2 μ l uzorka (1:1000 razblaženje proteina). Apsorbanca se čita na talasnoj dužini od 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče.

3.10.3. Priprema uzoraka za elektroforezu

Nakon određivanja koncentracije proteina u uzorku, izvršena je priprema uzoraka za elektroforezu koja podrazumeva denaturaciju i uniformnu negativnu naelektrisanost svih proteina u uzorku. Uzorcima se doda odgovarajuća zapremina 5x koncentrovanog redukujućeg pufera (*Laemmli*) (10 % natrijum dodecil sulfat - SDS, 50 % glicerol, 10 mM 2-merkaptoetanol, 0,01 % bromfenol plavo, 312,5 mM Tris-HCl, pH 6.8). SDS kao anjonski amfipatični deterdžent nekovalentno vezuje

proteine iz uzorka i dovodi do njihovog međusobnog razdvajanja i denaturacije, dok 2-merkaptoetanol redukuje disulfidne veze u proteinima. Glicerol se dodaje radi povećanja gustine uzoraka što obezbeđuje ravnomeriju elektroforezu, a bromfenol plavo se kao slabo negativno naelektrisano i obojeno jedinjenje koristi kao marker kretanja uzoraka tokom elektroforeze koji se kreće ispred uzoraka zbog male molekulske mase. Po dodavanju pufera uzorci se promešaju na vorteksu i zatim skuvaju na 100 °C u toku 5 minuta, čime se obezbeđuje njihova denaturacija. Ovakva priprema uzoraka znači da će se proteini elektroforezom razdvajati isključivo na osnovu njihove molekulske mase, tj. veličine. Do daljeg korišćenja uzorci proteina su čuvani na -20 °C.

3.10.4. Elektroforeza proteina

Razdvajanje proteina iz uzoraka je izvršeno vertikalnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum dodecil sulfata (*SDS-PAGE*). Gel određene koncentracije akrilamida efikasno razdvaja proteine određene molekulske mase, te se gustina gela prilagođava u zavisnosti od veličine proteina od interesa. Korišćeni su gelovi za razdvajanje proteina (engl. *resolving gel*) gustine 10 % (za detekciju proteina molekulske mase između 40 i 70 kDa: aktin, p62, beclin 1) ili 12 % (za detekciju proteina manje molekulske mase - kaspaza 3, aktivna-isečena kaspaza 3, LC3 protein). Ovi gelovi su sastava 10 % akrilamid/0,34 % bisakrilamid ili 12 % akrilamid/0,41 % bisakrilamid; 0,1 % SDS; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, kojima se kao katalizator polimerizacije dodaje 0,05 % amonijum persulfat - APS i 0,033 % tetrametil etilendiamin - TEMED. Ovako napravljeni gelovi za razdvajanje se naliju u prethodno pripremljene držače za gelove (engl. *gel casters*), i zatim se preko njih doda *n*-butanol saturiran vodom (90 %) koji obezbeđuje da površina gela za razdvajanje proteina bude glatka i izjednačena. Gelovi se zatim ostave da polimerišu oko 60 minuta, a butanol odlije. Preko gelova za razdvajanje proteina se zatim naliva gel za sabijanje proteina (engl. *stacking gel*) sastava 4 % akrilamid/0,14 % bisakrilamid; 0,1 % SDS; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 uz dodatak 0,05 % APS i 0,033 % TEMED; u koji se urone češljici koji će obezbediti bunare za nalivanje uzoraka. Gel za sabijanje proteina ima ulogu da omogući prolaz proteina do gela za razdvajanje

proteina i jednaku početnu tačku kretanja svih uzoraka. Nakon polimerizacije gela za sabijanje proteina od oko 30 minuta češljici se uklone a gelovi postave u aparaturu za elektroforezu čiji se rezervoari napune puferom za elektroforezu (192 mM glicina, 0,1 % SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3). U bunare se naliže ista količina proteina (10-50 µg) svakog uzorka a elektroforetsko razdvajanje proteina traje oko 90 minuta pri konstantnom naponu. U toku prolaska uzorka kroz gel za sabijanje proteina voltaža je 100 V, a zatim se poveća na 150 V. Elektroforeza se prekida kada boja bromfenol plavo stigne do dna gela. Pored uzoraka, u jedan bunarić gela se nanese smeša obojenih referentnih proteina poznatih molekulskih masa.

3.10.5. Transfer

Prenos, tj. transfer proteina iz uzorka koji su razdvojeni elektroforezom se vrši na nitrocelulozne membrane, kako bi se obezbedila čvrsta podloga za detekciju proteina od interesa, tj. antigen-antitelo reakciju. Membrane od nitroceluloze imaju visok afinitet za vezivanje proteina, kao i sposobnost da imobilizuju proteine na mestu vezivanja. Smatra se da su hidrofobne interakcije koje se uspostavljaju između negativno nalektrisanе membrane i negativno naelektrisanih proteina odgovorne za ovo vezivanje. Korišćena je aparatura za polusuvi transfer (engl. *semi-dry*). Membrane i visoko adsorbujući filter papir se inkubiraju u puferu za transfer (192 mM glicin, 20 % metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3) u toku 2-3 minuta. U aparaturu za transfer se postavi filter papir, preko njega membrana, zatim gel i još jedan sloj visoko adsorbujućeg filter papira. Ovako napravljen "sendvič" se postavi tako da se gel nalazi bliže anodi aparature za transfer, a membrana bliže katodi, kako bi se proteini u toku transfera kretali u smeru od gela ka membrani. Korišćena je struja konstantne jačine, 0,8 mA/cm² membrane, a transfer se odvijao na sobnoj temperaturi u ukupnom trajanju od 90 minuta.

3.10.6. Imunoblot i detekcija proteina

Detekcija proteina od interesa na nitroceluloznim membranama se obavlja nakon blokiranja preostalih veznih mesta na membrani inkubacijom u rastvoru odmašćenog mleka u prahu. Proteini iz mleka će se vezati za membranu i time sprečiti nespecifično vezivanje antitela koja služe za detekciju proteina od interesa. Membrane, tj. njihovi delovi koji sadrže proteine od interesa se inkubiraju 60 minuta na rotirajućoj podlozi, na sobnoj temperaturi u 5 % rastvoru odmašćenog mleka u prahu u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween 20 (TBS-T: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6; 0,05 % Tween 20). Po odlivanju mleka, membrane se inkubiraju sa rastvorima odgovarajućih primarnih zečjih antitela specifičnih za proteine od interesa u 5 % rastvoru BSA u TBS-T: kaspaza 3 (1:500), aktivna-isečena kaspaza 3 (1:500), LC3 (1:900), beclin 1 (1:900), p62 (1:1000), β -aktin (1:3000); preko noći, na rotirajućoj podlozi na 4 °C. Po uklanjanju primarnih antitela, membrane se ispiraju 3 puta po 5 minuta u rastvoru TBS-T, na rotirajućoj podlozi na sobnoj temperaturi. Zatim se membrane inkubiraju sa rastvorom sekundarnog kozjeg antizečjeg IgG antitela (1:5000) za koje je vezana peroksidaza rena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP), na sobnoj temperaturi na rotirajućoj podlozi u toku 90 minuta. Nakon uklanjanja sekundarnog antitela membrane se ispiraju 3 puta po 5 minuta na rotirajućoj podlozi na sobnoj temperaturi u rastvoru TBS-T. Zatim se membrane postave u aparat za skeniranje membrana i detekciju signala *ChemiDoc*, i preliju se supstratom za HRP, reagensom pojačane hemiluminiscence (engl. *enhanced chemiluminescence reagent*, ECL). HRP vezana za sekundarno antitelo razgrađuje H₂O₂ iz supstrata do kiseonika i vode. Nastali kiseonik reaguje sa luminolom iz supstratnog rastvora uz nastanak 3 amino-ftalata pri čemu se oslobađa foton svetlosti što se detektuje na aparatu *ChemiDoc*. Intenzitet hemiluminiscence je direktno proporcionalan količini proteina od interesa koji je vezan za membranu. Ekspresija proteina je kvantifikovana kompjuterskim programom *ImageLab* (*BioRad Laboratories Inc*, Sjedinjene Američke Države) i izražena kao relativan broj dobijen deljenjem intenziteta trake proteina od interesa sa intenzitetom trake β -aktina istog uzorka. Rezultati količine proteina u tretiranim ćelijama su predstavljeni u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije) gde je ova vrednost uzeta za jediničnu.

3.11. Model mišjeg melanoma, *in vivo*

3.11.1. Eksperimentalne životinje

Za sve eksperimente koji uključuju ogledne životinje je dobijena saglasnost Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj 2490/2, od 03.07.2015. godine, Prilog IV) kao i Etičkog saveta za dobrobiti oglednih životinja Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (broj: 323-07-06141/2015-05/8, od 06.10.2015. godine, Prilog V).

U eksperimentima su korišćeni miševi (lat. *Mus musculus*) ženskog pola, soja C57BL/6, kao soj preporučen za indukovanje melanoma. Životinje su uzgajane u grupnom kaveznom smeštaju (4 životinje po kavezu) u standardnim laboratorijskim uslovima koji podrazumevaju temperaturu prostorije od 22 °C, ciklus svetlo-tama od 12 sati, uz dostupnosti hrane i vode *ad libitum*. U eksperimentima su korišćeni miševi starosti 8 nedelja, prosečne mase 18 ± 2 g.

3.11.2. Ispitivanje toksičnosti EE

Toksičnost EE na ogledne životinje je procenjena ispitivanjem hematoloških parametara, kao i biohemijskih pokazatelja funkcije jetre i bubrega. U eksperimentu je korišćeno 10 životinja koje su nasumično podeljene u 2 grupe (n=5), kontrolnu i eksperimentalnu. Eksperiment je trajao 14 dana. Kontrolna grupa miševa je dobijala fiziološki rastvor (0,9 % NaCl) sa 8 % DMSO (koncentracija rastvarača EE koja se koristi za dobijanje korišćene doze), a eksperimentalna grupa miševa je dobijala rastvor EE u fiziološkom rastvoru u dozi od 10 mg/kg telesne mase. Rastvori su u obe grupe životinja injektirani intraperitonealno (i.p.), pomoću insulinskog šprica sa iglom dužine 4 mm promera 27G, po šemi: 5 dana tretman, 2 dana pauza, 5 dana tretman, 2 dana pauza. Telesna masa miševa je merena svaki drugi dan u toku trajanja eksperimenta, a njihovo ponašanje je praćeno svakodnevno. Po završetku eksperimenta, punkcijom srca su prikupljeni uzorci krvi svih miševa. Deo krvi je prikupljen u epruvete sa EDTA, za analizu krvne slike, dok je deo krvi koji će biti

korišćen za biohemijske analize priključen u epruvete sa heparinom. Životinje su zatim žrtvovane cervikalnom dislokacijom, a krv za biohemijske analize centrifugirana, krvna plazma izdvojena i svi uzorci čuvani na -20 °C do daljih analiza.

Svi hematološki parametri su mereni na automatskom hemoanalizatoru *Abbot CELL-DYN Ruby*, korišćenjem komercijalno dostupnih reagenasa. Kompletna krvna slika je uključivala određivanje sledećih parametara: ukupan broj eritrocita (Er), srednja zapremina eritrocita (MCV), srednja količina hemoglobina u eritrocitu (MCH), srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu (MCHC), širina distribucije eritrocita (RDW), koncentracija hemoglobina (Hb), hematokrit (Hct), broj trombocita (Tr), srednja zapremina trombocita (MPV), ukupan broj leukocita (Leu) i leukocitarnu formulu koja podrazumeva apsolutni i relativni broj neutrofila (Neu), monocita (Mo) i limfocita (Ly).

U plazmi životinja iz kontrolne grupe, kao i onih tretiranih EE, određivane su koncentracije uree i kreatinina (kao pokazatelji bubrežne funkcije), i aktivnosti enzima aspartat amino-transferaze (AST) i alkalne fosfataze (ALP) (kao pokazatelji funkcije jetre). Analize su izvršene na automatskom biohemijskom analizatoru *Abbott Architect ci8200* korišćenjem komercijalno dostupnih reagensa, tačno po uputstvima proizvođača.

3.11.3. Priprema B16 ćelija za indukovanje melanoma

U cilju pripreme ćelija za ubrizgavanje miševima, tj. indukovanje primarnog melanoma, B16 ćelije su gajene u standardnim uslovima, i na dan otpočinjanja eksperimenta odvajane od podloge standardnom procedurom tripsinizacije. Nakon centrifugiranja i odlivanja supernatanta, ćelije su resuspendovane u HBSS-u i prebrojane korišćenjem tripan plavog (odjeljak 3.3.2). Zatim je ćelijska suspenzija razblažena u HBSS-u do koncentracije od 1×10^6 ćelija/mL za uspostavljanje primarnog melanoma, odnosno do koncentracije 3×10^6 ćelija/mL za uspostavljanje metastatskog melanoma. Za inokulaciju ćelija u životinje korišćeni su špricevi sa iglom dužine 4 mm i promera 27G.

3.11.4. Indukovanje primarnog melanoma

Miševi (ukupno 30) su najpre izmereni i njihova telesna masa zabeležena. Zatim je svim životinjama ubrizgano 500 μL prethodno pripremljene suspenzija B16 ćelija (5×10^5), potkožno (s.c.) u desni subskapularni region. Miševi su posmatrani svaki dan, a telesna masa merena svakog drugog ili trećeg dana. Nakon 7 dana, kada su vidljivi tumori dostigli veličinu zrna graška, životinje su ponovo izmerene i nasumično podeljene u 2 grupe, kontrolnu (n=16) i eksperimentalnu (n=14). U narednih 14 dana miševi su dobijali fiziološki rastvor ili EE na način i u dozama kako je opisano u odeljku koji se odnosi na ispitivanje toksičnosti. Životinje su posmatrane svaki dan, a telesna masa merena svakog drugog ili trećeg dana. Makroskopski vidljivi tumori su mereni pomoću nonijusa u dve dimenzije svakog trećeg dana. Četrnaest dana od dana početka tretmana (ukupno 21 dan od inokulacije ćelija), eksperiment je završen jer je veličina tumora kod pojedinih životinja dostigla veličinu koja premašuje 1/3 veličine miša, tj. veću od 20 mm. Miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom, nakon čega je tumorsko tkivo izdvojeno, masa izmerena na vagi, a dijometri izmereni pomoću nonijusa. Zapremina tumora je izračunata pomoću formule $(a \times b^2)/2$, gde su a i b duži odnosno kraći dijametar. Jedan deo tkivo tumora je zatim odvojen, ostavljen u rastvoru *RNAlater* i čuvan na 4 °C do analize ekspresije gena, dok je drugi deo tkiva tumora zamrznut i čuvan na -20 °C do merenja koncentracije proteina i i izvođenja imunoblota.

3.11.5. Ispitivanje ekspresije gena u tumorskom tkivu metodom kvantitavnog PCR sa reverznom transkripcijom (RT-qPCR)

Kako bi se utvrdila ekspresija gena koji su u vezi sa mehanizmima ćelijske smrti, tj. apoptozom i autofagijom, kao i ćelijskom proliferacijom, iz tumorskog tkiva je najpre izolovan ukupan sadržaj RNK. Zatim je ukupna RNK reverzno prepisana u komplementarnu DNK (cDNK) pomoću reverzne transkriptaze, nakon čega je cDNK umnožena reakcijom lančanog umnožavanja (PCR, engl. *polymerase chain reaction*). Ekspresija gena od interesa je zatim kvantifikovana.

3.11.5.1. Izolacija RNK iz tumorskog tkiva i merenje koncentracije RNK

Iz uzoraka tumorskog tkiva je izolovan ukupan sadržaj RNK takozvanom metodom organske ekstrakcije, korišćenjem *TRIZol* reagensa. Oko 50 mg tumorskog tkiva je mehanički usitnjeno, zatim prebačeno u mikroepruvetu od 1,5 mL i preliveno sa 500 μ L *TRIZol*-a. Tkivo je resuspendovano veći broj puta kroz nastavak. Nakon 5 minuta na sobnoj temperaturi uzorcima je dodavano 100 μ L hloroforma i sadržaj epruveta dobro promešan intenzivnim vorteksovanjem. Uzorci su zatim inkubirani 10 minuta na 4 °C i nakon toga centrifugirani na istoj temperaturi 15 minuta na 12000 g. U epruvetama se zatim uočavaju tri faze: donja hloroformska organska faza sa lipidima, intermedijerna faza koja sadrži denaturisane proteine i DNK i gornja vodena faza koja sadrži RNK. Vodene faze svih uzoraka se prenesu u nove mikroepruvete, zapremina zabeleži, i u svaku doda ista zapremina izopropanola. Nakon mešanja i inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta, uzorci se centrifugiraju 15 minuta na 12000 g na temperaturi od 4 °C. Na dnu epruveta se uočava talog RNK. Supernatant se odlije, a na talog sipa 1 mL 75 % etanola i uzorci promešaju na vorteksu, pri čemu se zapaža da talog "pliva" u epruveti. Nakon centrifugiranja na 4 °C u trajanju od 5 minuta na 7500 g, ponovi se korak pranja uzoraka u etanolu. Po odlivanju supernatanta, epruvete se ostave otvorene kako bi se talog RNK u potpunosti osušio (10-15 minuta), a zatim se isti rastvori u 20 μ L vode. Merenje koncentracije RNK u uzorku je vršeno pomoću *GeneQuant pro* aparata, tako što je 2 μ L uzorka razblaženo u odnosu 1:4 u dH₂O.

3.11.5.2. Reverzna transkripcija

Nakon određivanja koncentracije RNK u svakom od uzoraka, 1 μ g RNK je razblažen destilovanom vodom do zapremine od 13 μ L u mikroepruvetama za reakciju lančanog umnožavanja (PCR), zapremine 0,5 mL. Svakom uzorku je dodat 1,5 μ L tzv. master miksa (1 μ L 100 μ M nasumičnih heksamera, engl. *random hexamers*; i 0,5 μ L 100 mM dezoksiribonukleotid trifosfata, dNTP). Uzorci se postave u aparat za reverznu transkripciju *Mastercycler Realplex* i inkubiraju 10 minuta na 70 °C tokom kojih dolazi do nasumičnog vezivanja heksamera za RNK u uzorku. Zatim

se epruvete sa uzorcima kratko iscentrifugiraju (engl. *short spin*), ostave na ledu 2 minuta i doda im se miks 2 (4 μ L pufera za reverznu transkripciju i 0,5 μ L 200 U/ μ L ribonukleaze, RNAza). Zatim se svakom od uzoraka doda po 1 μ L reverzne transkriptaze i epruvete vrata u aparat za reverznu transkripciju. Sledi niz inkubacija: 15 minuta na 25 °C, zatim 1 h na 42 °C tokom kojih dolazi do reverzne transkripcije RNK u cDNK, a zatim se reakcija zaustavlja inkubacijom od 10 minuta na 70 °C, praćeno inkubacijom od 3 minuta na 95 °C. Uzorci se zatim ohlade na 4 °C i dobijena cDNK čuva na istoj temperaturi do izvođenja PCR-a.

3.11.5.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-qPCR)

Real-time RT-PCR je vršen na aparatu *ABI Prism 7500 thermocycler*, korišćenjem *TaqMan Universal PCR Master Mix* i *TaqMan* prajmera/proba za sledeće mišje gene: inhibitor ciklin-zavisne kinaze 1a / p21 - *Cdkn1a* (00432448_m1), inhibitor ciklin-zavisne kinaze 1b / p27 - *Cdkn1b* (00438168_m1), protein 1 indukovani forbol-12-miristat-13-acetatom / Noxa - *Pmaip1* (00451763_m1), X protein povezan sa BCL-2 - *Bax* (00432051_m1), BCL2-antagonist/ubica 1 - *Bak1* (00432045_m1), BCL2-sličan 11 / Bim - *Bcl2l11* (00437796_m1), *Trp53* (01731287_m1), BCL2 vezujuća komponenta 3 / PUMA - *Bbc3* (00519268_m1), homolog fosfataze i tenzina - *Pten* (00477208_m1), agonist ćelijske smrti povezan sa BCL2 - *Bad* (00432042_m1), faktor 1 koji aktivira apoptotsku peptidazu - *Apaf1* (01223702_m1), X-vezani inhibitor apoptoze - *Xiap* (0076505_m1), B ćelijska leukemija/limfom 2 - *Bcl2* (00477631_m1), baculovirusni 5 koji sadrži IAP ponovak /Survivin40 - *Birc5* (00599749_m1), cistein proteaza 4b povezana sa autofagijom - *Atg4b* (00558047_m1), 5 povezan sa autofagijom - *Atg5* (00504340_m1), 7 povezan sa autofagijom - *Atg7* (00512209_m1), 12 povezan sa autofagijom - *Atg12* (00503201_m1), protein povezan sa receptorom za gama-aminobuternu kiselinu - *Gabarap* (00490678_m1), beclin 1 povezan sa autofagijom - *Becn1* (01265461_m1), sekvestozom 1 / p62 - *Sqstm1* (00448091_m1) i 18S ribozomalna RNK - *Rn18s* (03928990_g1).

Korišćene su optičke ploče za PCR sa 96 bunara, a ukupna zapremina reakcione smeše je bila 50 μ L: 5 μ L cDNK; 2,5 μ L probe za odgovarajući gen; 25 μ L master

miksa i 17,5 μ L vode. Svaka ploča je pored gena od interesa sadržala i bunariće u kojima je određivana ekspresija endogene kontrole - *Rn18s* gena. Svaki uzorak je rađen u duplikatu. Protokol za uslove reakcije je rađen prema instrukcijama proizvođača. Incijalni korak podrazumeva inkubaciju 2 minuta na 50 °C i praćen je inkubacijom od 10 minuta na 95 °C. Zatim sledi 40 ciklusa ponavljanja koji podrazumevaju 15 sekundi topljenja na 95 °C praćenih povezivanjem DNK prajmera i polimerizacijom DNK lanaca 1 minut na 60 °C. Završni korak reakcije je inkubacija na 60 °C u trajanju od 1 h. Prag analize ciklusa (Ct, engl. *Cycle of threshold*) je podešen na 0,1 relativnih jedinica fluorescence. Vrednosti Ct endogene kontrole su oduzete od Ct vrednosti svakog analiziranog gena kako bi se dobile Δ Ct vrednosti. Relativna ekspresija gena je računata kao vrednost $2^{-\Delta Ct}$, a rezultati prikazani u odnosu na kontrolnu vrednost koja je arbitrarno postavljena na vrednost jedan.

3.11.6. Ispitivanje proteina ključnih za autofagiju i apoptozu u tumorskom tkivu metodom imunoblota

U cilju ispitivanja proteina koji imaju ulogu u apoptozi i autofagiji, tkivo tumora je najpre lizirano kako bi se izolovao proteinski sadržaj, a zatim je urađena imunoblot metoda na isti način kao što je prethodno napisano (odjeljak 3.10.2 do 3.10.6)

3.11.6.1. Izolacija tkivnog sadržaja

Proteinski sadržaj u tumorskom tkivu koje je prethodno zamrznuto i čuvano na -20 °C je izolovan pomoću pufera za esej radioimunoprecipitacije (RIPA, engl. *radioimmunoprecipitation assay*) (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH=7.6, 0,5 % IGEPAL, 0,5 % Na-deoksiholat, 0,1 % SDS). Oko 50 mg tkiva tumora svakog od uzoraka je odmereno, mehanički usitnjeno i prebačeno u epruvete. Na lizat tkiva je zatim dodato 500 μ L RIPA pufera kome je dodato 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 0,1 mM Na-vanadat i 10 μ L PIC. Lizat tkiva se inkubira 30 minuta na ledu, centrifugira 15 minuta

na 14000 g na 4 °C, a zatim se supernatanti koji predstavljaju rastvor proteina, prebace u nove mikroeprovete.

3.11.7. Indukovanje metastatskog melanoma

Miševi (ukupno 28) su najpre izmereni i njihova telesna masa zabeležena. Zatim su stavljeni pod izvor svetlosti (lampa), kako bi se ugrejali i kako bi došlo do periferne vazodilatacije što olakšava ubrizgavanje ćelija. Zatim je svim životinjama ubrizgano 200 µL suspenzije B16 ćelija (6×10^5 ćelija) u repnu venu. Životinje su zatim nasumično podeljene u kontrolnu (n=12) i eksperimentalnu grupu (n=16). Počev od dana inokulacije ćelija, miševima iz kontrolne grupe je davan rastvor 8 % DMSO u fiziološkom rastvoru, a miševima iz eksperimentalne grupe rastvor EE u 0,9 % NaCl. Obe grupe životinja su dobijale tretman intraperitonealno u narednih 14 dana po šemi: 5 dana tretman, 2 dana pauza, 5 dana tretman, dva dana pauza. Ponašanje životinja je praćeno svakodnevno a telesna masa merena svakog drugog ili trećeg dana. Po završetku eksperimenta (ukupno 14. dan od dana indukcije tumora), miševi su eutanazirani, a tkivo pluća izolovano i izmereno. Broj tumorskih metastaza je prebrojan pomoću lupe u svakom uzorku od strane dva istraživača.

3.12. Statistička analiza

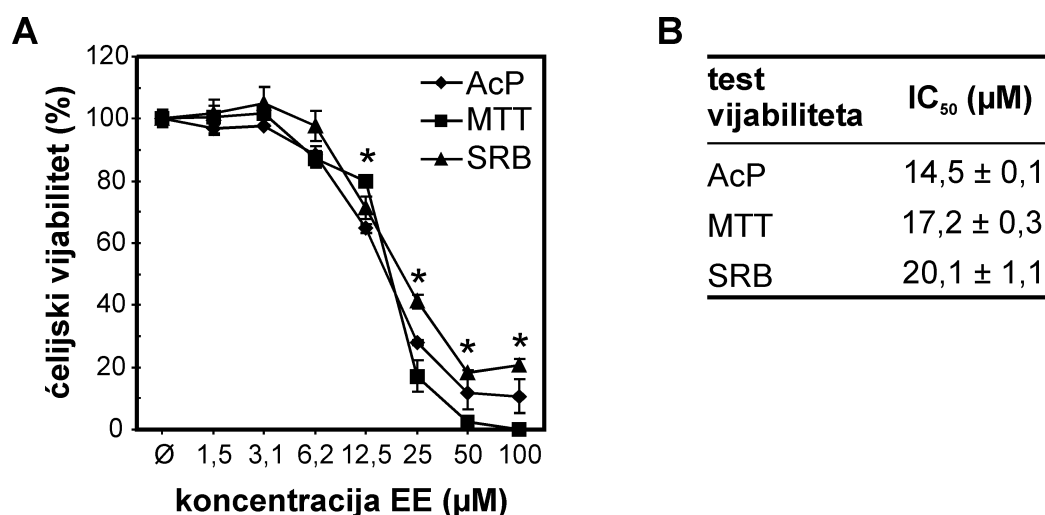
Svi dobijeni podaci su obrađeni metodama deskriptivne i inferencijalne statistike. Podaci su u zavisnosti od potrebe prikazani tabelarno, kao stubičasti ili tačkasti dijagrami i histogrami distribucije frekvencija. Kao mera centralne tendencije obeležja posmatranja korišćena je aritmetička sredina, a mera varijabiliteta standardna devijacija (sd) ili standardna greška. Normalnost raspodele obeležja posmatranja je testirana *D'Agostino-Pearson* testom normalnosti. U zavisnosti od prirode podataka i broja eksperimentalnih grupa, za poređenje su korišćeni parametarski ili neparametarski testovi: t-test za nezavisne uzorke i analiza varijanse (ANOVA test) praćena *Dunnett*-ovim post-hoc testom; odnosno *Mann-Whitney* test i *Kruskal-Wallis* praćen *Dunn*-ovim testom. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana za statistički značajnu. Sve analize su urađene u programu *GraphPad Prism*.

4. REZULTATI

4.1. EE deluje citotoksično na B16 ćelije melanoma miša

4.1.1. EE smanjuje vijabilitet B16 ćelija melanoma miša više nego RAW264.7 makrofaga miša

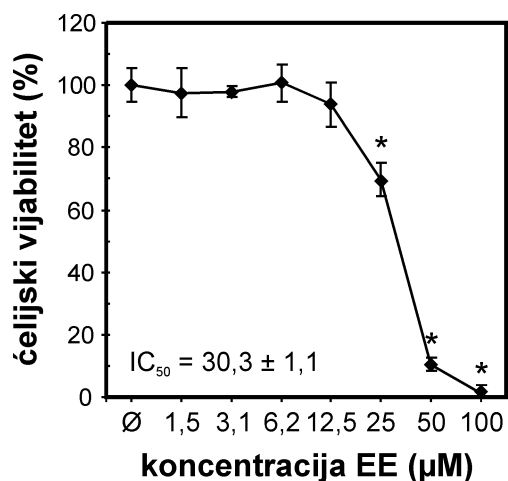
U cilju utvrđivanja potencijalnog citotoksičnog dejstva EE na ćelije melanoma miša, vijabilitet B16 ćelija je procenjivan nakon 24 h tretmana AcP, MTT i SRB testom. Utvrđeno je da EE u koncentraciji od 6,2 μM i većim dovodi do statistički značajnog dozno-zavisnog pada vijabiliteta (Slika 1A), pri čemu je tretman EE-om u koncentracijama 50 μM i 100 μM je smanjio vijabilitet B16 ćelija na ispod 20 %. Takođe, utvrđeno je da ne postoje značajne razlike u rezultatima dobijenim primenom različitih testova vijabiliteta.



Slika 1. EE pokazuje dozno-zavisan citotoksični efekat na B16 ćelijama melanoma miša. B16 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama EE u toku 24 h, a ćelijski vijabilitet procenjen testom aktivnosti kisele fosfataze (AcP), MTT testom i SRB testom. (A) Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije (Ø). * - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu. (B) IC₅₀ vrednosti za EE matematički su izračunate za svaki od primenjenih testova. Prikazane vrednosti (A,B) predstavljaju aritmetičku sredinu ± sd iz tri nezavisna eksperimenta.

IC₅₀ vrednosti EE na B16 mišjem melanomu za svaki od primenjenih testova vijabiliteta su dobijene matematički pomoću statističkog programa *GraphPad Prism*. Izračunate IC₅₀ vrednosti su reda veličine 15-20 μM i prikazane su na slici (Slika 1B).

Izvođenje MTT testa na ćelijskoj liniji makrofaga miša RAW264.7 nakon tretmana EE-om u toku 24 h je pokazalo da u koncentracijama većim od 12,5 μM EE dovodi do statistički značajnog dozno-zavisnog pada vijabiliteta makrofaga miša, pri čemu je pri koncentraciji od 100 μM vijabilitet ovih ćelija bio blizak nuli. Matematički izračunata IC_{50} vrednost EE-a za mišje makrofage je iznosila približno 30 μM (Slika 2).

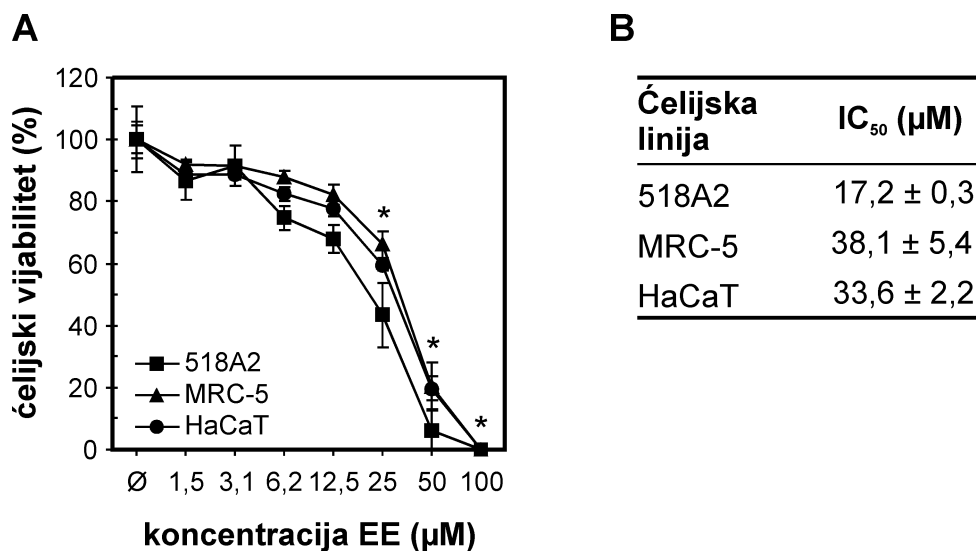


Slika 2. EE pokazuje dozno-zavisan citotoksični efekat na ćelijskoj liniji RAW264.7 makrofaga miša. RAW264.7 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama EE u toku 24 h, a zatim je izveden MTT test vijabiliteta. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije (Ø). Prikazane vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm sd iz dva nezavisna eksperimenta. * - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu. Izračunata IC_{50} vrednost je prikazana u okviru grafika.

4.1.2. EE smanjuje vijabilitet ćelijske linije humanog melanoma više nego netumorskih humanih ćelijskih linija

Potencijalno citotoksično dejstvo EE je ispitano i na humanim ćelijskim linijama (Slika 3). Pokazano je da EE dovodi do dozno-zavisnog pada vijabiliteta humanog melanoma 518A2, ali i humanih plućnih fibroblasta MRC-5, kao i humanih keratinocita HaCaT. U najnižim primenjenim koncentracijama (1,5 μM i 3,1 μM) efekat EE na vijabilitet svih ispitivanih humanih ćelija je bio zanemarljiv, dok je pri koncentraciji od 100 μM kod sve tri humane linije gotovo da nije bilo živih ćelija. U srednjem opsegu korišćenih koncentracija uočava se statistički značajna razlika u vijabilitetu melanomske (tumorske) i netumorskih ćelijskih linija pri tretmanu istom koncentracijom EE. Razlika je bila najveća pri koncentraciji od 25 μM EE kada je vijabilitet melanomskih 518A2 ćelija bio svega 43 %, vijabilitet HaCaT ćelija 59 %, a plućnih fibroblasta MRC-5 čak 66 % (Slika 3A). Nakon izračunavanja IC_{50} vrednosti za

EE, utvrđeno je da je ova vrednost gotovo dvostruko manja za humanu melanomsku liniju (~17 μM) u odnosu na netumorske humane ćelije MRC-5 (~38 μM) i HaCaT (~33 μM) (Slika 3B).



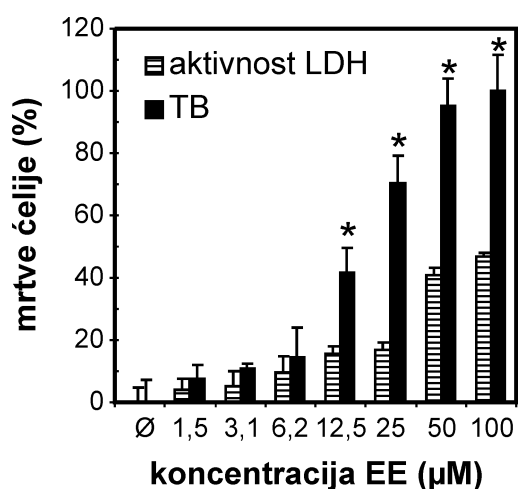
Slika 3. EE pokazuje dozno-zavisan citotoksični efekat na humanim ćelijskim linijama. Ćelije humanog melanoma 518A2, humani plućni fibroblasti MRC-5 i humani imortalizovani keratinociti HaCaT su inkubirani sa različitim koncentracijama EE u toku 24 h, a ćelijski vijabilitet procenjen MTT testom. (A) Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije (Ø). * - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu. (B) IC_{50} vrednosti za EE matematički su izračunate za svaku od ispitivanih ćelijskih linija. (A,B) Prikazane vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm sd iz tri nezavisna eksperimenta.

4.2. EE izaziva apoptozu B16 ćelija koja je posredovana kaspazama

Ispitivanje molekularnog mehanizma citotoksičnog dejstva EE je izvedeno tretiranjem B16 ćelija EE-om u kraćim ili dužim vremenskim intervalima, a zatim je utvrđivan tip ćelijske smrti - nekroza, apoptoza i autofagija. Od molekularnih događaja ispitani su: integritet ćelijske membrane, aktivacija kaspaza, eksternalizacija fosfatidil serina, fragmentacija DNK, depolarizacija mitohondrija, produkcija slobodnih kiseoničnih radikala, prisustvo kiselih vezikula u citoplazmi ćelija, kao i nivo proteina ključnih za procese apoptoze i autofagije.

4.2.1. EE primarno ne uzrokuje nekrozu B16 ćelija

U cilju utvrđivanja integriteta ćelijske membrane B16 ćelija koje su izložene dejstvu EE, urađen je test aktivnosti laktat dehidrogenaze u supernatantu ćelijske kulture nakon 24 h tretmana. Kako ovaj test meri aktivnost unutarćelijskog enzima u ekstraćelijskom prostoru, on predstavlja dobar pokazatelj očuvanosti integriteta ćelijske membrane i sugerira nekrozu kao modalitet ćelijske smrti. Rezultati (Slika 4, šrafirani stubići), su pokazali da EE dovodi do statistički značajnog, dozno-zavisnog, povećanja broja B16 ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane. Pri najvećim korišćenim koncentracijama EE-a (50 μM i 100 μM) procenat ovakvih ćelija je manji od 50 %. Bojenjem ćelija pomoću TB nakon 24 h tretmana EE-om i prebrojavanjem broja živih i mrtvih ćelija dobijeni su rezultati koji takođe pokazuju statistički značajno, dozno-zavisno, povećanje broja mrtvih ćelija. Tretman B16 ćelija koncentracijama EE-a od 50 μM i 100 μM je doveo do citotoksičnog efekta kod ~90 %, odnosno 100 % ćelija (Slika 4, tamni stubići).

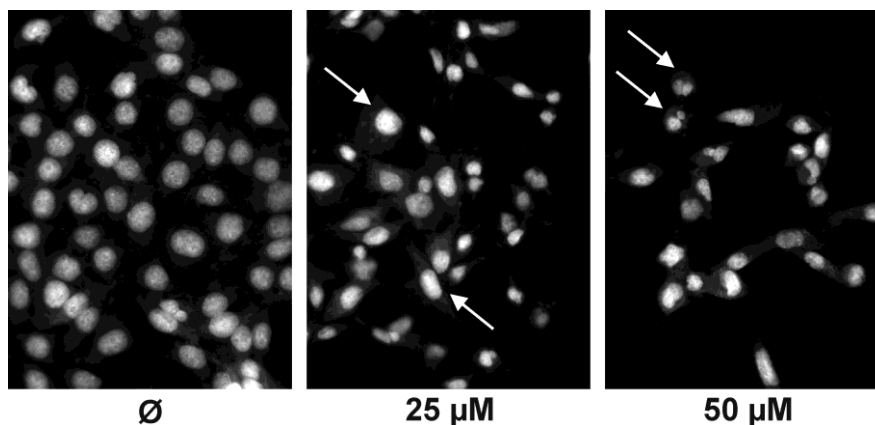


Slika 4. EE dovodi do dozno-zavisnog povećanja procenta mrtvih B16 ćelija mišjeg melanoma. Broj mrtvih ćelija nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama EE-a je procenjen merenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u supernatantu ćelijske kulture, odnosno prebrojavanjem mrtvih ćelija nakon bojenja tripan plavim (TB). Rezultati su prikazane kao aritmetička sredina \pm sd iz dva nezavisna eksperimenta. * - $p < 0,05$ u odnosu na aktivnost LDH za datu koncentraciju EE-a.

Rezultati TB bojenja i LDH testa pokazuju da je procenat ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane statistički značajno manji u odnosu na procenat izbrojanih mrtvih ćelija obojenih tripan plavim kada su ćelije tretirane istom koncentracijom EE, što sugerira da nekroza nije primarni modalitet smrti B16 ćelija melanoma miša koju EE pokreće.

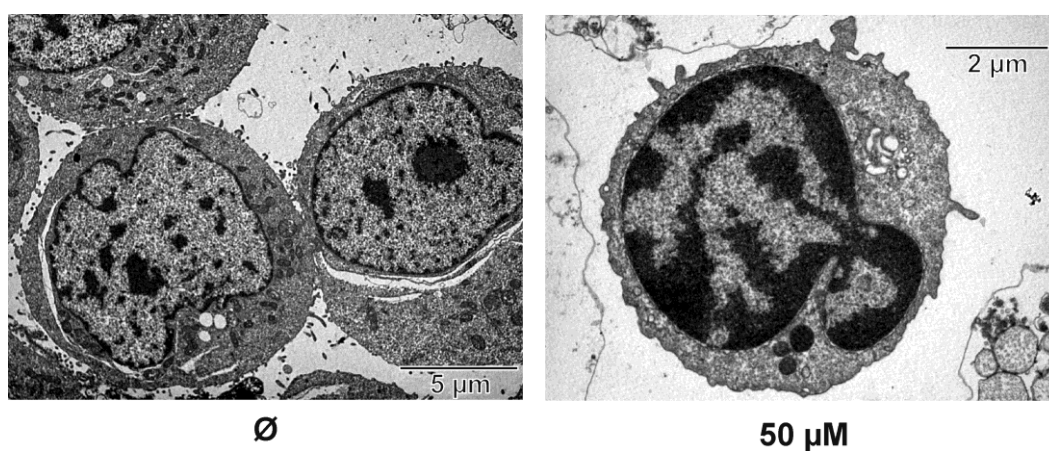
4.2.2. EE dovodi do morfoloških promena B16 ćelija koje odgovaraju apoptozi

U cilju uočavanja morfoloških promena do kojih EE dovodi, B16 ćelije su nakon tretmana EE-om obojene PI-om, bojom koja se vezuje za DNK, te se na taj način mogu vizuelizovati ćelijska jedra (Slika 5). Posmatranjem pod fluorescentnim mikroskopom, u kontrolnim, netretiranim ćelijama se uočava homogena prebojenost ćelijskih jedara, koja su jasnog ovalnog oblika. Koncentracija EE-a od 25 μM primetno je smanjila broj B16 ćelija, volumen pojedinih ćelijskih jedara i uzrokovala gubitak tipičnog oblika jedra. Pojačanje intenziteta fluorescence u određenim ćelijama (označeno strelicama na slici) ukazuje na kondenzaciju hromatina, proces karakterističan za apoptotski mehanizam ćelijske smrti. Koncentracija EE-a od 50 μM je dovela do dodatnog smanjenja broja B16 ćelija, kondenzacija hromatina je još intenzivnija, a zapažaju se i ćelijska jedra za koja se može pretpostaviti da su u procesu cepanja (označeno strelicama na slici), što sugeriše fragmentaciju hromatina.



Slika 5. EE dovodi do smanjenja broja i promena u morfološkoj jedara B16 ćelija melanoma miša. B16 ćelije su tretirane različitim koncentracijama EE i nakon 24 h obojene PI i slikane fluorescentnim mikroskopom. Jedra netretiranih ćelija (\emptyset) se uočavaju kao ovalna i homogena obojena, dok se pri koncentraciji EE-a od 25 μM uočava smanjenje broja ćelija i pojačanje intenziteta fluorescence, tj. kondenzacija hromatina (strelice). Pri koncentraciji EE-a od 50 μM uočavaju se i ćelije sa fragmentisanim jedrom (strelice). Zbog bolje vizuelizacije promena reprezentativne mikrografije su prikazane u crno-beloj boji. Korišćeno je uveličanje od 100 x.

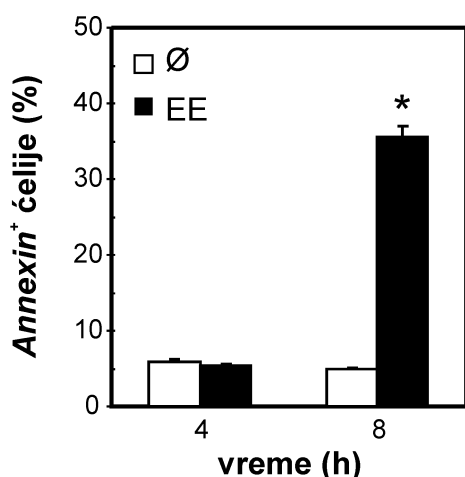
Mikrostrukturne promene do kojih je EE doveo u ćelijama mišjeg melanoma su uočene metodom transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) i prikazane su na slici (Slika 6). Netretirane ćelije pokazuju uobičajenu morfologiju, ovalnog su oblika, imaju veći broj mitohondrija i veliko jedro u kome dominira svetli euhromatin. U tretiranim ćelijama se zapažaju promene u jedru, prvenstveno tzv. marginacija hromatina sa povećanom količinom kondenzovanog, tamno obojenog heterohromatina uz jedarnu membranu. Prisutna je i promena jedra koja ostavlja utisak početne faze fragmentacije jedra.



Slika 6. EE dovodi do kondenzacije i fragmentacije jedra B16 ćelija melanoma miša. B16 ćelije su tretirane EE-om (50 µM) i nakon 24 h je njihova morfologija analizirana metodom TEM. Netretirane ćelije (Ø) pokazuju ovalan oblik i krupno ovalno jedro sa svetlim euhromatinom. Ćelija tretirana EE-om je manja, jedro je kondenzovano sa većom količinom heterohromatina i uočava se početni stadijum cepanja jedra. Prikazane su reprezentativne mikrografije sa razmernikom.

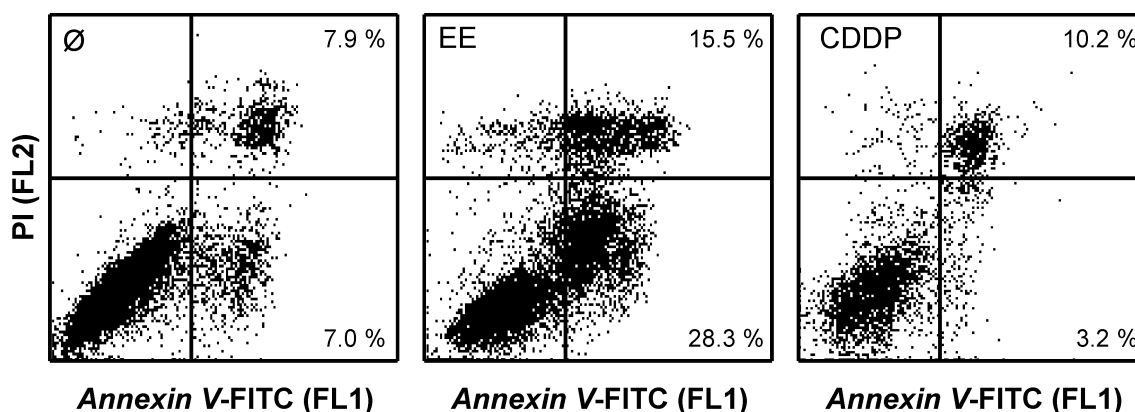
4.2.3. EE dovodi do ekternalizacije fosfatidil serina, aktivacije kaspaza i fragmentacije jedarne DNK u B16 ćelijama

Korišćenjem *Annexin V* proteina koji je obeležen FITC-om, a koji ima sposobnost vezivanja za fosfatidil serin (PS) koji se u toku apoptoze pojavljuje u spoljašnjem sloju ćelijske membrane, pokazano je da nakon 8 h tretmana EE (50 µM) statistički značajno povećava procenat ćelija (35 %) koje imaju ekternalizovan PS (Slika 7). Tretman u trajanju od 4 h uzrokovao je da broj *Annexin*⁺ ćelija bude oko 7 %, što je odgovaralo rezultatu na netretiranim, kontrolnim ćelijama.



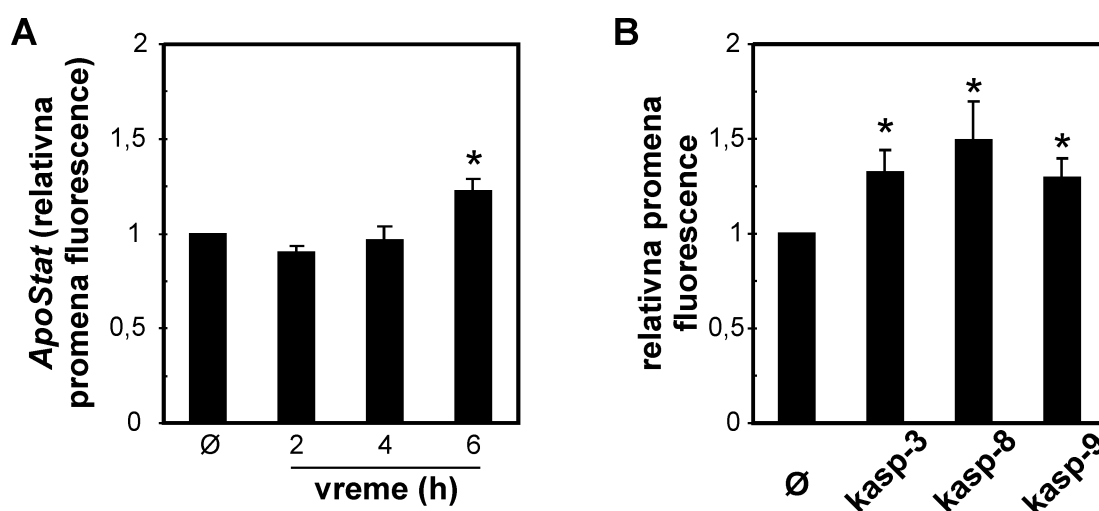
Slika 7. EE povećava procenat B16 ćelija sa eksternalizovanim fosfatidil serinom nakon 8 h tretmana. B16 ćelije su tretirane EE-om (50 μ M), a zatim obojene *Annexin V/PI* i analizirane na protočnom citometru. Prikazan je procenat ćelija koje su *Annexin* pozitivne u tretiranim i netretiranim (\emptyset) ćelijama. Prikazane vrednosti su aritmetička sredina \pm sd iz dva nezavisna eksperimenta. * - $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije.

Eksternalizacija PS koja je uočena 8 h nakon tretmana EE-om se održala i nakon 24 h tretmana B16 ćelija (Slika 8). Procenat *Annexin*⁺ ćelija je iznosio oko 43 % dok je u kontrolnim ćelijama bio ispod 15 % i ova razlika je dostigla nivo statističke značajnosti. Procenat ćelija koje imaju eksternalizovan PS nakon tretmana cisplatinom (CDDP) unutar istog vremenskog perioda je iznosio 14 % što odgovara procentu u netretiranim ćelijama.



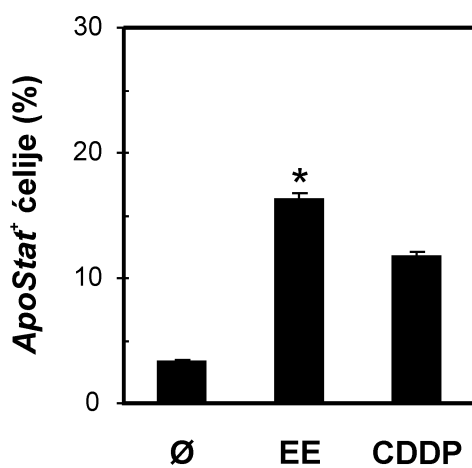
Slika 8. EE povećava procenat B16 ćelija sa eksternalizovanim fosfatidil serinom nakon 24 h tretmana. B16 ćelije su inkubirane 24 h u hranljivom medijumu (\emptyset), sa 50 μ M EE-a ili cisplatinom (CDDP, 75 μ M), a zatim je izvršeno dvostruko bojenje *Annexin V-FITC/PI* i analiza na protočnom citometru. Predstavljeni su reprezentativni tačkasti dijagrami jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima gde su ćelije u donjem levom kvadrantu žive (dvostruko negativne), ćelije u gornjem levom kvadrantu su u nekrozi (*Annexin*⁻/*PI*⁺), dok su ćelije u desnim kvadrantima one sa eksternalizovanim PS (*Annexin*⁺). Procenat ćelija je naznačen u okviru odgovarajućeg kvadranta.

Dodatno, pokazali smo da se aktivnost kaspaza, enzima koji imaju ulogu u izvršenju apoptoze, može detektovati već 6 h od početka izlaganja B16 ćelija EE-u. Aktivirane kaspaze su detektovane kao relativni porast srednjeg intenziteta fluorescence porekla *ApoStat*-a, specifičnog pankaspaznog inhibitora, u tretiranim B16 ćelijama u odnosu na kontrolne, netretirane. Tretman u trajanju od 2 h i 4 h nije doveo do porasta aktivacije kaspaza, dok se nakon 6 h detektuje porast od oko 30 % u odnosu na kontrolu (Slika 9A), koji je statistički značajan. Takođe, nakon 8 h tretmana u ćelijama je statistički značajno bila povećana aktivacija i inicijatornih kaspaza 8 i 9, kao i egzekutorne kaspaze 3. Aktivacija inicijatorne kaspaze 8, specifične za spoljašnji put apoptoze, u ovom vremenskom trenutku je bila povećana ~50 % u odnosu na kontrolu. Aktivacija inicijatorne kaspaze 9, specifične za unutrašnji put apoptoze, i aktivacija egzekutorne kaspaze 3 su bile povećane ~30 % u odnosu na kontrolu. Ovo je pokazano kao relativno povećanje srednjeg intenziteta fluorescence porekla specifičnog inhibitora za datu kaspazu u tretiranim B16 ćelijama u odnosu na netretirane (Slika 9B).



Slika 9. EE rano aktivira kaspaze u ćelijama melanoma miša. B16 ćelije su tretirane EE-om (50 μ M), obojene i analizirane na protočnom citometru. (A) Relativna promena srednjeg intenziteta fluorescence porekla *ApoStat*-a u odnosu na netretirane ćelije (Ø). Predstavljene vrednosti su aritmetička sredina \pm sd iz dva nezavisna eksperimenta. (B) Relativna promena srednjeg intenziteta fluorescence porekla specifičnih inhibitora za kaspazu 3 (kasp-3), kaspazu 8 (kasp-8) i kaspazu 9 (kasp-9) u B16 ćelijama nakon 8 h tretmana, u odnosu na netretirane ćelije (Ø). Prikazani podaci su aritmetička sredina \pm sd iz duplikata jednog od dva nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima. * - $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije (Ø).

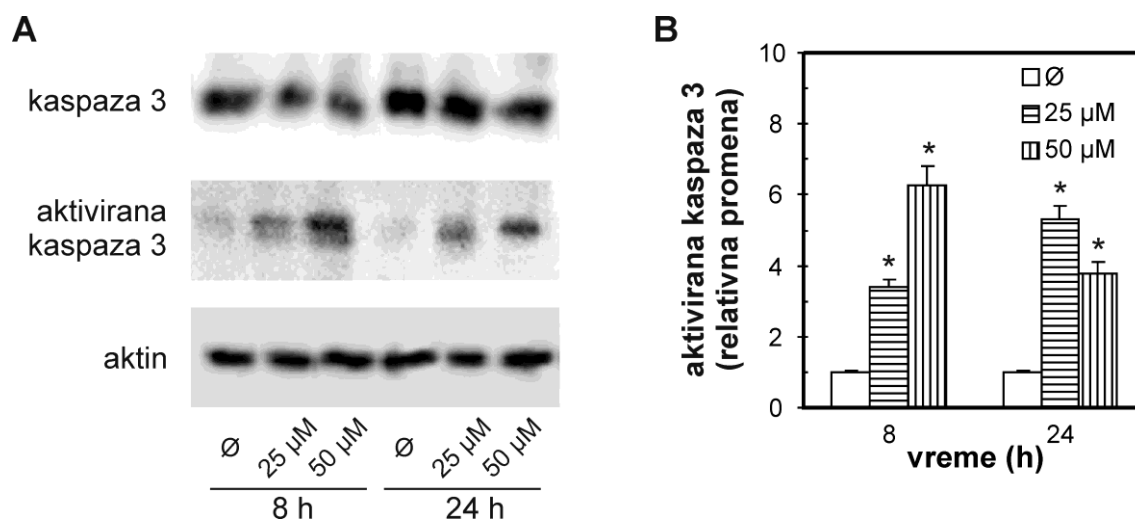
Takođe, utvrđeno je da nakon 24 h tretmana i dalje postoji rezidualna kaspazna aktivnost, tj. statistički značajno povećanje procenta ćelija sa aktiviranim kaspazama u odnosu na kontrolu. Procenat B16 ćelija koje su *ApoStat* pozitivne nakon tretmana iznosio je 17 %, dok ih je u kontroli bilo 4 %. Takođe, u 24-časovnom tretmanu EE je bio nešto efikasniji u aktivaciji kaspaza u tretiranim ćelijama od antitumorskog leka cisplatina (CDDP) koji doveo do aktivacije kaspaza u oko 12 % B16 ćelija (Slika 10).



Slika 10. Aktivacija kaspaza koju EE indukuje u ćelijama melanoma miša se održava nakon 24 h tretmana. B16 ćelije su tretirane EE-om (50 μ M) i cisplatinom (CDDP, 75 μ M). Predstavljene rezultati su procenat ćelija sa aktiviranim kaspazama nakon bojenja *ApoStat*-om i analize na protočnom citometru izraženi kao aritmetička sredina \pm sd dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. * - $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije (\emptyset).

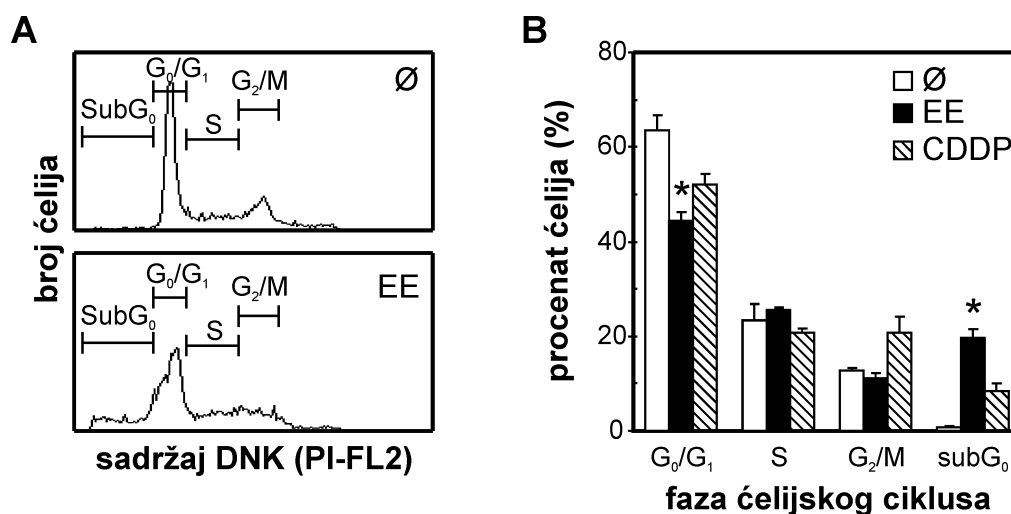
Metodom imunoblota je potvrđena aktivacija kaspaze 3 u B16 ćelijama koje su tretirane EE-om. Već nakon 8 h tretmana uočava se porast nivoa isečene, tj. aktivirane kaspaze 3 u tretiranim ćelijama u odnosu na netretirane, a isti trend je prisutan i nakon 24 h tretmana. Za razliku od netretiranih ćelija gde se signal aktivirane kaspaze 3 gotovo ne uočava u obe ispitane vremenske tačke, jasno je vidljivo da tretman dovodi do pojačanja intenziteta trake ovog proteina (Slika 11A). Denzitometrijskom analizom imunoblotova utvrđeno je da su nivoi aktivirane kaspaze 3 nakon 8 h tretmana povećani čak 3 (za koncentraciju EE-a od 25 μ M), odnosno 6 puta (za koncentraciju EE-a od 50 μ M) u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Tretman EE-om tokom 24 h povećava nivo aktivirane kaspaze 3 oko 5 (za

koncentraciju od 25 μM), odnosno 4 puta (za koncentraciju od 50 μM) u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) (Slika 11B).



Slika 11. EE dovodi do povećanja nivoa aktivirane kaspaze 3 u B16 ćelijama. B16 ćelije su tretirane EE-om i nakon 8 h i 24 h su određeni nivoi kaspaze 3 i aktivirane kaspaze 3 metodom imunoblot. (A) Reprezentativni imunoblot prikazuje nivoe ispitivanih proteina u ćelijskom sadržaju. (B) Densitometrijska analiza porasta nivoa aktivirane kaspaze 3 izražena u odnosu na nivoe u netretiranim ćelijama (\emptyset). Predstavljeni rezultati su aritmetička sredina \pm sd iz dva nezavisna eksperimenta. * - $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije.

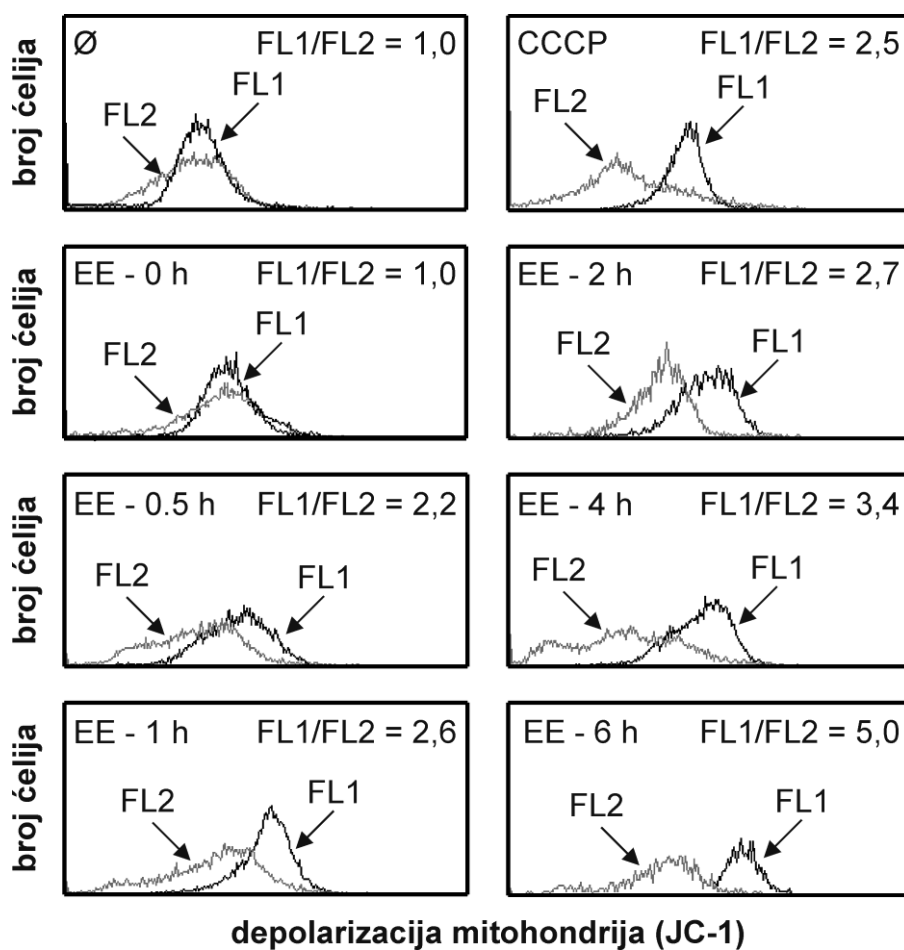
Analiza B16 ćelija nakon tretmana i bojenja fluorescentnom bojom PI koja se vezuje za jedarnu DNK protočnom citofluorimetrijom pokazala je da nakon 48 h tretmana EE-om u koncentraciji od 50 μM dolazi do promene u distribuciji ćelija koje se nalaze u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa. Na slici (Slika 12A) je prikazan reprezentativni histogram netretiranih i tretiranih B16 ćelija gde se jasno uočava povećanje procenta ćelija u tzv. subG₀ fazi ćelijskog ciklusa nakon tretmana EE-om. Ove ćelije imaju hipodiploidni sadržaj jedarne DNK te se smatra da je u njima došlo do fragmentacije naslednog materijala, što je karakteristično za apoptozu. Procenat ćelija u subG₀ fazi nakon tretmana je iznosio blizu 20 % dok je u netretiranim ćelijama iznosio 3 % ($p < 0,05$). Takođe je pokazano i da EE dovodi do smanjenja procenta ćelija u G₁ fazi ćelijskog ciklusa, sa 63 % u netretiranim ćelijama na 44 % nakon tretmana ($p < 0,05$). Cisplatin je bio manje efikasan u izazivanju promena ćelijskog ciklusa tipičnih za apoptozu u B16 ćelijama (Slika 12B).



Slika 12. EE dovodi do povećanja procenta B16 ćelija sa fragmentisanom jedarnom DNK. B16 ćelije su inkubirane sa EE-om (50 μ M) u toku 48 h, obojene PI i analizirane na protočnom citometru. (A) Reprezentativni histogrami broja ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (SubG₀, G₀/G₁, S, G₂/M) netretiranih (Ø) i ćelija tretiranih EE-om u odnosu na sadržaj DNK. (B) Procent netretiranih (Ø), ćelija tretiranih EE-om i cisplatinom (CDDP, 75 μ M) u različitim fazama ćelijskog ciklusa. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm sd iz 3 nezavisna eksperimenta. * - $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije.

4.2.4. EE indukuje depolarizaciju mitohondrijalne membrane i produkciju slobodnih kiseoničnih radikala u B16 ćelijama

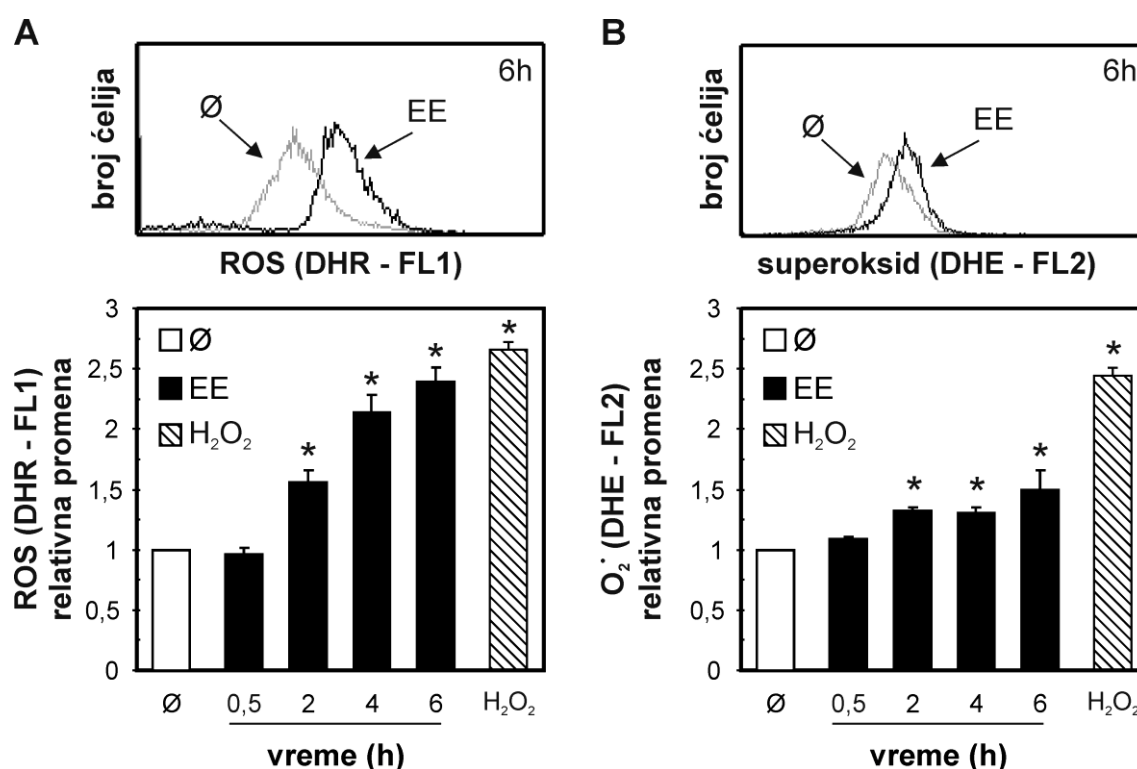
Ispitivanje statusa polarisanosti membrane mitohondrija u B16 ćelijama tretiranim EE-om (50 μ M) je praćeno u različitim vremenskim intervalima. EE dovodi do vremenski zavisnog povećanja odnosa zelene (FL1) i crvene (FL2) fluorescence porekla JC-1 boje u tretiranim ćelija u odnosu na kontrolu, što ukazuje na depolarizaciju mitohondrija. Tretman EE-om u trajanju od 30 minuta u B16 ćelijama dovodi do porasta odnosa FL1/FL2 2,2 puta u odnosu na kontrolu, što odgovara povećanju ovog odnosa toko 4 h tretmana B16 ćelija CCCP-om, jedinjenjem za koje se zna da dovodi do depolarizacije mitohondrija. Povećanje depolarizacije u ćelijama melanoma tretiranim EE-om raste sa vremenom, pa je tako odnos zelene i crvene fluorescence nakon 6 sati tretmana čak 5 puta veći u odnosu na vrednost u kontroli (Slika 13).



Slika 13. EE dovodi do depolarizacije mitohondrija B16 ćelija već 30 minuta nakon tretmana. B16 ćelije su tretirane u vremenskom periodu naznačenom u okviru histograma EE-om (50 μ M), kao i CCCP-om (20 μ M, 4 h), obojene fluorohromom JC-1 i analizirane na protočnom citometru. Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog od dva nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima. Odnos zelene (FL1) i crvene (FL2) fluorescence (FL1/FL2) izražen je u poređenju sa kontrolom (\emptyset) u kojoj je ova vrednost 1 i naznačen je u okviru histograma.

Korišćenjem fluorohroma koji reaguje sa slobodnim kiseoničnim radikalima, i specifično sa superoksid anjon radikalom, pokazano je da EE dovodi do dozno-zavisnog i statistički značajnog povećanja produkcije ROS. Rezultati ukazuju na to da depolarizacija mitohondrija prethodi produkciji ROS, uzimajući u obzir da se značajnije povećanje srednjeg intenziteta fluorescence porekla DHR uočava nakon 2 h tretmana i zatim raste u narednim ispitivanim vremenskim intervalima. Indukcija produkcije ROS u B16 ćelijama nakon 6 h tretmana EE-om (50 μ M), merena na ovaj

način, je bila povećana oko 2,2 puta u odnosu na netretirane ćelije, što je nivo sličan onom koji indukuje dodatak vodonik peroksida ćelijskoj kulturi u trajanju od 4 h (Slika 14A). Produkcija superoksid anjon radikala je takođe bila povećana nakon 2 h tretmana, očekivano u manjoj meri u odnosu na ukupne ROS, i ostala umereno povećana nakon 4 h i 6 h tretmana (Slika 14B). Nivoi superoksidnog anjona u B16 ćelijama koje su tretirane EE-om su u svim ispitivanim vremenskim intervalima takođe bili manji u odnosu na nivo koji indukuje dodatak H₂O₂ B16 ćelijama u trajanju od 4 h.

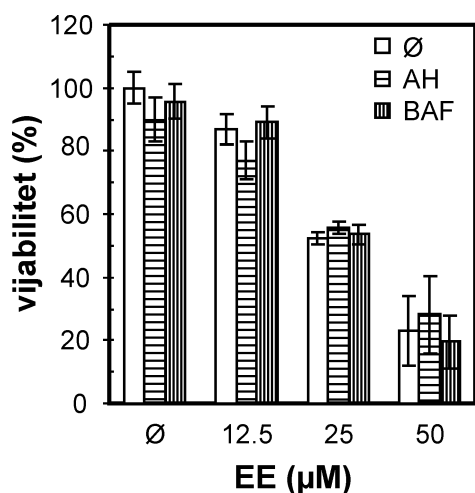


Slika 14. EE indukuje porast slobodnih kiseoničnih radikala u ćelijama melanoma miša 2 h nakon tretmana. B16 ćelije su tretirane EE-om (50 μM) u vremenskim intervalima naznačenim u graficima odnosno H₂O₂ (75 μM, 4 h), a zatim obojene fluorohromom DHR, specifičnim za ukupne ROS (A), odnosno fluorohromom DHE, specifičnim za superoksid anjon radikal O₂^{•-} (B) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Gornji paneli predstavljaju reprezentativne histograme jednog od tri nezavisna eksperimenta. Donji paneli predstavljaju relativnu promenu srednjeg intenziteta fluorescencije tretiranih ćelija u odnosu na netretirane (∅) u kojima je vrednost arbitrarno postavljena na jediničnu. Date su vrednosti aritmetičke sredine ± sd iz 3 nezavisna eksperimenta. * - $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije.

4.2.5. EE ne dovodi do aktivacije autofagije u B16 ćelijama

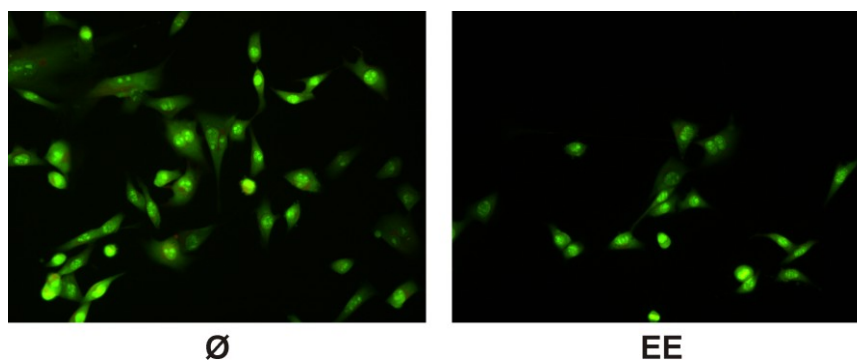
Uzimajući u obzir činjenicu da autofagija može biti proces koji spašava ćelije, tj. protektivnog karaktera, kao i to da isti proces može biti citotoksičan, odnosno mehanizam ćelijske smrti, ispitali smo kako inhibicija autofagije utiče na preživaljanje ćelija melanoma miša koje su tretirane EE-om, zatim da li EE dovodi do porasta broja kiselih vezikula u ćelijama (tipično za autofagiju), kao i da li u ćelijama dolazi do promene nivoa proteina ključnih za proces autofagije, beklina-1, LC3-II i p62.

Amonijum hlorid (AH) i bafilomicin A1 (BAF) su korišćeni kao farmakološki inhibitori autofagije. U slučaju istovremenog tretmana B16 ćelija EE-om i navedenim inhibitorima autofagije u toku 24 h, nije došlo do značajne promene procenta vijabilnih ćelija u odnosu na njihov broj u tretmanu samo EE-om, za sve korišćene koncentracije EE-a (Slika 15). Ovaj rezultat sugeriše da autofagija nema značajnu ulogu u molekularnom mehanizmu dejstva kojim EE deluje na B16 ćelije melanoma miša, tj. da EE ne pokreće niti citoprotektivnu niti citotoksičnu autofagiju.



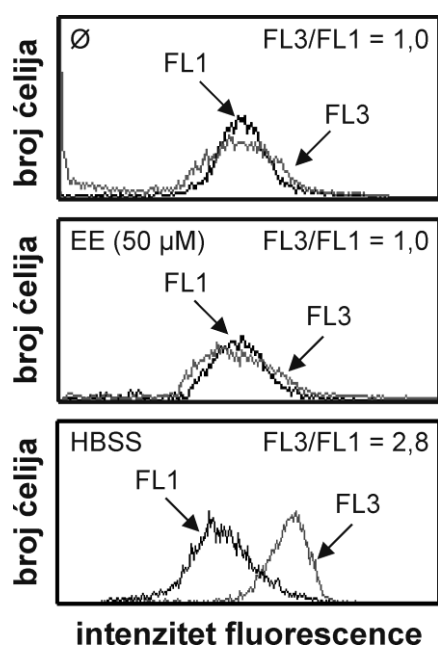
Slika 15. EE ne pokreće autofagiju u ćelijama melanoma miša. B16 ćelije su tretirane 24 h navedenim koncentracijama EE-a u prisustvu ili odsustvu inhibitora autofagije, amonijum hlorida (AH, 20 mM) ili bafilomicina A1 (BAF, 2,5 µM). Vijabilitet je određen testom aktivnosti kisele fosfataze a rezultati prezentovani kao aritmetička sredina ± sd iz tri nezavisna eksperimenta.

Bojenje tretiranih ćelija supravitalnom pH-senzitivnom bojom akridin oranž i posmatranje pod fluorescentnim mikroskopom je pokazalo odsustvo povećanja intenziteta naradžaste fluorescence porekla kiselih vezikula u odnosu na zelenu fluorescencu porekla citosola u ćelijama tretiranim EE-om (25 µM) u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije (Slika 16).



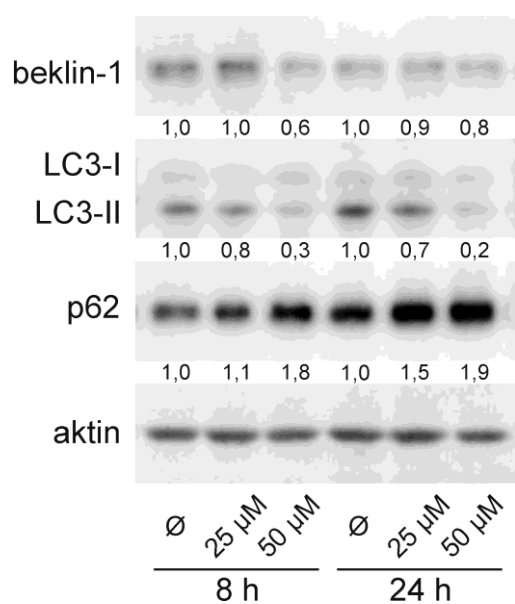
Slika 16. EE ne menja kiselost citoplazme B16 ćelija. B16 ćelije su tretirane 24 h EE-om (25 μ M), obojene akridin oranžom i zatim posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom. Prikazane su reprezentativne mikrografije iz 2 nezavisna eksperimenta. Uočava se odsustvo povećanja intenziteta narandžaste fluorescence porekla kiselih vezikula u odnosu na zelenu fluorescencu porekla citoplazme u tretiranim ćelijama u odnosu na netretirane (\emptyset).

Analiza B16 ćelija obojenih akridin oranžom nakon tretmana EE-om protočnom citofluorimetrijom je pokazala da ne dolazi do povećanja odnosa narandžaste (FL3) i zelene (FL1) fluorescence nakon 24 h tretmana u tretiranim ćelijama u odnosu na netretirane. Sa druge strane, gajenje ćelija u HBSS-u, rastvoru koji ne sadrži hranjive materije, tj. "gladovanje" B16 ćelija, dovelo je do jasnog povećanja ovog odnosa 2,8 puta u odnosu na kontrolu (Slika 17).



Slika 17. EE ne dovodi do povećanja broja kiselih vezikula u B16 ćelijama. B16 ćelije su tretirane 24 h EE-om (50 μ M) ili gajene u HBSS-u 16 h, obojene akridin oranžom i analizirane na protočnom citometru. Prikazani su reprezentativni histogrami jednog od tri nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima. U okviru svakog histograma dat je odnos narandžaste (FL3) i zelene (FL1) fluorescence izražen u odnosu na kontrolu u kojoj je ova vrednost arbitrarno postavljena na jediničnu.

Potvrda rezultata da EE ne indukuje aktivaciju autofagije je dobijena analizom nivoa proteina značajnih za proces autofagije u B16 ćelijama nakon tretmana. Kraći tretman (8 h) kao ni duži (24 h) nisu povećali nivo beclin-1 proteina, koji učestvuje u samom započinjanju autofagije. Nivo beclin-1 proteina se nakon 8 h tretmana EE-om (50 μ M) smanjio na 0,6 u odnosu na kontrolu koja je 1,0, dok je u slučaju 24-časovnog tretmana nivo beclin-1 proteina iznosio 0,9 odnosno 0,8 za koncentracije od 25 μ M i 50 μ M. Slično, nivoi LC3-II proteina, ključnog za odigravanje autofagije, nisu povećani u tretiranim ćelijama melanoma miša. Količina LC3-II je čak smanjena na svega 30 %, odnosno 20 % za tretman EE-om (50 μ M) u trajanju od 8 h, odnosno 24 h, u odnosu na kontrolu (100 %). EE nije doveo do smanjenja količine proteina p62 koji se selektivno razgrađuje u autofagolizozomima, tj. predstavlja tipičnu metu autofagne unutarćelijske proteolize. Naprotiv, veća korišćena koncentracija EE je za 8 h i 24 h povećala nivo p62 proteina u B16 ćelijama gotovo dva puta (Slika 18).

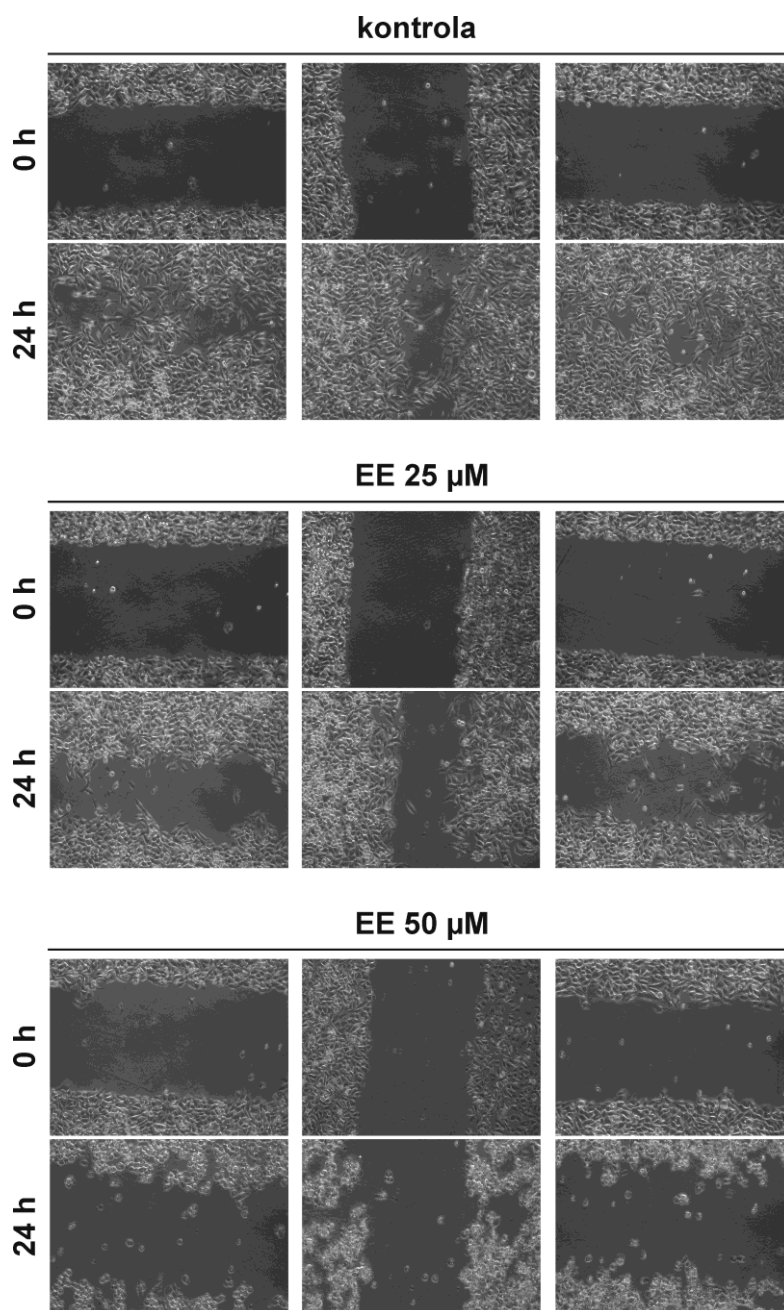


Slika 18. EE ne dovodi do promena u nivoima beklina-1, LC3-II i p62 tipičnim za autofagiju u B16 ćelijama melanoma miša. B16 ćelije su tretirane 8 h i 24 h koncentracijom EE-a od 25 μ M i 50 μ M, a zatim su nivoi beclin-1, LC3-II i p62 proteina određeni metodom imunoblotova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 2 nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima. Brojevi ispod odgovarajuće trake su denzitometrijska analiza nivoa proteina u odnosu na količinu aktina u odgovarajućem uzorku i u odnosu na netretirane ćelije (\emptyset) gde je nivo proteina arbitrarno postavljen na jediničnu vrednost.

4.2.6. EE smanjuje sposobnost B16 ćelija da migriraju

Primenom *scratch* eseja pokazano je da EE smanjuje sposobnost B16 ćelija melanoma miša da migriraju. Na konfluentnom sloju B16 ćelija u Petri šolji je napravljen defekt, a zatim je posmatran uticaj EE na popunjavanje ovog defekta, tj.

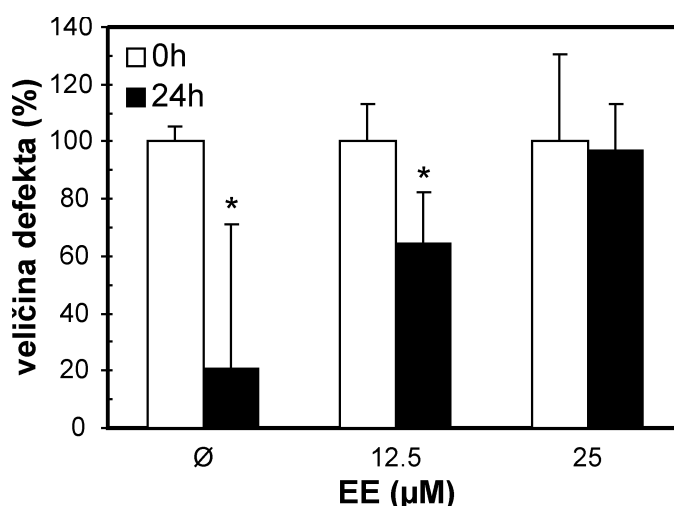
uticaj na sposobnost B16 ćelija da se kreću, što se može smatrati vrstom *in vitro* eseja koji procenjuje metastatski potencijal tumorskih ćelija (Slika 19).



Slika 19. EE smanjuje sposobnost B16 ćelija da migriraju. B16 ćelije su zasejane u ploče sa 6 bunara i po postizanju potpune konfluencije (0 h) dno bunara je zagrebano čime je napravljena povreda. Odmah zatim ćelije su tretirane EE-om, fotografisane, i nakon 24 h ponovo fotografisane. Prikazane su reprezentativne mikrografije netretiranih (kontrola) i tretiranih ćelija iz dva nezavisna eksperimenta urađena u triplikatu.

Uočava se da su netretirane ćelije nakon 24 h gotovo u potpunosti popunile izazvani defekt. Međutim, ćelije koje su tretirane EE-om su pokazale dozno-zavisno smanjenje u sposobnosti da migriraju, pa pri koncentracijama od 50 μM ne dolazi do popunjavanja defekta ćelijskog monosloja (Slika 19).

Obradom fotografija i statističkom analizom, a u cilju kvantifikacije dobijenih rezultata, pokazano je da je u slučaju netretiranih ćelija (kontrole) procenat defekta bio oko 20 % početne veličine defekta (100 %) nakon 24 h. Pri tretmanu B16 ćelija koncentracijom od 25 μM površina praznog prostora je bila oko 60 % u odnosu na početnu posle 24 h. U slučaju tretmana koncentracijom 50 μM nije došlo do smanjenja površine praznog prostora nakon 24 h (Slika 20).



Slika 20. EE u potpunosti sprečava migraciju B16 ćelija melanoma miša. B16 ćelije su zasejane u ploče sa 6 bunara i po postizanju potpune konfluencije (0 h) dno bunara je zagrebano čime je napravljen defekt u monosloju ćelija. Odmah zatim ćelije su tretirane EE-om, i fotografisane, a površina defekta izračunata pomoću *ImageJ* programa i izražena kao 100 %. Nakon 24 h, netretirane (Ø) i tretirane ćelije su ponovo fotografisane, veličina defekta analizirana i izražena u odnosu na 100 % defekta u trenutku pravljenja povrede. Prikazani rezultati su srednja vrednost \pm sd iz dva nezavisna eksperimenta urađena u triplikatu. * - $p < 0,05$ u odnosu na 0 h.

4.3. EE usporava rast melanoma *in vivo*

Sledeći korak u ispitivanju antimelanomskog dejstva EE-a je podrazumevao ispitivanje njegovih efekata u živom sistemu, tj. *in vivo*. U tu svrhu, najpre je ispitana sistemska toksičnost EE-a na kostnu srž i funkciju bubrega i jetre eksperimentalnih životinja. Zatim su miševima ženskog pola soja C57BL/6 indukovani tumori po principu primarnog tumora, ubrizgavanjem B16 ćelija potkožno, a uspostavljen je i model metastatskog plućnog melanoma na istim životinjama, injektovanjem B16 ćelija miševima istog soja u repnu venu. Efekat primene EE je procenjen merenjem mase i zapremine primarnih tumora nakon 2 nedelje tretmana, kao i promenama u ekspresiji gena i nivoa proteina bitnih za apoptozu i autofagiju u tumorskom tkivu. U slučaju metastatskog modela, vršeno je prebrojavanje metastatskih nodusa u plućnom tkivu u kontrolnim i tretiranim životinjama.

4.3.1. EE ne pokazuje toksične efekte na kostnu srž i jetru i bubrege miševa

U toku 2 nedelje trajanja eksperimenta u kojima je zdravim miševima injektovan EE u dozi od 10 mg/kg telesne mase i.p., nije primećena promena u ponašanju životinja. Efekti EE na hematološke parametre životinja su prikazani u tabeli (Tabela 3).

EE nije doveo do promene u broju uobličinih elemenata krvi, tj. ukupnog broja leukocita, apsolutnog i relativnog broja neutrofila, monocita, limfocita, kao ni eritrocita i trombocita. Broj neutrofila tretiranih miševa je bio veći u odnosu na netretirane i ova razlika je bila tek nešto iznad granice za statističku značajnost ($p = 0,052$). Takođe, nije uočena značajna razlika u koncentraciji hemoglobina, hematokritu, kao ni drugim ispitivanim indeksima crvenih krvnih zrnaca i trombocita: srednjem volumenu eritrocita (MCV), srednjoj količini hemoglobina u eritrocitima (MCH), srednjoj koncentraciji hemoglobina u eritrocitima (MCHC), širini distribucije eritrocita (RDW), srednjoj zapremini trombocita (MPV).

Tabela 3. Kompletna krvna slika sa diferencijalnom formulom leukocita kontrolnih i miševa tretiranih EE-om

Hematološki parametri	kontrola (n=5)	EE (n=5)	<i>p</i>
Leukociti ($\times 10^9/l$)	1,80 \pm 0,17	2,42 \pm 1,18	0,538
Neutrofili (%)	12,5 \pm 4,1	21,2 \pm 6,4	0,052
Monociti (%)	17,3 \pm 4,7	23,1 \pm 4,1	0,194
Limfociti (%)	70,2 \pm 7,9	55,8 \pm 10,0	0,085
Eritrociti ($\times 10^{12}/l$)	4,99 \pm 1,23	5,69 \pm 0,82	0,279
Hemoglobin (g/l)	96,2 \pm 15,1	82,3 \pm 17,0	0,279
Hematokrit (l/l)	0,31 \pm 0,05	0,26 \pm 0,06	0,279
MCV (fl)	53,5 \pm 1,3	52,3 \pm 1,1	0,133
MCH (pg)	17,0 \pm 0,5	17,0 \pm 1,0	0,905
MCHC (g/l)	317 \pm 3	317 \pm 11	0,530
RDW (%)	17,1 \pm 1,2	18,0 \pm 2,0	0,395
Trombociti ($\times 10^9/l$)	496 \pm 144	617 \pm 160	0,279
MPV (fl)	7,50 \pm 0,53	6,67 \pm 0,58	0,086

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina \pm sd; n = broj životinja; tačne *p* vrednosti su dobijene neparametrijskim *Mann Whitney* testom sa Gausovom aproksimacijom za poređenje dve grupe podataka.

Utvrđivanje koncentracije uree i kreatinina kao pokazatelja bubrežne funkcije pokazalo da ne postoje razlike između tretiranih i netretiranih miševa (Tabela 4). Aktivnost enzima AST i ALP koji se mere u serumu kao pokazatelji očuvanosti integriteta hepatocita i bilijarne funkcije se takođe nisu statistički značajno razlikovali između tretiranih i netretiranih životinja. Aktivnost aspartat aminotransferaze je bila povećana u krvi miševa koji su primali EE, ali ova razlika u odnosu na miševе iz kontrolne grupe nije dostigla statističku značajnost (*p* = 0,056). Stoga se može zaključiti da EE ne ispoljava toksične efekte na nivou bubrega i jetre.

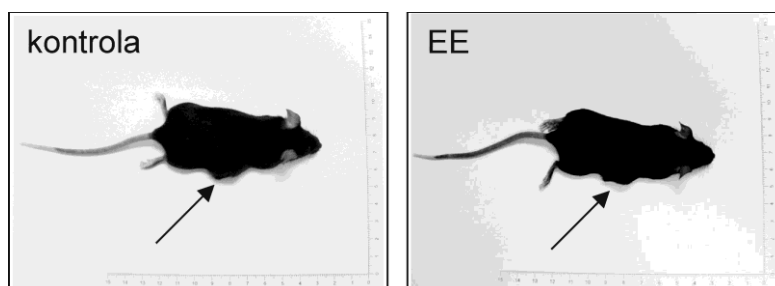
Tabela 4. Biohemijski pokazatelji funkcije bubrega i jetre kontrolnih i miševa koji su primali EE

Biohemijski parametri	kontrola (n=5)	EE (n=5)	<i>p</i>
Urea (mmol/l)	8.66 ± 1.89	8.74 ± 0.71	0.833
Kreatinin (μmol/l)	33.6 ± 2.7	36.0 ± 1.7	0.115
AST (U/l)	225 ± 57	324 ± 80	0.056
ALP (U/l)	186 ± 28	197 ± 19	0.691

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± sd; n = broj životinja; U - internacionalna jedinica enzimske aktivnosti; tačne *p* vrednosti su dobijene neparametrijskim *Mann Whitney* testom sa Gausovom aproksimacijom za poređenje dve grupe podataka.

4.3.2. EE smanjuje rast primarnog melanoma *in vivo*

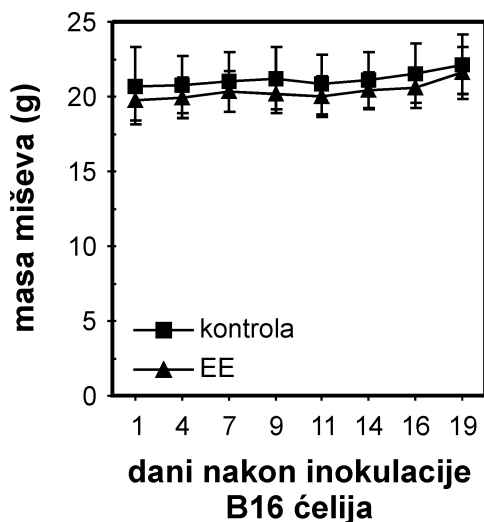
Uspostavljanjem modela primarnog, supkutano, melanoma, ispitan je uticaj EE-a na progresiju i rast tumora. Životinje su pregledane svakodnevno, a masa im je merena svaki drugi ili treći dan. Nakon 7 dana od inokulacije B16 ćelija supkutano (potkožno), tumori su bili vidljivi makroskopski kod svih životinja iz obe grupe (Slika 21), a zatim je započeto davanje EE.



Slika 21. Supkutani model mišjeg melanoma - izgled životinja sa tumorskim promenama. Reprezentativne fotografije miševa iz dve eksperimentalne grupe pre otpočinjanja primanja EE. Strelicama su obeležene makroskopski vidljive tumorske mase.

Pokazano je da nema razlike u telesnoj masi između miševa u kontrolnoj i grupi životinja koje su primale EE (Slika 22) tokom celog trajanja eksperimenta. Takođe,

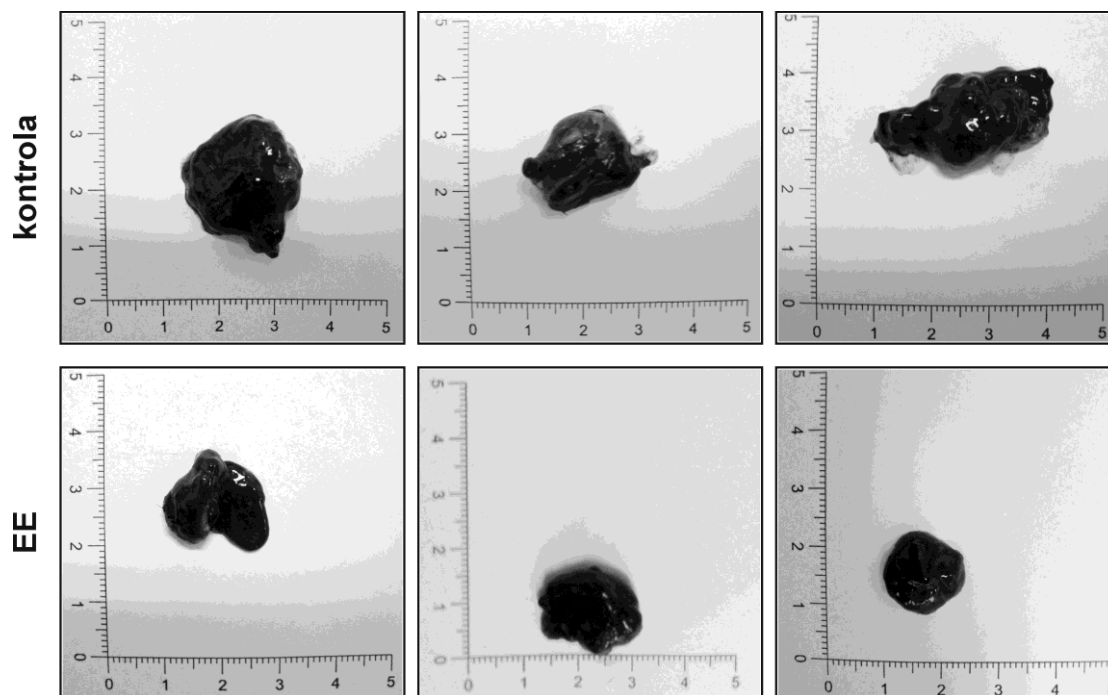
nije uočena nikakva promena u uobičajenom ponašanju miševa u toku trajanja eksperimenta.



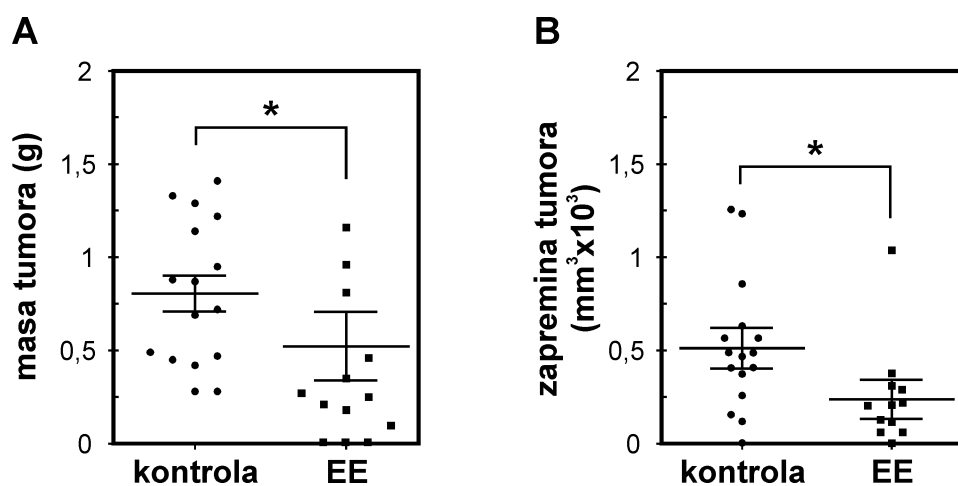
Slika 22. EE nije doveo do promene u telesnoj masi miševa sa supkutanim melanomom. Miševima su inokulisane B16 ćelije potkožno i počev od 7. dana jedna grupa je primala rastvarač (kontrola, n = 16), a druga ispitivanu supstancu (EE, n = 14). Životinje su merene svakog drugog ili trećeg dana, kao što je označeno na grafiku. Predstavljene vrednosti su aritmetička sredina \pm sd za sve životinje iz grupe.

Po završetku eksperimenta, eksperimentalne životinje su žrtvovane, a primarne tumorske mase disekovane, izolovane, fotografisane i izmerene. Makroskopski je bilo uočljivo da je EE doveo do smanjenja progresije primarnog melanoma, odnosno da su tumori izolovani iz životinja koje su primale EE u toku dve nedelje značajno manji u odnosu na tumore izolovane iz životinja koje su pripadale kontrolnoj grupi (Slika 23).

Merenjem mase izolovanih tumora, kao i računanjem zapremine nakon merenja dve dimenzije, utvrđeno je da je EE statistički značajno smanjio i masu i zapreminu primarnih promena (Slika 24). Srednja vrednost mase izmerenih tumora u kontrolnoj grupi je iznosila 0,806 g dok je u eksperimentalnoj grupi miševa masa tumora bila statistički značajno smanjena i iznosila 0,523 g (Slika 24A). Smanjenje je utvrđeno i za volumen tumora koji je u kontrolnoj grupu u proseku iznosio 517 cm³, a u eksperimentalnoj grupi u proseku bio 2,6 puta manji, tj. iznosio 198 cm³ (Slika 24B).

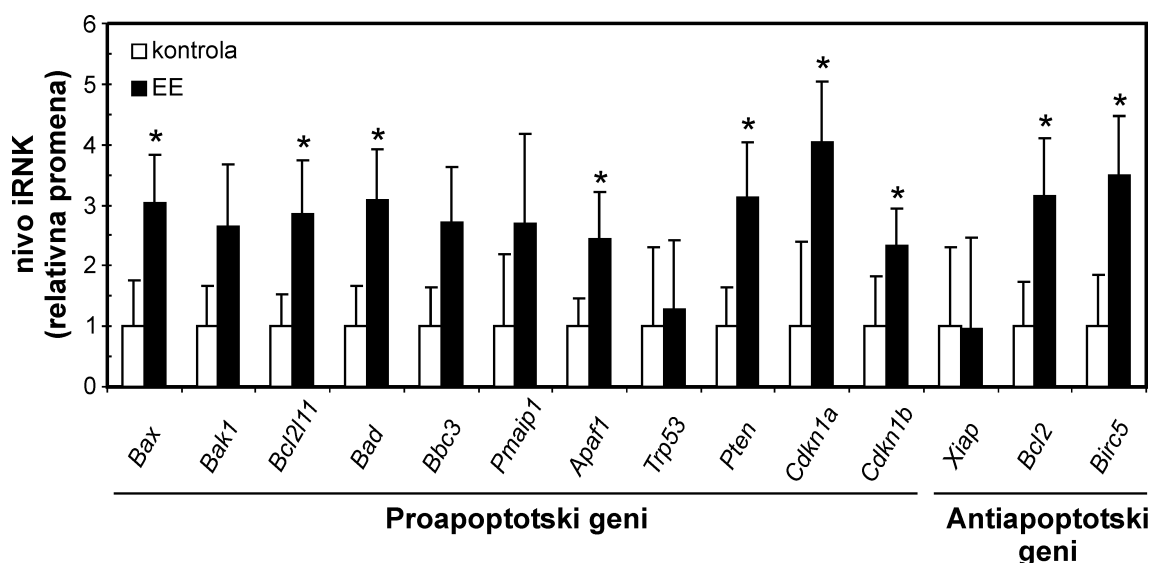


Slika 23. Supkutani model melanoma - makroskopski izgled izolovanih tumorskih promena. Reprezentativne fotografije prikazuju izgled tumora izolovanih iz kontrolne grupe miševa i grupe koja je primala EE.



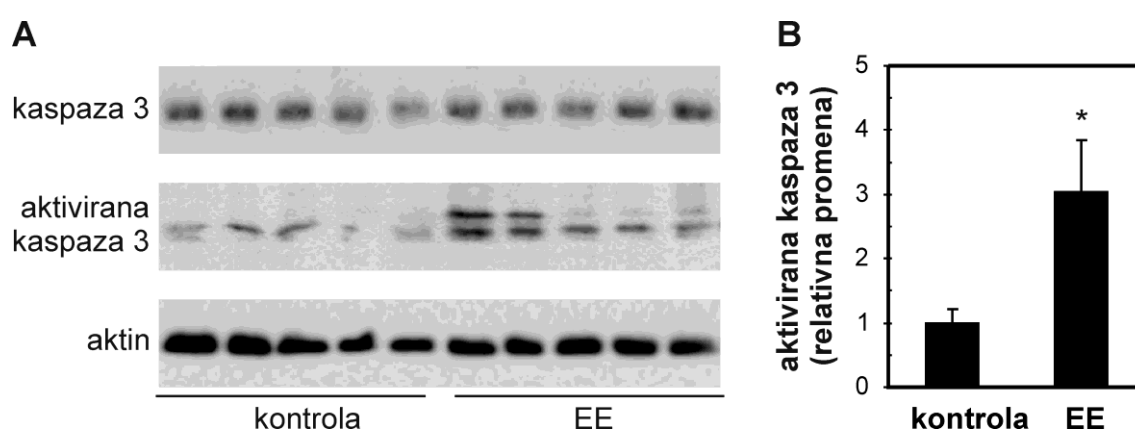
Slika 24. EE smanjuje masu i zapreminu primarnog supkutanog mišjeg melanoma. Masa (A) i zapremina (B) izolovanih primarnih tumora su predstavljene kao dijagram rasipanja gde je zabeležena svaka pojedinačna vrednost za svaku životinju iz kontrolne ($n = 16$) i grupe koja je primala EE ($n = 14$). Linijama su prikazane aritmetička sredina \pm standardna greška. * - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu na osnovu neparametrijskog *Mann Whitney* testa za poređenje dve grupe podataka.

U cilju potvrde da molekularni mehanizam antimelanomskog dejstva EE *in vivo* odgovara onom utvrđenom *in vitro*, najpre je u tumorskom tkivu analizirana ekspresija gena koji učestvuju u ćelijskoj proliferaciji i ćelijskoj smrti. Kvantitativim PCR-om sa reverznom transkripcijom je pokazano da EE moduliše ekspresiju većeg broja gena koji se mogu svrstati u proapoptotske ili antiapoptotske. EE je povećao nivo e iRNK za gene koji su proapoptotski i *BH3-only* članovi *Bcl-2* familije - *Bax*, *Bcl2l11*, *Bad*, zatim gena koji učestvuje u unutrašnjem putu aktivacije apoptoze *Apa1*, tumor-supresornog gena *Pten*, kao i gena koji regulišu ćelijski ciklus *Cdkn1a* i *Cdkn1b* u uzorcima tumorskog tkiva tretiranih miševa, u odnosu na kontrole. EE je povećao i ekspresiju antiapoptotskih *Bcl-2* i *Birc5* gena u tumorskom tkivu. Rezultati ukazuju na trend povećanja ekspresije proapoptoskih gena u tumorskom tkivu životinja tretiranih EE-om - *Bak1*, *Bbc3*, i *Pmaip1*, ali razlike među grupama nisu bile statistički značajne za ove, kao ni za preostala dva analizirana gena - *Trp53* i *Xiap* ($p > 0,05$) (Slika 25).



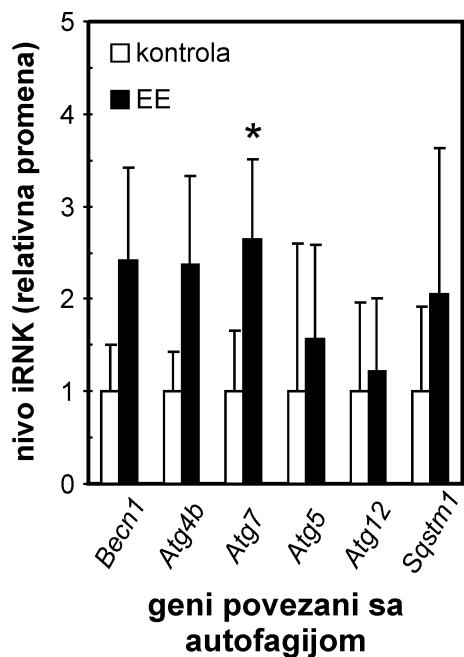
Slika 25. EE dovodi do povećanja ekspresije proapoptotskih gena u modelu primarnog supkutanog melanoma miša. Iz supkutanih tumora miševa iz kontrolne grupe (kontrola, $n = 10$) i onih koji su dobijali EE ($n = 10$) izolovana je RNK i analizirana ekspresija proapoptotskih i antiapoptotskih gena metodom RT-PCR. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm sd za svaku od grupa i izraženi u odnosu na kontrolu koja je arbitrarno svedena na jediničnu vrednost. * - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu utvrđeno korišćenjem t-testa ili *Mann Whitney* testa za dva nezavisna uzorka.

Analiza nivoa enzima koji učestvuje u završnoj fazi apoptoze, kaspaze 3, u tumorskom tkivu miševa koji su primali i onih koji nisu primali EE, potvrdila je da EE pokreće apoptozu *in vivo*. Imunoblot analizom se jasno uočava da je nivo aktivirane kaspaze 3 bio značajno veći u tumorskom tkivu tretiranih životinja (Slika 26A), dok je denzitometrijskom analizom ovog rezultata utvrđeno da je količina isečene, aktivirane kaspaze 3 bila oko tri puta veća u tumorskom tkivu životinja koje su tretirane EE-om u odnosu na tkivo tumora kontrolnih životinja, što je statistički značajno povećanje (Slika 26B).



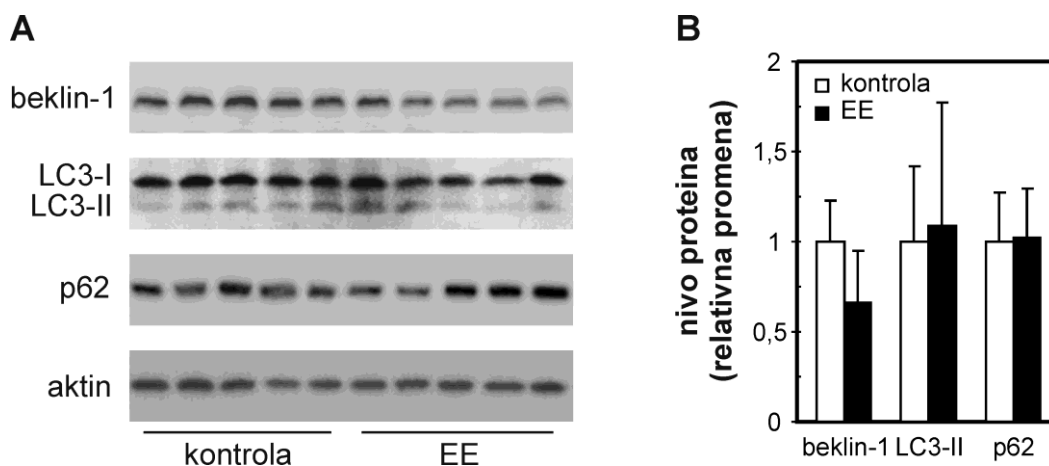
Slika 26. EE povećava nivo aktivirane kaspaze 3 u tumorskom tkivu. Iz supkutanih tumora miševa iz kontrolne grupe (kontrola, $n = 10$) i onih koji su dobijali EE ($n = 10$) izolovan je proteinski sadržaj i analizirani su nivoi kaspaze 3 i aktivirane kaspaze 3, metodom imunoblot. (A) Reprezentativni imunoblotovi prikazuju količinu određenog proteina u uzorcima. Svaka traka predstavlja pojedinačnu životinju uključenu u eksperiment. (B) Denzitometrijska analiza nivoa proteina izraženog u odnosu na količinu aktina u odgovarajućem uzorku i u odnosu na kontrolu gde je ova vrednost arbitrarno postavljena na jediničnu. * - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, dobijeno *Mann Whitney* testom sa Gausovom aproksimacijom.

U tumorskom tkivu je analizirana i ekspresija gena koji su povezani sa autofagijom. Od svih analiziranih, izdvojio se *Atg7* gen čija je ekspresija u tumorskom tkivu miševa koji su primali EE bila povećana oko 2,5 puta u odnosu na kontrolne. Ekspresija *Becn1* i *Atg4b* gena je pokazala trend povećanja u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu, ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$). Ekspresija ostalih analiziranih gena povezanih sa autofagijom, *Atg5*, *Atg12* i *Sqstm1*, nije se razlikovala u tkivu tumora tretiranih i netretiranih miševa (Slika 27).



Slika 27. EE ne menja značajno ekspresiju gena povezanih sa autofagijom u modelu primarnog supkutanog melanoma miša. Iz supkutanih tumora miševa iz kontrolne grupe (kontrola, n = 10) i onih koji su dobijali EE (n = 10) izolovana je RNK i analizirana ekspresija gena koji su povezani sa autofagijom metodom RT-PCR. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm sd za svaku od grupa i izraženi u odnosu na kontrolu koja je arbitrarno svedena na jediničnu vrednost. * - $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu utvrđeno korišćenjem t-testa ili Mann Whitney testa za dva nezavisna uzorka.

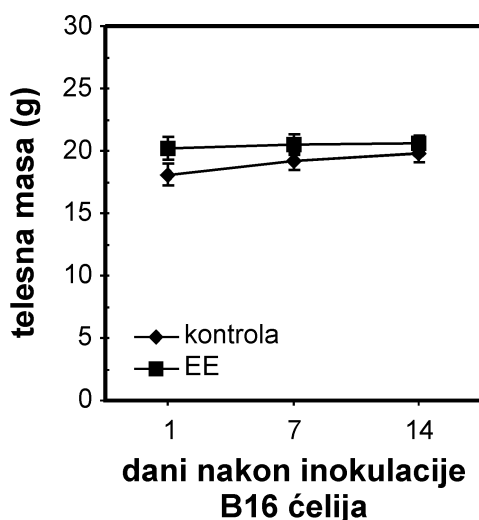
U skladu sa ovim rezultatom je i analiza nivoa proteina beclin-1, LC3-II i p62 (Slika 28). Pokazano je se nivoi ovih proteina nisu razlikovali u uzorcima tumorskog tkiva miševa koji iz kontrolne grupe i onih koji su primali EE. Zajedno, ovi rezultati ukazuju da autofagija nema značajnu ulogu u pokazanom antitumorskom dejstvu ispitivanog jedinjenja *in vivo*.



Slika 28. EE ne dovodi do promena u nivou proteina značajnih za proces autofagije u modelu primarnog supkutanog melanoma miša. Iz supkutanih tumora miševa iz kontrolne grupe (kontrola, n = 10) i onih koji su dobijali EE (n = 10) izolovan je proteinski sadržaj i analizirani su nivoi proteina vezanih za autofagiju metodom imunoblot. (A) Reprezentativni imunoblotovi koji prikazuju količinu određenog proteina u uzorcima. Svaka traka predstavlja pojedinačnu životinju. (B) Denzitometrijska analiza nivoa proteina izraženih u odnosu na količinu aktina u odgovarajućem uzorku i u odnosu na kontrolu gde je ova vrednost arbitrarno postavljena na jediničnu.

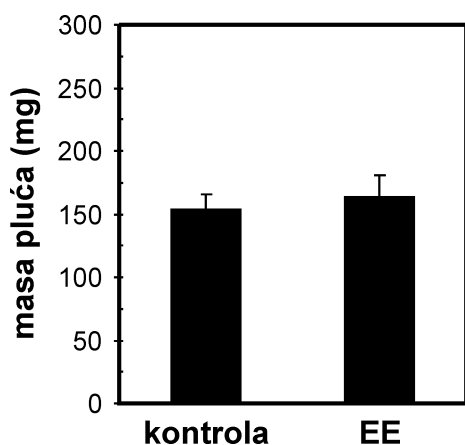
4.3.3. EE ne smanjuje broj metastaza u plućima miševa *in vivo*

Metastatski model mišjeg melanoma je uspostavljen injektovanjem B16 ćelija u repnu venu eksperimentalnih miševa. Od dana inokulacije ćelija, životinje su podeljene u kontrolnu i eksperimentalnu grupu, koja je primala EE narednih 14 dana. Merenjem telesne mase utvrđeno je da nije bilo značajnih razlika između eksperimentalne i kontrolne grupe miševa u toku trajanja eksperimenta (Slika 29).



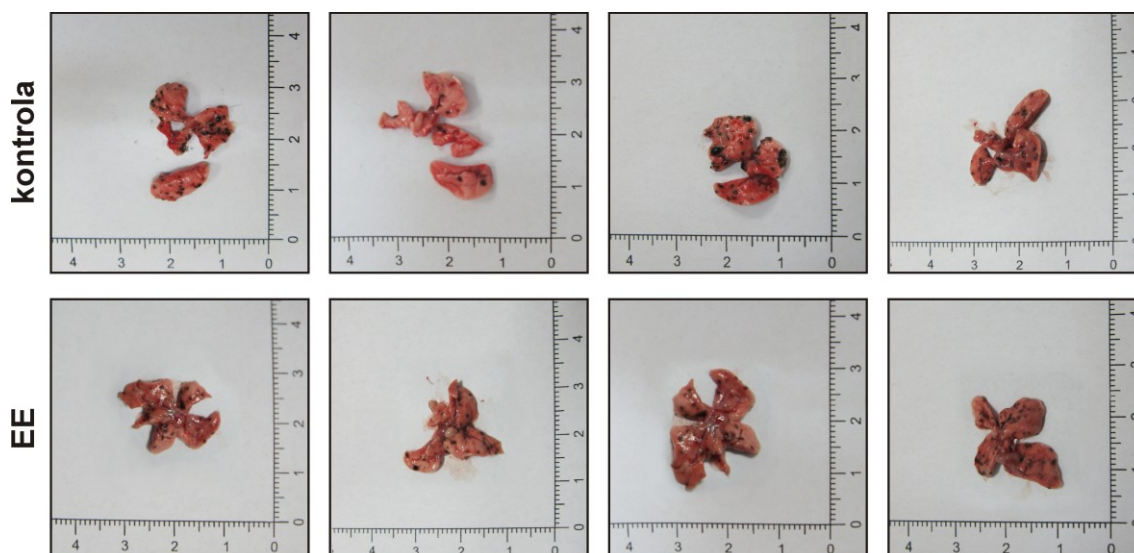
Slika 29. EE nije doveo do promene u telesnoj masi miševa sa metastatskim melanomom. Miševima su inokulisane B16 ćelije u repnu venu i počev od istog dana jedna grupa je primala rastvarač (kontrola, n = 12), a druga ispitivanu supstancu (EE, n = 16). Životinje su merene 1, 7. i 14. dana eksperimenta, kao što je označeno na grafiku. Predstavljene vrednosti su aritmetička sredina \pm sd za sve životinje iz grupe.

U toku trajanja eksperimenta nisu primećene promene u uobičajenom ponašanju životinja. Po završetku eksperimenta miševi su žrtvovani a pluća izdvojena i izmerena. Nije postojala statistički značajna razlika u masi pluća miševa iz kontrolne grupe i onih koji su primali EE (Slika 30).



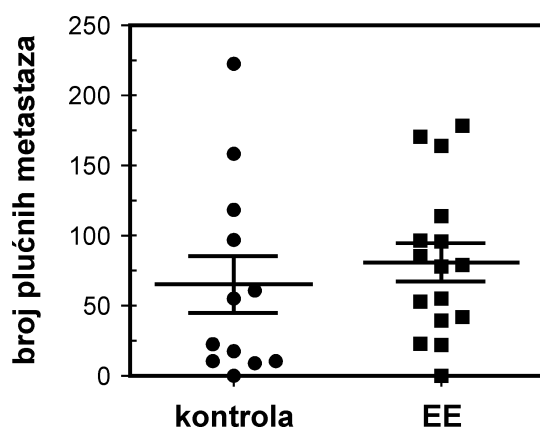
Slika 30. EE nije uticao na masu pluća miševa sa metastatskim melanomom. Miševima su inokulisane B16 ćelije u repnu venu i počev od istog dana jedna grupa je primala rastvarač (kontrola, n = 12), a druga ispitivanu supstancu (EE, n = 16). Po završetku eksperimenta, 14 dana od inokulacije ćelija, miševi su žrtvovani a masa pluća izmerena. Predstavljene vrednosti su aritmetička sredina \pm sd za sve životinje iz grupe.

Inspekcijom pluća svih životinja koje su bile deo eksperimenta, utvrđeno je da su u plućima svakog miša postojali jasno vidljivi brojni tamni depoziti koji odgovaraju metastatskim promenama (Slika 31).



Slika 31. Metastatski model melanoma miša- makroskopski izgled metastatskih promena u plućima. Reprezentativne fotografije koje pokazuju metastatske depozite u izolovanim plućima miševa koji pripadaju kontrolnoj i grupi koja je primala EE.

Analizom pluća žrtvovanih životinja i prebrojavanjem metastatskih depozita pod lupom od strane dve osobe nezavisno, utvrđeno je da EE nije smanjio broj metastatskih promena u plućima, tj. da nije imao uticaj na progresiju uznapredovale bolesti. Prosečan broj metastatskih promena u plućima životinja koje su pripadale kontrolnoj grupi je bio 65, a u grupi koja je primala EE 81 ($p > 0,05$) (Slika 32).



Slika 32. EE ne dovodi do promena u broju sekundarnih depozita u plućima miševa sa metastatskim melanomom. Broj plućnih metastaza je prikazan kao dijagram rasipanja gde je zabeležena svaka pojedinačna vrednost za svaku životinju iz kontrolne ($n = 12$) i grupe koja je primala EE ($n = 16$). Linijama je predstavljena aritmetička sredina \pm standardna greška.

5. DISKUSIJA

U ovom radu je prvi put ispitan i opisan molekularni mehanizam antimelanomskog dejstva cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline (EE) *in vitro*, kao i antimelanomsko dejstvo ovog jedinjenja *in vivo*. EE je indukovao apoptozu B16 ćelija melanoma miša koja je posredovana brзом depolarizacijom mitohondrijalne membrane i produkcijom slobodnih kiseoničnih radikala, uz aktivaciju kaspaza, eksternalizaciju fosfatidil serina ćelijske membrane i fragmentaciju jedarne DNK. Mehanizam ćelijske smrti koju EE pokreće u ćelijama melanoma miša ne uključuje autofagiju. Slično efektima *in vitro*, efekat EE-a na primarni melanom miša *in vivo* se ogleda u smanjenju tumorske mase pokretanjem apoptoze u tumorskom tkivu uz odsustvo aktivacije autofagije, pri čemu molekularni mehanizam proapoptotskog dejstva na animalnom modelu melanoma uključuje promenu ekspresije proteina BCL-2 familije i aktivaciju kaspaza. Značajna toksična dejstva EE-a na kostnu srž, jetru i bubrege miševa nisu uočena. Sa druge strane, EE se nije pokazao kao uspešan u smanjenju broja sekundarnih depozita na plućima u metastatskom modelu melanoma miša. Od posebnog je značaja što EE pokazuje citotoksični efekat i na ćelijama humanog melanoma, kao i to da se ovaj efekat ostvaruje u značajno nižim koncentracijama u odnosu na koncentracije koje dovode do smrti humanih imortalizovanih fibroblasta i keratinocita.

Citotoksičnost EE

Inicijalno ispitivanje potencijalnog citotoksičnog efekta EE-a na ćelijama melanoma miša je obavljeno upotrebom relativno širokog spektra koncentracija (dvostruko opadajuće koncentracije od 100 μM do 1,5 μM). Korišćena su tri različita testa vijabiliteta: AcP test, MTT test i SRB test, a u cilju dobijanja što tačnijih rezultata. Naime, prva dva pomenuta testa procenju vijabilnost ćelija indirektno, na osnovu njihove metaboličke aktivnosti. MTT, koji meri aktivnost mitohondrija je verovatno najkorišćeniji *in vitro* esej za procenu citotoksičnosti i smatra se zlatnim standardom, međutim, linearnost eseja ima veliku varijabilnost što utiče na tačnost, a kako meri metaboličku aktivnost, postoji mogućnost interferencije testa sa različitim jedinjenjima koja utiču na procese energetskog metabolizma [192]. Zato je korišćen i test aktivnosti kisele fosfataze (AcP) koji meri vijabilitet ćelija na osnovu

aktivnosti kiselih fosfataza lizozoma. Ovaj test ima dobru senzitivnost i reproducibilnost, ali je potencijalno moguće da jedinjenja koja interreaguju sa lizozomima interferiraju sa rezultatima testa. SRB esej, pak, vijabilitet ćelija procenjuje na osnovu količine proteina ne uzimajući u obzir njihovu funkcionalnost, te se često njegovi rezultati izražavaju kao broj ćelija. Trenutno, SRB esej se koristi kao izabrani od strane Nacionalnog instituta za maligne bolesti (NCI, engl. *National Cancer Institute*), Sjedinjene Američke Države, u skriningu i odabiru novih potencijalnih lekova u terapiji malignih oboljenja [193].

Naši rezultati su pokazali da EE dovodi do dozno-zavisnog pada vijabiliteta B16 ćelija nakon dvadesetčetvoročasovnog tretmana. IC_{50} vrednosti su bile reda veličine 15-20 μ M, za sva tri korišćena eseja, što je ukazalo i na to da izbor testa vijabiliteta u slučaju testiranja EE ne utiče značajno na dobijene rezultate. Iako neki hemioterapeutici svoje dejstvo ostvaruju u nižim mikromolarnim koncentracijama, EE je pokazao veći citotoksični efekat na ćelije melanoma miša u poređenju sa klasičnim antitumorskim lekom cisplatinom za koga je IC_{50} vrednost dobijena u našoj laboratoriji oko 4 puta veća, a u literaturi se pominju i do 8 puta veće koncentracije [194]. Ispitivanjem efekta EE na makrofage miša, utvrdili smo da iako citotoksičan, EE pokazuje izvesni nivo selektivnosti kada su u pitanju tumorske i netumorske ćelije, jer je IC_{50} vrednost na ovim ćelijama bila dvostruko veća nego za melanom miša. Ovaj rezultat je od izuzetnog značaja jer otvara mogućnost terapijskog okvira u kome bi EE mogao da ostvari antimelanomsko dejstvo bez uticaja na tumorski neizmenjene ćelije.

Iako je ceo pristup ispitivanju potencijalnog antimelanomskog dejstva EE-a u ovom istraživanju zasnovan na mišjem modelu bolesti, citotoksičnost smo ispitali i na humanim ćelijama, a u cilju veće sigurnosti u moguću buduću primenu. Efekat EE-a u smislu citotoksičnosti na humanim ćelijskim linijama ima slične karakteristike kao na ćelijama miša. EE je izazvao smrt ćelija humanog melanoma, pri čemu su IC_{50} vrednosti istog reda veličine kao za mišji melanom. Selektivnost je ispitana delovanjem na humane imortalizovane keratinocite i humane plućne fibroblaste, i ponovo se pokazalo da se citotoksični efekat EE na melanomskim ćelijama ostvaruje u oko dva puta nižim koncentracijama. U skladu sa ovim rezultatom je i prethodno pokazan efekat EE na mononuklearnim ćelijama periferne

krvi zdravih osoba [176], gde je IC_{50} vrednost gotovo dvostruko veća u odnosu na onu izračunatu za ćelije humanog melanoma.

Mehanizam dejstva EE

Ispitivanje molekularnih mehanizma koji su u osnovi citotoksičnog delovanja EE-a je takođe izvedeno na ćelijama melanoma miša. Ispitano je prisustvo ćelijske smrti po tipu nekroze, apoptoze i autofagije, kao i neki od pokazatelja oksidativnog stresa koji mogu biti u vezi sa ovim procesima. Ispitali smo uticaj EE-a na *in vitro* migratornu sposobnost B16 ćelija, što odgovara *in vivo* procesu metastaziranja.

Test aktivnosti laktat dehidrogenaze u supernatantu ćelijske kulture je korišćen u cilju procene nekroze B16 ćelija nakon tretmana EE-om. Do porasta aktivnosti ovog unutarćelijskog enzima u vanćelijskom prostoru gde se meri dolazi u okolnostima narušavanja integriteta ćelijske membrane, što je jedna od karakteristika nekroze [195]. Kako je procenat mrtvih ćelija utvrđen na ovaj način značajno manji u odnosu na procenat utvrđen nekim od testova vijabiliteta, zaključili smo da nekroza verovatno nije primarni mehanizam smrti B16 ćelija koji EE pokreće. U cilju potvrde ovog rezultata izvršeno je i prebrojavanje živih/mrtvih ćelija nakon tretmana korišćenjem boje tripan plavo, a dobijeni rezultati su bili u potpunosti u skladu sa onim dobijenim AcP, MTT i SRB testom. Takođe, postoji mogućnost da je prisustvo ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane posledica tzv. sekundarne nekroze. Kako u *in vitro* uslovima ne postoje fagociti onda ćelije u kojima je pokrenut apoptotski proces usled nemogućnosti uklanjanja podležu sekundarnoj nekrozi [196]. Skorašnji dostupni podaci iz literature ukazuju na to da uloga nekroze u citotoksičnom delovanju antitumorskih agenasa može biti od koristi jer dovodi do aktivacije imunskog sistema i infiltracije tumora imunskim ćelijama čime potpomaže njihovo dejstvo [161], mada je dugogodišnji preovlađujući stav bio da je nekroza neželjeni odgovor na hemioterapeutske agense upravo zbog proinflatornog odgovora koji pokreće [197]. Naime, inflamacija dovodi do oslobađanja mitogenih molekula koji mogu potpomoći rast tumora, a utiče i na propustljivost krvnih sudova što dovodi do lakšeg prelaska ćelija tumora u vaskularni prostor i samim tim promoviše metastaziranje [164].

Apoptoza kao modalitet ćelijske smrti koju EE pokreće je najpre dokazana utvrđivanjem morfoloških promena u ćelijama melanoma miša. Posmatranjem obojenih ćelijskih jedara pod fluorescentnim mikroskopom, a zatim mikrostrukturnih promena TEM-om uočene su jasne promene - smanjenje volumena ćelija i jedara, marginalizacija hromatina, kondenzacija hromatina i jedra, kao i početni stadijumi cepanja jedra - sve karakteristične za apoptotski proces [90,92]. Po dokazivanju da EE dovodi do morfoloških karakteristika koje odgovaraju apoptozi, sledeći korak je bio utvrđivanje jasnog vremena i sleda unutarćelijskih događaja koji će dovesti do ovakve posledice.

Prvi korak u utvrđivanju redosleda biohemijskih promena u pokazanoj apoptozi je bilo dokazivanje da EE dovodi do pomeranja fosfatidil serina iz unutrašnjeg u spoljašnji sloj ćelijske membrane. Ovo je još jedna od tipičnih promena u apoptozi i u *in vivo* okolnostima signal za ćelije imunskog sistema da fagocituju ćeliju sa ovakvom strukturom ćelijske membrane [96], a do koje je EE doveo već 8 h nakon tretmana. Zatim, pokazali smo da eksternalizaciji fosfatidil serina prethodi aktivacija kaspaza, glavnih izvršnih molekula u apoptozi, koja se u našim eksperimentima detektuje 6 h od početka tretmana. Dodatno, pokazali smo da 8 h od početka tretmana postoji povećana aktivacija inicijatorne kaspaze 8, ali i inicijatorne kaspaze 9, kao i egezekutivne kaspaze 3. Kaspaza 8 pripada spoljašnjem putu aktivacije apoptoze koji je posredovan receptorima smrti, dok kaspaza 9 pripada unutrašnjem putu apoptoze koji podrazumeva oštećenje mitohondrija [112]. Naš rezultat ukazuje da EE dovodi do kombinovanog puta aktivacije apoptoze koji podrazumeva i spoljašnji i unutrašnji. Iako neuobičajen, ovakav način se spominje u literaturi kao mehanizam citotoksičnog proapoptotskog efekta određenih ekstrakata biljaka i njihovih konstituenata na leukemijske ćelije [198]. Takođe, postoji mogućnost da je inicijalni mehanizam dejstva EE-a aktivacija spoljašnjeg puta apoptoze koji onda preko kaspaze 8 i regulacije BID proteina uključuje mitohondrije i pokreće unutrašnji put [109]. Konačno, za detekciju aktivacije svake od pojedinačnih kaspaza su korišćeni fluorescentno obeleženi inhibitori i nije moguće sa sigurnošću isključiti mogućnost njihovog preklapanja u pogledu specifičnosti [199]. Očekivano, 24 h nakon tretmana, u vreme kada su primećene i morfološke promene koje odgovaraju apoptozi, u ćelijama melanoma miša se i dalje

detektuju eksternalizovan fosfatidil serin i aktivne kaspaze. Aktivnost izvršne kaspaze 3 je potvrđena i imunoblot metodom koja ima veću osetljivost u odnosu na prethodno pomenute fluorescentne metode. Važan je i rezultat koji govori da u ovom trenutku tretmana (24 h), EE dovodi do promena tipičnih za apoptozu koje su izražene u većoj meri u odnosu na klasičan antitumorski lek cisplatin. Cisplatin je hemioterapeutik koji je u kliničkoj upotrebi više decenija i danas se koristi kao jedini ili kao deo protokola sa više lekova u terapiji velikog broja malignih bolesti kod ljudi [200]. Analiza ćelijskog ciklusa nakon tretmana EE-om je pokazala da tek nakon 48 h dolazi do fragmentacije jedarne DNK u B16 ćelijama što je očekivan rezultat uzimajući u obzir da je isecanje DNK jedan od poslednjih molekularnih događaja koji se dešava u programiranoj ćelijskoj smrti po tipu apoptoze. I ovaj put je EE bio efikasniji u izazivanju promena tipičnih za apoptozu u odnosu na cisplatin.

Kako je utvrđeno da EE aktivira kaspazu 9 koja je uključena u unutrašnji put aktivacije apoptoze koji podrazumeva poremećaj funkcije mitohondrija [103], naredni korak u rasvetljavanju molekularnog mehanizma dejstva EE-a je bio ispitivanje stanja polarisanosti unutrašnje mitohondrijalne membrane B16 ćelija. Pokazali smo da EE indukuje depolarizaciju unutrašnje mitohondrijalne membrane svega 30 minuta nakon početka tretmana i ovaj efekat se pojačava u narednih 6 sati, što verovatno znači da je ovo jedan od inicijalnih događaja u dejstvu EE-a. Ispitivanje nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) je bio naredni korak ovog istraživanja s obzirom na to da je poznato da ROS mogu biti uzrok, ali i posledica depolarizacije mitohondrija [201]. Porast u produkciji ROS, koji uključuje i superoksid anjon radikal, uočava se 2 h od početka tretmana, tj. posledica je depolarizacije unutrašnje mitohondrijalne membrane.

Treba napomenuti da aktivacija apoptoze kao mehanizma ćelijske smrti koji EE pokreće nije specifična za vrstu, kao ni za tip ćelije. Naime, antileukemijsko dejstvo EE takođe ostvaruje pokretanjem apoptoze, ali se mehanizam u ovim ćelijama značajno razlikuje u odnosu na mehanizam u B16 ćelijama. EE indukuje brzu depolarizaciju mitohondrijalne membrane koja je praćena produkcijom superoksid anjon radikala u HL-60 ćelijama humane akutne promijelocitne leukemije. Iako je u ovom slučaju utvrđena pankaspazna aktivnost, njome se ne može objasniti vrlo brza fragmentacija jedarne DNK. Fragmentacija jedra je posredovana AIF-om koji se

detektuje u jedarnoj frakciji već nakon 4 h od početka tretmana [176]. Sa druge strane, kompleksiranje sa metalom, platinom, očigledno moduliše dejstva ovog jedinjenja, jer Pt(IV) kompleks koji sadrži EE indukuje masivnu vakuolizaciju citoplazme praćenu morfološkim i biohemijskim karakteristikama nalik nekrozi u ćelijama humanog glioma *in vitro* [177]. U ovom istraživanju je pokazano da je za brzu smrt ćelija humanog glioma odgovorna povećana produkcija slobodnih kiseoničnih radikala, ali je pokazano da ovaj Pt(IV) kompleks ne dovodi do aktivacije kaspaza te se stoga može smatrati ne-apoptotskim. Dodatno, utvrđeno je i zaustavljanje deobe ćelija humanog glioma u G1 fazi ćelijskog ciklusa uz narušavanje integriteta ćelijskih membrana, što sve zajedno sugeriše nekrozu kao tip ćelijske smrti. Sa druge strane, isti Pt(IV) kompleks koji sadrži EE izaziva ćelijsku smrt koja pokazuje karakteristike i nekroze i apoptoze na ćelijskoj liniji humane akutne promijelocitne leukemije *in vitro* [178]. Povećana produkcija ROS je detektovana i u ovom slučaju, kao i značajno narušavanje integriteta ćelijske membrane. Prisustvo nekroze je pokazano i dvostrukim bojenjem *Annexin/PI*. Od pokazatelja apoptoze, utvrđeno je da Pt(IV) kompleks koji sadrži EE indukuje umerenu aktivaciju kaspaze 8 ali značajnu eksternalizaciju fosfatidil serina. Zajedno ovi rezultati govore o kombinovanom mehanizmu koji verovatno podrazumeva uključivanje i apoptotskog i nekrotičnog puta ćelijske smrti. Kada je u pitanju kompleksiranje EE-a sa platinom u obliku Pt(II) kompleksa, tip ćelijske smrti koji se pokreće u humanim leukemijskim ćelijama [178] je sličan onom koji je utvrđen u ovom radu za melanomske ćelije miša. Naime, utvrđena je produkcija slobodnih kiseoničnih radikala, zatim aktivacija kaspaze 8, kaspaze 9 i kaspaze 3, kao i fragmentacija DNK i eksternalizacija fosfatidil serina. Parametri nekrotične ćelijske smrti nisu bili prisutni kao posledica dejstva Pt(II) kompleksa na leukemijske ćelije. Ovi podaci koji ukazuju na razlike u mehanizmu dejstva u zavisnosti od koordinativnog stanja metala sa kojim se organski ligand kompleksira mogu biti od koristi u budućim istraživanjima koja se bave sintetisanjem i formulacijom organometalnih kompleksa koji sadrže cikloheksil etilendiaminske ligande, odnosno istraživanjima koja ispituju vezu između hemijske strukture i biološkog dejstva ovih jedinjenja.

Autofagija, proces kontrolisane unutarćelijske proteolize, može se pokrenuti u ćelijama bilo kao citotoksični proces koji učestvuje u ćelijskoj smrti [128], bilo kao

protektivni odgovor na stres u cilju spasavanja ćelije koji omogućava preživljavanje u nepovoljnim okolnostima [144]. U kontekstu malignih bolesti, situacija je slična. Veliki je broj istraživanja koja ukazuju na to da je autofagija u tumorima protektivni proces koji promoviše rast tumora, a brojni su dokazi da je ovaj proces i u osnovi rezistencije na različite hemioterapeutike [202]. Tako je pokazano da naročito tumori koji imaju mutaciju u RAS genu, među koje spada i melanom, imaju bazalno visoke nivoe autofagije te da će inhibicija ovog procesa imati negativan uticaj na rast tumora [203]. Dodatno, pokazano je da inhibicija autofagije u kombinaciji sa hemioterapeutskim agensima poboljšava njihovo proapoptotsko dejstvo, kao u slučaju dejstva citarabina na leukemijske ćelije [204], cisplatina na ćelije glioma [205], temozolomida na ćelije glioma [206]; ili u slučaju agenasa koji ne spadaju u klasične hemioterapeutike ali indukuju ćelijsku smrt - pri dejstvu statina (lekova koji se koriste u terapiji hiperholesterolemije) [207] i ribavirina (antiviralnog leka) [208] na ćelijsku liniju humanog glioma. Stoga je trenutno u toku veći broj kliničkih studija prve ili druge faze koji ispituju kombinaciju inhibitora autofagije sa lekovima koji se standardno koriste u terapiji uznapredovalih stadijuma različitih malignih bolesti, uključujući melanom [209–211]. Sa druge strane, iako u značajno manjem broju, postoje studije koje ukazuju na to da pokretanje autofagije u terapiji malignih bolesti može biti od koristi, odnosno doprineti antitumorskom dejstvu citotoksičnih agenasa, kao u slučaju dejstva idarubicina na leukemijske ćelije [212], doksorubicina na ćelije karcinoma dojke [213] i ćelije hepatocelularnog karcinoma [214]. Stoga je prvi korak u ispitivanju dejstva EE-a vezanog za autofagiju bila farmakološka inhibicija ovog procesa, hlorokinom i amonijum hloridom. U našim eksperimentima je pokazano da inhibicija autofagije nema uticaja na citotoksično dejstvo EE-a na ćelije melanoma miša. Dodatno, pokazali smo da EE ne indukuje povećanje broja kiselih vezikula (lizozoma i autofagolizozoma) u tretiranim ćelijama. Kao potvrda da EE ne indukuje autofagiju analiziran je nivo proteina koji su bitni za ovaj proces u tretiranim ćelijama. Nivoi beclin-1 proteina, koji učestvuje u nukleaciji, tj. stvaranju izolacione membrane koja će kasnije formirati autofagozom [138], nisu povećani u ćelijama tretiranim EE-om. Takođe, nivoi LC3-II proteina koji učestvuje u narednoj fazi autofagije, tj. elongaciji izolacione membrane [140], takođe nisu bili povećani, već naprotiv, došlo je do smanjenja količine ovog proteina u B16 ćelijama tretiranim

EE-om. Ispitali smo i nivo p62 proteina, selektivne mete autofagne degradacije. Naime, ovaj protein, proizvod gena *P62/SQSTM1* koji ima ulogu adaptornog proteina koji usmerava sadržaj koji će biti razgrađen ka autofagozomima, se i sam razgrađuje u procesu autofagije, te je njegovo smanjenje siguran znak aktivacije ovog procesa [215]. Naši eksperimenti nisu pokazali smanjenje količine p62 proteina, već suprotno, povećanje. Uzimajući u obzir sve dobijene rezultate koji su u vezi sa procesom autofagije, moguće je zaključiti da EE ne pokreće autofagiju u B16 ćelijama melanoma miša. Sa druge strane, povećanje nivoa proteina p62 i smanjenje nivoa LC3-II pobuđuju sumnju da EE inhibira bazalno postojeće nivoe autofagije u mišjem melanomu *in vitro*. Kako inhibicija ovog procesa nije uticala na citotoksično dejstvo EE-a značaj ovog rezultata nije dalje razmatran, ali ostaje kao tema od interesa za neka buduća istraživanja. Interesantan je podatak koji govori o tome da u slučaju kompleksiranja EE-a sa platinom i citotoksičnog dejstva bilo Pt(II) ili Pt(IV) kompleksa takođe ne dolazi do povećanja broja kiselih vezikula u tretiranim ćelijama, što bi odgovaralo autofagiji [177,178]. Iako proces autofagije nije detaljnije ispitivan u ovim slučajevima, nameće se zaključak da bez obzira na kompleksiranje sa metalom mehanizam dejstva ovog tipa organskih jedinjenja ne uključuje autofagiju.

Pored utvrđivanja mehanizma ćelijske smrti koji EE pokreće, u *in vitro* uslovima smo ispitali i sposobnost B16 ćelija da migriraju, korišćenjem tzv. *scratch* eseja. Smatra se da se izvođenjem ovog testa oponaša migracija ćelija *in vivo*, tj. u slučaju tumorskih ćelija, procenjuje sposobnost njihovog metastaziranja [190]. Treba napomenuti da se u literaturi, kao poseban korak u izvođenju ovog testa, često spominje potreba za smanjenjem dostupnih nutrijenata u medijumu u kom ćelije žive nakon izazivanja oštećenja monosloja (formiranja *scratch* povrede). Time se smanjuje proliferacija ćelija pa je popunjavanje defekta posledica isključivo kretanja ćelija a ne i njihovog umnožavanja. Ove preporuke se uglavnom odnose na istraživanja koja se bave modelima vaskularne barijere i imunološkog sistema, odnosno epitelnim, endotelnim ćelijama ili fibroblastima koje se u *in vitro* uslovima dele, dok u *in vivo* okolnostima imaju ograničen kapacitet proliferacije sem u slučaju postojanja adekvatnog stimulusa. Kako se ovo istraživanje bavi biologijom tumorskih ćelija čija je osnovna karakteristika nekontrolisana deoba, smatrali smo

da isključivanje proliferacije ne odgovara realnom ponašanju tumorskih ćelija, te je ovaj korak izuzet iz postupka izvođenja testa. Pokazano je da EE značajno smanjuje migratornu sposobnost B16 ćelija *in vitro*. Ovaj rezultat je od posebne važnosti, uzimajući u obzir da je primarni cilj sistemske medikamentne terapije malignih bolesti upravo postizanje efekta u uznapredovalim stadijumima, odnosno prevencija nastanka sekundarnih tumorskih depozita ili inhibicija njihovog rasta i širenja.

***In vivo* efekti EE**

Koristeći ortotopski singeni model primarnog mišjeg melanoma, ispitali smo da li EE ima sposobnost da uspori progresiju bolesti, odnosno smanji veličinu tumorske mase u *in vivo* okolnostima. Treba napomenuti da je odabran model u kome se potencijalni antitumorski agens daje životinjama tek po uspostavljanju bolesti (što je u ovom slučaju bilo 7 dana nakon inokulacije B16 ćelija miševima), što bolje oponaša klinički tok bolesti u kome se terapija daje po postavljanju dijagnoze. Iako pol može uticati na imunološki odgovor, od ranije je poznato da ne utiče značajno na rast tumora i progresiju melanoma u mišjem modelu [216,217], pa su naši eksperimenti urađeni samo na životinjama ženskog pola.

Pored rezistencije koja je značajan problem današnje medikamentne terapije malignih bolesti, veliko ograničenje predstavljaju i brojna neželjena dejstva - pre svega toksični efekat na kostnu srž i toksična dejstva na jetru i bubrege. Smanjenje broja neutrofila, neutropenija, često je jedan od očekivanih neželjenih događaja hemioterapije, i s obzirom na to da povećava rizik od nastanka potencijalno fatalnih infekcija, mora se medicinski tretirati [218]. Trombocitopenija koja se javlja kao posledica hemioterapije povećava rizik od krvarenja i smanjuje ukupno preživljavanje kod pacijenata sa solidnim tumorima a lečenje transfuzijama ili agonistima receptora za trombopoetin ima varijabilni uspeh [219]. Smanjen broj eritrocita, smanjena koncentracija hemoglobina i anemija uopšte se takođe sreću kod velikog broja pacijenata koji primaju hemioterapiju [220]. Stoga je od velikog značaja nalaz da EE ne pokazuje toksično dejstvo na koštanu srž, tj. da ne menja značajno produkciju ćelija bele i crvene krvne loze, kao ni trombocita. Takođe, svi indeksi eritrocita se nisu razlikovali u grupi životinja koja je primala EE u odnosu na

kontrolnu grupu životinja. Nefrotoksičnost je još jedan od problema hemioterapije, bilo zbog samog mehanizma dejstva ovih lekova, bilo zbog toga što se lekovi izlučuju putem bubrega i zato koncentrišu u renalnom tkivu što doprinosi oštećenju [221]. U ovom istraživanju nije ispitivan način eliminacije EE iz organizma, ali je utvrđeno da parametri bubrežne funkcije, urea i kreatinin, nisu promenjeni nakon što su miševi dobijali EE. Od značaja je i da aktivnosti AST i ALP, enzima koji ukazuju na oštećenje parenhima jetre, odnosnoolestazu, nisu bile statistički značajno povećane u eksperimentalnoj grupi miševa, iako je aktivnost AST bila nešto viša. To bi moglo da ukaže na izvesni stepen nekroze hepatocita što je možda posledica metabolisanja EE upravo u jetri.

U pogledu antitumorske aktivnosti *in vivo*, EE je pokazao značajan efekat smanjivši veličinu, zapreminu i masu primarnih tumora. Dodatno, utvrdili smo da je taj efekat posledica aktivacije apoptoze, kao u slučaju *in vitro* aktivnosti EE-a. Najpre smo analizirali ekspresiju gena koji kodiraju familiju BCL-2 proteina uključenih u mitohondrijalni put aktivacije apoptoze. EE je indukovao transkripciju proapoptotskog gena *Bax* čiji proteinski proizvod ima glavnu ulogu u formiranju BAX/BAK pore na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, odnosno u MOMP-u [117]. BAX u uslovima pokretanja apoptotskog procesa dovodi i do povećanja produkcije ROS [222], što može biti jedno od objašnjenja za detekovan oksidativni stres u B16 ćelijama melanoma nakon tretmana EE-om. Takođe, transkripcija gena koji kodiraju tzv. *BH3-only* proteine je povećana nakon tretmana EE-om, i to gena *Bcl2l11*, kao i gena *Bad*. Poznato je da produkt gena *Bcl2l11*, koji se naziva i BIM vezuje antiapoptotski BCL-2 i time onemogućava njegov inhibitorni efekat na BAX/BAK oligomerizaciju. BIM inhibira i druge antiapoptotske BCL-2 proteine (MCL-1, BCL-xL), a može i direktno indukovati BAX/BAK oligomerizaciju [223]. Primarna uloga proteina BAD je da vezuje i time inhibira antiapoptotske BCL-2 i BCL-xL [116]. Transkripcija glavnog antiapoptotskog proteina istoimene familije, BCL-2 je takođe bila povećana u uzorcima tumorskog tkiva miševa koji su primali EE. Međutim, kao što je već objašnjeno, *BH3-only* proteini mogu neutralisati inhibitorno dejstvo BCL-2 na proces apoptoze i indukovati BAX/BAK aktivaciju što će dovesti do MOMP. Iako ekspresije proapoptotskog gena *Bak*, kao i *BH3-only* gena *Bbc3 (Puma)* i *Pmaip1 (Noxa)* nisu bile promenjene, zaključak je da EE pomera ravnotežu između proapoptotskih i

antiapoptotskih članova *Bcl-2* familije u stranu proapoptotskih, pri čemu verovatno veću ulogu ima represija antiapoptotskih članova od strane *BH3-only* članova nego direktna stimulacija proapoptotskih. Ovaj nalaz je u skladu sa sve većim brojem podataka iz literature koji ukazuju na to da tzv. *BH3-only* mimetici, farmakološka jedinjenja koja se ponašaju kao istoimeni proteini, postižu značajan uspeh u kliničkoj terapiji akutne mijeloidne, hronične mijeloidne i hronične limfoblastne leukemije, a veliki je broj kliničkih studija I i II faze koji ispituju njihovu efikasnost kod solidnih tumora [223]. EE je takođe indukovao i transkripciju gena *Apa1*, čiji proizvod zajedno sa citohromom c koji se pri aktivaciji unutrašnjeg puta apoptoze oslobađa iz međumembranskog prostora mitohondrija, i prokaspazom 9, formira apoptozom i dalje inicira aktivaciju kaspazne kaskade [224]. Značajno je i da je nivo iRNK za tumor-supresorni protein PTEN bio povećan u tkivu tumora miševa koji su dobijali EE. PTEN svoju ulogu ostvaruje inhibicijom AKT/MTOR signalnog puta što za posledicu ima inhibiciju metaboličkih procesa, progresije ćelijskog ciklusa, ćelijskog preživljavanja i sinteze proteina, kao i pokretanje apoptoze [225,226], te se stoga smatra da je njegova modulacija validna meta u terapiji malignih bolesti. Nivoi ekspresije gena *Cdkn1a* i gena *Cdkn1b*, inhibitora ciklin-zavisne kinaze, bili su povećani u tumorskom tkivu životinja koje su primale EE u odnosu na one koje nisu. Ova dva gena kodiraju proteine koji inhibiraju progresiju ćelijskog ciklusa, i to prelazak iz G₁ u S fazu. Protein CDKN1A, koji se u literaturi obeležava i kao P21, svoje biološko dejstvo ostvaruje inhibicijom ciklin-zavisne kinaze 2 (CDK2) a kako ima i direktni inhibitorski efekat na replikaciju DNK može se smatrati tumor-supresorom. Direktna uloga ovog proteina u apoptozi je nejasna jer iako postoje dokazi da pokazuje antiapoptotske efekte, sa druge strane može i aktivirati apoptozu P53-zavisnim ili P53-nezavisnim uticajem na povećanje ekspresije BAX proteina, uticajem na mehanizme popravke DNK, ili P53-nezavisnim mehanizmom koji je povezan sa osetljivošću mitohondrija na oksidativni stres [227–229]. Slično, CDKN1B (P27), svoju funkciju ostvaruje inhibicijom CDK2 i zaustavljanjem ćelijske proliferacije [230], pri čemu se zna da su nivoi ovog proteina sniženi u velikom broju visoko-letalnih karcinoma kod ljudi, kao i da je njegov nizak nivo u vezi sa lošijom prognozom i lošijim odgovorom na terapiju [231]. Ekspresija *Birc5* gena čiji proteinski proizvod survivin spada u grupu proteina inhibitora

apoptoze je takođe povećana u melanomskom tkivu životinja koje su primale EE. Survivin svoje dejstvo verovatno ostvaruje vezivanjem za i inhibiranjem CDKN1A [122], a kako je ekspresija i ovog gena povećana, moguće je da dolazi do njihove međusobne neutralizacije. Takođe, u literaturi se navodi da ovaj gen kod miševa nema tipične antiapoptotske funkcije [232], te se uzimajući u obzir prethodno navedeno može pretpostaviti da survivin u ovim okolnostima nema veću ulogu. Posmatrajući sve analizirane gene koji imaju veze sa apoptozom i ćelijskim ciklusom zajedno, može se zaključiti da EE aktivira genetsku mašineriju koja će za posledicu imati aktivaciju programirane ćelijske smrti. Potvrda da se apoptoza zaista i odigrava u tumorskom tkivu u *in vivo* okolnostima je dobijena i na proteinskom nivou, merenjem izvršne aktivisane kaspaze 3 čija je količina, očekivano, bila značajno veća u melanomima miševa koji su primali EE.

Analiza ekspresije gena koji su uključeni u proces autofagije u tumorskom tkivu je potvrdila *in vitro* rezultate kojima je pokazano da autofagija nema značajnu ulogu u mehanizmu ćelijske smrti koju EE pokreće. Naime, uočili smo trend u smislu povećanja ekspresije gena *Becn1* koji učestvuje u samom otpočinjanju autofagije, kao i gena *Atg4b* čiji je proizvod odgovoran za elongaciju fagofore, ali ove razlike nisu statistički značajne između kontrolne i grupe miševa koji su primali EE. Jedini gen čija je ekspresija bila značajno povećana u tumorima tretiranih miševa je *Atg7*. Proizvod ovog gena ima ulogu nalik E1-aktivirajućem i E2-konjugujućem enzimu koji učestvuje u obradi LC3-I proteina. Međutim, postoje podaci da ATG7 može imati uloge koje nisu povezane sa autofagijom, odnosno, da može da vezuje P53 i time reguliše ekspresiju *CDKN1A* [233], kao i da je u određenim okolnostima neophodan za pokretanje apoptoze [234,235]. U skladu sa rezultatima ekspresije gena povezanih sa autofagijom, i na proteinskom nivou je potvrđeno da EE ne utiče značajno na ovaj proces tj. da ne utiče na količinu beclin-1 proteina, kao ni LC3-II i p62 proteina.

Konačno, u ovom radu je ispitano i da li EE ima uticaj na formiranje i progresiju metastatske, uznapredovale bolesti, uspostavljanjem modela metastatskog plućnog melanoma kod miševa. Iako su *in vitro* rezultati pored jasno utvrđenog molekularnog mehanizma dejstva ukazali i na to da EE smanjuje migraciju B16 ćelija (*scratch* esej), uz pozitivne efekte u modelu primarnog melanoma, metastatski model bolesti nije dao očekivane rezultate. Metastatski model je uspostavljen

injektiranjem B16 ćelija u repnu venu životinja, pri čemu su životinje od tog dana u naredne dve nedelje primale EE. Odlučili smo da životinje primaju ispitivano jedinjenje odmah nakon ubrizgavanja ćelija iako to u potpunosti ne odgovara prirodnom toku bolesti kod ljudi, jer se smatra da je kod pretkliničkog ispitivanja novih agenasa od većeg značaja rano davanje potencijalnog leka a u cilju boljeg razumevanja svih efekata koje on izaziva [76]. Pokazali smo da EE nije imao uticaj na ponašanje i telesnu masu životinja u toku trajanja eksperimenta, ali nije ni doveo do smanjenja broja metastatskih nodusa u plućima miševa koji su prebrojani po završetku eksperimenta. Moguća su bar dva razloga zbog kojih ovaj rezultat nije u potpunosti obeshrabrujući. Pre svega, u ovom istraživanju, najpre zbog tehničkih ograničenja, nije ispitan uticaj EE-a na ukupno vreme preživljavanja životinja sa metastatskom bolešću. Smatra se da je dužina preživljavanja životinja glavni parametar koji treba pratiti u ovom tipu ispitivanja. Naime, bez obzira na opisane molekularne mehanizme dejstva, uticaj na objektivni broj i raširenost tumorskih promena, produženje života je kranji ishod čiji bi pozitivni rezultat najbolje mogao da se prenese na kliničke okolnosti gde je izlečenje pacijenata sa uznapredovalim melanomom neočekivano a cilj terapije stoga upravo produženje života. Takođe, nismo bili u prilici da ispitamo molekularne efekte do kojih potencijalno EE dovodi u metastatskim promenama. Utvrđivanjem prisustva različitih mehanizama ćelijske smrti u sekundarnim depozitima bi bilo moguće bolje razumeti odgovor ćelija melanoma na EE. Modulacijom ovih procesa, promenom doze i/ili sheme doziranja, kao i kombinacijom sa drugim agensima koji se koriste u terapiji melanoma visokog stadijuma (što je standard u terapiji) bi se možda dobio efekat vredan pažnje. Stiče se utisak da utvrđeni efekti EE-a otvaraju prostor za dalja istraživanja u ovoj oblasti koja bi mogla doprineti aktuelnim naporima u razvoju novog antimelanomskog agensa koji bi imao bolje karakteristike od onih koji su trenutno u upotrebi.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci ovog istraživanja:

1. EE deluje citotoksično na B16 ćelije melanoma miša.

EE je citotoksičan i za ćelije humanog melanoma pri čemu su tumorske ćelije osetljivije u odnosu na makrofage miša, odnosno humane plućne fibroblaste i humane keratinocite, što sugerira selektivnost u delovanju EE-a.

2. EE indukuje apoptozu koja je posredovana kaspazama u B16 ćelijama melanoma miša.

Molekularni mehanizam *in vitro* dejstva EE-a podrazumeva brzu depolarizaciju mitohondrija praćenu povećanom produkcijom slobodnih kiseoničnih radikala, zatim aktivaciju kaspaza, eksternalizaciju fosfatidil serina na ćelijskoj membrani i konačno fragmentaciju DNK, što je praćeno morfološkim znacima apoptoze. Nekroza nije primarni mehanizam smrti koji EE pokreće, a autofagija ne posreduje u citotoksičnim efektima EE-a na ćelijama melanoma miša.

3. EE pokazuje antitumorski efekat na modelu supkutanog melanoma miša dok na metastatsku bolest ne ostvaruje značajan efekat.

EE smanjuje rast supkutanog melanoma i antimelanomsko dejstvo ostvaruje promenom ekspresije gena *Bcl-2* familije i aktivacijom kaspaza što pokreće apoptozu, ne utičući na proces autofagije. EE ne smanjuje broj sekundarnih plućnih depozita na modelu metastatskog mišjeg melanoma.

7. LITERATURA

-
- [1] Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. *Eur J Cancer* 2012;**48**:2375–90.
 - [2] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. *Atlanta: American Cancer Society*; 2016.
 - [3] Gorantla VC, Kirkwood JM. State of Melanoma. An Historic Overview of a Field in Transition. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014;**28**:415–35.
 - [4] Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Müller T, et al. Schwann Cell Precursors from Nerve Innervation Are a Cellular Origin of Melanocytes in Skin. *Cell* 2009;**139**:366–79.
 - [5] Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymilska A. Skin melanocytes: Biology and development. *Postep Dermatologii I Alergol* 2013;**30**:30–41.
 - [6] Hirobe T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;**24**:462–78.
 - [7] Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Investig* 2017;**97**:649–56.
 - [8] Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 2014;**346**:945–9.
 - [9] García-Borrón JC, Olivares Sánchez MC. Biosynthesis of Melanins. In: Borovanský J, Riley P., editors. *Melanins Melanosomes Biosynthesis, Biog. Physiol. Pathol. Funct.*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011, p. 87–116.
 - [10] Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009;**22**:563–79.
 - [11] Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007;**445**:843–50.
 - [12] Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005;**41**:2040–59.
 - [13] Lancaster HO. Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans. *Med J Aust* 1956;**43**:1082–7.
 - [14] Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 2012;**26**:1131–55.
 - [15] Marzuka-Alcalá A, Gabree MJ, Tsao H. Melanoma Susceptibility Genes and Risk Assessment. *Methods Mol. Biol.*, vol. 1102, 2014, p. 381–93.
 - [16] Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 2011;**480**:99–103.
 - [17] Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, et al. PLA2G6 variant

- in Parkinson's disease. *J Hum Genet* 2011;**56**:401–3.
- [18] Ogbah Z, Badenas C, Harland M, Puig-Butille JA, Elliot F, Bonifaci N, et al. Evaluation of PAX3 genetic variants and nevus number. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;**26**:666–76.
- [19] Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ. CDKN2A (P16(INK4a)) and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;**25**:339–48.
- [20] Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic Alterations in Signaling Pathways in Melanoma. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:2301s–2307s.
- [21] Malumbres M, Barbacid M. Timeline: RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:459–65.
- [22] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;**417**:949–54.
- [23] Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *N Engl J Med* 2005;**353**:2135–47.
- [24] Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, Evans P, Pornputtpong N, Wu C, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet* 2015;**47**:996–1002.
- [25] Rajkumar S, Watson IR. Molecular characterisation of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies. *Br J Cancer* 2016;**115**:145–55.
- [26] Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015;**161**:1681–96.
- [27] Taylor J-S. The dark side of sunlight and melanoma. *Science (80-)* 2015;**347**:824–824.
- [28] Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med* 2015;**373**:1926–36.
- [29] Sanborn JZ, Chung J, Purdom E, Wang NJ, Kakavand H, Wilmott JS, et al. Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**:10995–1000.
- [30] Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, Treacy D, Trombetta JJ, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 2016;**352**:189–96.
- [31] Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;**4**:a011254.
- [32] Solus JF, Kraft S. Ras, raf, and MAP kinase in melanoma. *Adv Anat Pathol* 2013;**20**:217–26.
- [33] Davies M a. The Role of the PI3K-AKT Pathway in Melanoma. *Cancer J*

- 2012;**18**:142–7.
- [34] Polivka J, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther* 2014;**142**:164–75.
- [35] MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2009;**20 Suppl 6**:vi1–7.
- [36] Higgins HW, Lee KC, Galan A, Leffell DJ. Melanoma in situ: Part I. Epidemiology, screening, and clinical features. *J Am Acad Dermatol* 2015;**73**:181–90.
- [37] Rigel DS. Epidemiology of Melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 2010;**29**:204–9.
- [38] Caini S, Gandini S, Sera F, Raimondi S, Fargnoli MC, Boniol M, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *Eur J Cancer* 2009;**45**:3054–63.
- [39] Watts CG, Madronio C, Morton RL, Goumas C, Armstrong BK, Curtin A, et al. Clinical Features Associated With Individuals at Higher Risk of Melanoma. *JAMA Dermatology* 2017;**153**:23.
- [40] Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous Melanomas Associated With Nevi. *Arch Dermatol* 2003;**139**:1620.
- [41] Fears TR, Scotto J, Schneiderman MA. Mathematical models of age and ultraviolet effects on the incidence of skin cancer among whites in the United States. *Am J Epidemiol* 1977;**105**:420–7.
- [42] McGovern VJ. Epidemiological aspects of melanoma: a review. *Pathology* 1977;**9**:233–41.
- [43] Holman CD, Armstrong BK, Heenan PJ. A theory of the etiology and pathogenesis of human cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1983;**71**:651–6.
- [44] Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* 2001;**12**:69–82.
- [45] Garibyan L, Fisher DE. How Sunlight Causes Melanoma. *Curr Oncol Rep* 2010;**12**:319–26.
- [46] Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin* 1985;**35**:130–51.
- [47] Neila J, Soyer HP. Key points in dermoscopy for diagnosis of melanomas, including difficult to diagnose melanomas, on the trunk and extremities. *J Dermatol* 2011;**38**:3–9.
- [48] Bichakjian CK, Halpern AC, Johnson TM, Foote Hood A, Grichnik JM, Swetter SM, et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2011;**65**:1032–47.
- [49] Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*

- 2009;**27**:6199–206.
- [50] Ahmed MI, Koon HB. What is the role of chemotherapy in the treatment of melanoma? *Curr Treat Options Oncol* 2014;**15**:321–35.
- [51] Agha A, Tarhini AA. Adjuvant Therapy for Melanoma. *Curr Oncol Rep* 2017;**19**:36.
- [52] Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011;**17**:4550–7.
- [53] Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 2009;**229**:5–11.
- [54] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 2010;**363**:711–23.
- [55] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 2012;**366**:2443–54.
- [56] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med* 2011;**364**:2507–16.
- [57] Hauschild A, Grob J-J, Demidov L V, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 2012;**380**:358–65.
- [58] Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012;**366**:707–14.
- [59] Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, et al. Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. *Cell* 2010;**140**:209–21.
- [60] Damia G, D'Incalci M. Contemporary pre-clinical development of anticancer agents - What are the optimal preclinical models? *Eur J Cancer* 2009;**45**:2768–81.
- [61] Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2010;**10**:241–53.
- [62] Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 1953;**97**:695–710.
- [63] ATCC. American Type Culture Collection;
www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines
- [64] ECACC. European Collection of Authenticated Cell Cultures;

- www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc
- [65] DSMZ. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; www.dsmz.de
- [66] Gillet J-P, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 2013;**105**:452–8.
- [67] Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;**483**:603–7.
- [68] Martell RE, Brooks DG, Wang Y, Wilcoxon K. Discovery of novel drugs for promising targets. *Clin Ther* 2013;**35**:1271–81.
- [69] Unger FT, Witte I, David KA. Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2015;**72**:729–57.
- [70] Schreiber-Brynzak E, Klapproth E, Unger C, Lichtscheidl-Schultz I, Göschl S, Schweighofer S, et al. Three-dimensional and co-culture models for preclinical evaluation of metal-based anticancer drugs. *Invest New Drugs* 2015;**33**:835–47.
- [71] Das V, Bruzzese F, Konečný P, Iannelli F, Budillon A, Hajdúch M. Pathophysiologically relevant in vitro tumor models for drug screening. *Drug Discov Today* 2015;**20**:848–55.
- [72] Van Dyke T, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 2002;**108**:135–44.
- [73] Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation. *Eur J Cancer* 2004;**40**:852–7.
- [74] Singh M, Johnson L. Using genetically engineered mouse models of cancer to aid drug development: an industry perspective. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:5312–28.
- [75] Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol* 2014;**87**:150–61.
- [76] Wartha K, Herting F, Hasmann M. Fit-for purpose use of mouse models to improve predictivity of cancer therapeutics evaluation. *Pharmacol Ther* 2014;**142**:351–61.
- [77] Polin L, Corbett TH, Roberts BJ, Lawson AJ, Leopold WR, White K, et al. Transplantable Syngeneic Rodent Tumors: Solid Tumors in Mice. Tumor Model. Cancer Res., Totowa, NJ: Humana Press; 2011, p. 43–78.
- [78] Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther* 2006;**5**:2435–43.
- [79] Olive KP, Tuveson DA. The Use of Targeted Mouse Models for Preclinical Testing of Novel Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:5277–87.
- [80] DeRose YS, Wang G, Lin Y-C, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MTW, et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med* 2011;**17**:1514–

- 20.
- [81] Human Melanoma Cell lines CLS Cell Lines Service; www.clsgmbh.de/c384_Humane_Zelllinien_Haut-Tumorze
- [82] Melanoma Cell Lines ESTDAB; www.phe-culturecollections.org.uk
- [83] The Wistar Institute. Melanoma Cell Lines; www.rockland-inc.com/patient-derived-melanoma-cell-lines
- [84] Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol* 1973;**242**:148–9.
- [85] Damsky Jr WE, Bosenberg M. Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;**23**:853–9.
- [86] Overwijk WW, Restifo NP. *B16 as a Mouse Model for Human Melanoma*. 2001.
- [87] Liu Z, Delavan B, Roberts R, Tong W. Lessons Learned from Two Decades of Anticancer Drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2017;**38**:852–72.
- [88] Jain M V., Paczulla AM, Klonisch T, Dingba FN, Rao SB, Roberg K, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: Implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med* 2013;**17**:12–29.
- [89] Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005;**12**:1463–7.
- [90] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009;**16**:3–11.
- [91] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 2015;**22**:58–73.
- [92] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012;**19**:107–20.
- [93] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;**9**:231–41.
- [94] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;**26**:239–57.
- [95] Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007;**14**:1237–43.
- [96] Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998;**5**:551–62.
- [97] Lüthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2007;**14**:641–50.

-
- [98] Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Alessia Garufi, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 2016;**8**:603–19.
- [99] Fulda S, Debatin K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;**25**:4798–811.
- [100] Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 2012;**31**:5045–60.
- [101] Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J* 2009;**23**:1625–37.
- [102] Larsen BD, Sørensen CS. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS J* 2017;**284**:1160–70.
- [103] Green DR, Kroemer G. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science (80-)* 2004;**305**:626–9.
- [104] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev* 2007;**87**:99–163.
- [105] Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;**6**:1067–74.
- [106] Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenameele P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 2002;**9**:358–61.
- [107] Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 2004;**384**:201–32.
- [108] Forsberg J, Zhivotovsky B, Olsson M. Caspase-2: An orphan enzyme out of the shadows. *Oncogene* 2017;**36**:5441–4.
- [109] Feltham R, Vince JE, Lawlor KE. Caspase-8: not so silently deadly. *Clin Transl Immunol* 2017;**6**:e124.
- [110] Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget* 2017;**8**:23996–4008.
- [111] Sakamaki K, Imai K, Tomii K, Miller DJ. Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. *BioEssays* 2015;**37**:767–76.
- [112] Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ* 2017;**24**:1380–9.
- [113] Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2007;**14**:32–43.
- [114] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Booth CJ, Mehal WZ, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 2006;**311**:847–51.
- [115] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;**15**:49–63.

-
- [116] Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 2017;1–16.
- [117] Cosentino K, García-Sáez AJ. Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends Cell Biol* 2017;27:266–75.
- [118] Sevrioukova IF. Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:2545–79.
- [119] Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95–9.
- [120] Saleem M, Qadir MI, Perveen N, Ahmad B, Saleem U, Irshad T, et al. Inhibitors of Apoptotic Proteins: New Targets for Anticancer Therapy. *Chem Biol Drug Des* 2013;82:243–51.
- [121] Dohi T, Xia F, Altieri DC. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell* 2007;27:17–28.
- [122] Altieri DC. Survivin – The inconvenient IAP. *Semin Cell Dev Biol* 2015;39:91–6.
- [123] LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008;27:6252–75.
- [124] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144:646–74.
- [125] Lee SH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Park WS, Kim SY, et al. Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 2001;20:399–403.
- [126] Kim MS, Kim SS, Yoo NJ, Lee SH. Rare somatic mutation of pro-apoptotic BAX and BAK genes in common human cancers. *Tumori* 2012;98:149e–51e.
- [127] Fox JL, MacFarlane M. Targeting cell death signalling in cancer: minimising “Collateral damage”. *Br J Cancer* 2016;115:5–11.
- [128] Denton D, Xu T, Kumar S. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol Cell Biol* 2015;93:35–42.
- [129] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005;12:1542–52.
- [130] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:124–31.
- [131] Wirawan E, Berghe T Vanden, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 2012;22:43–61.
- [132] Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2420–34.
- [133] Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 2011;7:673–82.
- [134] Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen E-L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2009;5:1180–5.

-
- [135] Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. The Intriguing Life of Autophagosomes. *Int J Mol Sci* 2012;**13**:3618–35.
- [136] Yang Z, Klionsky DJ. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 335, 2009, p. 1–32.
- [137] Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009;**20**:1981–91.
- [138] Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* 2006;**119**:259–70.
- [139] Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**:211–6.
- [140] Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 2010;**29**:1792–802.
- [141] Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 2004;**117**:4837–48.
- [142] Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 2012;**32**:2–11.
- [143] Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JHPM, Dubbelhuis PF, Helmond MTJ, Codogno P, et al. AMP-activated Protein Kinase and the Regulation of Autophagic Proteolysis. *J Biol Chem* 2006;**281**:34870–9.
- [144] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014;**20**:460–73.
- [145] Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, et al. Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell* 2005;**120**:237–48.
- [146] Boya P, Gonzalez-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005;**25**:1025–40.
- [147] Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 2013;**4**:e838.
- [148] Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007;**117**:326–36.
- [149] Aita VM, Liang XH, Murty V V, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999;**59**:59–65.
- [150] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by

- necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;**418**:191–5.
- [151] Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci* 2010;**67**:1567–79.
- [152] Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000;**1**:489–95.
- [153] He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell* 2009;**137**:1100–11.
- [154] Moquin DM, McQuade T, Chan FK-M. CYLD Deubiquitinates RIP1 in the TNF α -Induced Necrosome to Facilitate Kinase Activation and Programmed Necrosis. *PLoS One* 2013;**8**:e76841.
- [155] Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2014;**35**:14–23.
- [156] Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, Choksi S, Li Q, Luo J, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci* 2012;**109**:5322–7.
- [157] Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: An overview. *Cell Death Differ* 2017;**24**:1184–95.
- [158] Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang H-C, Choksi S, Liu J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* 2014;**16**:55–65.
- [159] Huang D, Zheng X, Wang Z-A, Chen X, He W-T, Zhang Y, et al. The MLKL Channel in Necroptosis Is an Octamer Formed by Tetramers in a Dyadic Process. *Mol Cell Biol* 2017;**37**:e00497-16.
- [160] Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang L-F, et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* 2014;**54**:133–46.
- [161] Krysko O, Aaes TL, Kagan VE, D'Herde K, Bachert C, Leybaert L, et al. Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. *Immunol Rev* 2017;**280**:207–19.
- [162] Wang T, Jin Y, Yang W, Zhang L, Jin X, Liu X, et al. Necroptosis in cancer: An angel or a demon? *Tumor Biol* 2017;**39**:101042831771153.
- [163] Seifert L, Werba G, Tiwari S, Gao Ly NN, Allothman S, Alqunaibit D, et al. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature* 2016;**532**:245–9.
- [164] Liu X, Zhou M, Mei L, Ruan J, Hu Q, Peng J, et al. Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget* 2016;**7**:22219–33.
- [165] Strilic B, Yang L, Albarrán-Juárez J, Wachsmuth L, Han K, Müller UC, et al. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* 2016;**536**:215–8.

- [166] Muhammad N, Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol* 2014;**19**:144–53.
- [167] Nardon C, Boscutti G, Fregona D. Beyond platinum: gold complexes as anticancer agents. *Anticancer Res* 2014;**34**:487–92.
- [168] Leon I, Cadavid-Vargas J, Di Virgilio A, Etcheverry S. Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: A New Class of Nonplatinum Metallo-drugs with Anticancer Activity. *Curr Med Chem* 2017;**24**:112–48.
- [169] Mihajlović LE, Savić A, Poljarević J, Vucković I, Mojić M, Bulatović M, et al. Novel methylene modified cyclohexyl ethylenediamine-N,N'-diacetate ligands and their platinum(IV) complexes. Influence on biological activity. *J Inorg Biochem* 2012;**109**:40–8.
- [170] Kaludžerović GN, Miljković D, Momčilović M, Djinović VM, Stojković MM, Sabo TJ, et al. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer* 2005;**116**:479–86.
- [171] Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Mirkov I, Stošić-Grujičić S, Miljković D, Sabo TJ, et al. Melanoma tumor inhibition by tetrachlorido(O,O'-dibutyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propionate)platinum(IV) complex: in vitro and in vivo investigations. *Metallomics* 2012;**4**:1155.
- [172] Krajčinović BB, Kaludžerović GN, Steinborn D, Schmidt H, Wagner C, Žižak Ž, et al. Synthesis and in vitro antitumoral activity of novel O,O'-di-2-alkyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoate ligands and corresponding platinum(II/IV) complexes. *J Inorg Biochem* 2008;**102**:892–900.
- [173] Kaludžerović GN, Dinović VM, Juranić ZD, Stanojković TP, Sabo TJ. Activity of some platinum(II/IV) complexes with O,O-n-butyl- and O,O-n-pentyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoate and halogeno ligands against HeLa and K562 cell lines and human PBMC. *J Inorg Biochem* 2005;**99**:488–96.
- [174] Sabo TJ, Kaludžerović GN, Poletti D, Karanović L, Boccarelli A, Cannito F, et al. Cytotoxicity of some platinum(IV) complexes with ethylenediamine-N,N'-di-3-propionate ligand. *J Inorg Biochem* 2004;**98**:1378–84.
- [175] Pantelić N, Zmejkovski BB, Trifunović-Macedoljan J, Savić A, Stanković D, Damjanović A, et al. Gold(III) complexes with esters of cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem* 2013;**128**:146–53.
- [176] Misirlić Dencić S, Poljarević J, Vilimanovich U, Bogdanović A, Isaković AJ, Kravić Stevović T, et al. Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropanoic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. *Chem Res Toxicol* 2012;**25**:931–9.
- [177] Lazić JM, Vucićević L, Grgurić-Sipka S, Janjetović K, Kaludžerović GN, Misirkić M, et al. Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem* 2010;**5**:881–9.
- [178] Misirlić Denčić S, Poljarević J, Isaković AM, Marković I, Sabo TJ, Grgurić-Šipka

- S. Antileukemic action of novel diamine Pt(II) halogenido complexes: Comparison of the representative novel Pt(II) with corresponding Pt(IV) complex. *Chem Biol Drug Des* 2017;**90**:262–71.
- [179] Masters JR, Stacey GN. Changing medium and passaging cell lines. *Nat Protoc* 2007;**2**:2276–84.
- [180] Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015;**111**:A3.B.1–3.
- [181] Yang T-T, Sinai P, Kain SR. An Acid Phosphatase Assay for Quantifying the Growth of Adherent and Nonadherent Cells. *Anal Biochem* 1996;**241**:103–8.
- [182] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;**65**:55–63.
- [183] Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 2006;**1**:1112–6.
- [184] Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. In: Snow A, Lenardo M, editors. *Methods Mol. Biol. (Methods Protoc. vol. 979, Totowa, NJ: Humana Press; 2013, p. 65–70.*
- [185] Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006;**1**:1458–61.
- [186] Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016;**2016**:pdb.prot087288.
- [187] Thomé MP, Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Migliavaca CB, Onzi GR, Felipe KB, et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci* 2016;**129**.
- [188] Gülден M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H. Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Biol Med* 2010;**49**:1298–305.
- [189] Minamikawa T, Williams DA, Bowser DN, Nagley P. Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Exp Cell Res* 1999;**246**:26–37.
- [190] Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;**2**:329–33.
- [191] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248–54.
- [192] van Tonder A, Joubert AM, Cromarty A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* 2015;**8**:47.

-
- [193] Developmental therapeutic program NCI/NIH 2015.
- [194] Alemón-Medina R, Bravo-Gómez ME, Gracia-Mora MI, Ruiz-Azuara L. Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells. *Toxicol Vitro* 2011;25:868–73.
- [195] Challa S, Chan FK-M. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:3241–53.
- [196] Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun* 2017;8:14128.
- [197] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5:331–42.
- [198] Kumar A, Malik F, Bhushan S, Sethi VK, Shahi AK, Kaur J, et al. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chem Biol Interact* 2008;171:332–47.
- [199] Berger AB, Sexton KB, Bogyo M. Commonly used caspase inhibitors designed based on substrate specificity profiles lack selectivity. *Cell Res* 2006;16:961–3.
- [200] Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014;740:364–78.
- [201] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* 2014;94:909–50.
- [202] Ozpolat B, Benbrook DM. Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments. *Cancer Manag Res* 2015;7:291–9.
- [203] Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011;25:460–70.
- [204] Bosnjak M, Ristic B, Arskin K, Mircic A, Suzin-Zivkovic V, Perovic V, et al. Inhibition of mTOR-dependent autophagy sensitizes leukemic cells to cytarabine-induced apoptotic death. *PLoS One* 2014;9:e94374.
- [205] Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *J Cell Mol Med* 2009;13:3644–54.
- [206] Lin C-J, Lee C-C, Shih Y-L, Lin C-H, Wang S-H, Chen T-H, et al. Inhibition of Mitochondria- and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy Augments Temozolomide-Induced Apoptosis in Glioma Cells. *PLoS One* 2012;7:e38706.
- [207] Misirkic M, Janjetovic K, Vucicevic L, Tovilovic G, Ristic B, Vilimanovich U, et al. Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro antiglioma effect of simvastatin. *Pharmacol Res* 2012;65:111–9.
- [208] Isakovic AM, Dulovic M, Markovic I, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V,

- Trajkovic V, et al. Autophagy suppression sensitizes glioma cells to IMP dehydrogenase inhibition-induced apoptotic death. *Exp Cell Res* 2017;**350**:32–40.
- [209] Rangwala R, Leone R, Chang YC, Fecher LA, Schuchter LM, Kramer A, et al. Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* 2014;**10**:1369–79.
- [210] Mahalingam D, Mita M, Sarantopoulos J, Wood L, Amaravadi RK, Davis LE, et al. Combined autophagy and HDAC inhibition: a phase I safety, tolerability, pharmacokinetic, and pharmacodynamic analysis of hydroxychloroquine in combination with the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced solid tumors. *Autophagy* 2014;**10**:1403–14.
- [211] Rangwala R, Chang YC, Hu J, Algazy KM, Evans TL, Fecher LA, et al. Combined MTOR and autophagy inhibition: phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* 2014;**10**:1391–402.
- [212] Ristic B, Bosnjak M, Arsikin K, Mircic A, Suzin-Zivkovic V, Bogdanovic A, et al. Idarubicin induces mTOR-dependent cytotoxic autophagy in leukemic cells. *Exp Cell Res* 2014;**326**:90–102.
- [213] Di X, Shiu RP, Newsham IF, Gewirtz DA. Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to Adriamycin. *Biochem Pharmacol* 2009;**77**:1139–50.
- [214] Manov I, Pollak Y, Broneshter R, Iancu TC. Inhibition of doxorubicin-induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib - the role of extracellular signal-regulated kinase counteraction. *FEBS J* 2011;**278**:3494–507.
- [215] Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. P62/SQSTM1/A170: Physiology and pathology. *Pharmacol Res* 2012;**66**:457–62.
- [216] Surcel M, Constantin C, Caruntu C, Zurac S, Neagu M. Inflammatory Cytokine Pattern Is Sex-Dependent in Mouse Cutaneous Melanoma Experimental Model. *J Immunol Res* 2017;**2017**:1–10.
- [217] Simon SR, Ershler WB. Hormonal influences on growth of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1985;**74**:1085–8.
- [218] Lyman GH, Allcott K, Garcia J, Stryker S, Li Y, Reiner MT, et al. The effectiveness and safety of same-day versus next-day administration of long-acting granulocyte colony-stimulating factors for the prophylaxis of chemotherapy-induced neutropenia: a systematic review. *Support Care Cancer* 2017;**25**:2619–29.
- [219] Zhang X, Chuai Y, Nie W, Wang A, Dai G. Thrombopoietin receptor agonists for prevention and treatment of chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with solid tumours. *Cochrane Database Syst Rev* 2017.
- [220] Goubran H, Seghatchian J, Prokopchuk-Gauk O, Radosevic J, Sabry W, Iqbal N, et al. Reflections on multiple strategies to reduce transfusion in cancer patients: A joint narrative. *Transfus Apher Sci* 2017;**56**:322–9.

-
- [221] Perazella MA, Moeckel GW. Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: Clinical manifestations, pathobiology, and prevention/therapy. *Semin Nephrol* 2010;**30**:570–81.
- [222] Kirkland RA, Franklin JL. Bax, reactive oxygen, and cytochrome c release in neuronal apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 2003;**5**:589–96.
- [223] Adams JM, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ* 2017:1–10.
- [224] Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 2013;**21**:501–15.
- [225] McLoughlin NM, Mueller C, Grossmann TN. The Therapeutic Potential of PTEN Modulation: Targeting Strategies from Gene to Protein. *Cell Chem Biol* 2017:1–11.
- [226] Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;**13**:283–96.
- [227] Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prospero E. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxicol* 2014;**89**:155–78.
- [228] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:400–14.
- [229] Masgras I, Carrera S, De Verdier PJ, Brennan P, Majid A, Makhtar W, et al. Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. *J Biol Chem* 2012;**287**:9845–54.
- [230] Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. p27: A barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin Cancer Res* 2011;**17**:12–8.
- [231] Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;**8**:253–67.
- [232] Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, et al. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* 2000;**10**:1319–28.
- [233] Lee IH, Kawai Y, Fergusson MM, Rovira II, Bishop AJR, Motoyama N, et al. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science* 2012;**336**:225–8.
- [234] Kessel DH, Price M, Reiners JJ. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. *Autophagy* 2012;**8**:1333–41.
- [235] Walls KC, Ghosh AP, Franklin A V., Klocke BJ, Ballestas M, Shacka JJ, et al. Lysosome dysfunction triggers Atg7-dependent neural apoptosis. *J Biol Chem* 2010;**285**:10497–507.

BIOGRAFIJA

Dr Anđelka Isaković je rođena 21. decembra 1985. godine u Loznici. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je završila septembra 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Iste godine je upisala doktorske akademske studije na istom fakultetu, modul Molekularna medicina.

Od januara 2011. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik na integrativnom projektu Ministarstva nauke Republike Srbije 41025: "Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja" kojim rukovodi prof. dr Vladimir Trajković.

Od novembra 2012. godine je zaposlena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu najpre kao saradnik u nastavi, a od septembra 2014. godine kao asistent za užu naučnu oblast Medicinska i klinička biohemija. Učestvuje u svim oblicima nastave koje organizuje Katedra za medicinsku i kliničku biohemiju na srpskom i engleskom jeziku. Uspešno je završila kurs *Essential Skills in Medical Education* 2017 godine, u organizaciji Internacionalne asocijacije za medicinsku edukaciju (AMEE).

Dr Anđelka Isaković je bila mentor ili komentor 14 studentskih radova koji su prezentovani na kongresima studenata medicine u zemlji i inostranstvu od čega je jedan publikovan u celosti u studentskom časopisu Medicinski podmladak dok je jedan dobio nagradu Univerziteta u Beogradu za najbolji studentski rad u oblasti medicinskih nauka. Takođe, bila je i mentor dva diplomskih rada i jednom član komisije za odbranu diplomskog rada na matičnom fakultetu. Dr Isaković je bila član stručnih komisija na nacionalnim kongresima studenata medicine 2015-2017, kao i međunarodnog studentskog kongresa *Global Students' Conference* održanog u Beogradu 2017. godine. Dobitnik je zahvalnice Centra za stručni i naučno istraživački rad studenata (CSNIRS) 2015-2017, i zahvalnice Studentskog parlamenta Medicinskog fakulteta 2017. godine za uspešnu saradnju. Član je Inicijativnog odbora za osnivanje Parlamenta studenata doktorskih akademskih studija na Medicinskom fakultetu. Dr Isaković je član Uređivačkog odbora studentskog časopisa Medicinski podmladak od 2017. godine. Takođe, član je i više nacionalnih i međunarodnih stručnih i naučnih društava. Stručni je saradnik u Istraživačkoj stanici Petnica i promoter nauke na manifestacijama Noć istraživača i Festival nauke.

Dr Anđelka Isaković je autor u 10 radova koji su štampani u međunarodnim časopisima koji se nalaze na JCR listi od čega je na dva rada prvi autor. Ovi radovi su prema SCOPUS-u citirani 58 puta bez autocitata, a *h*-indeks je 4. Takođe, ona je autor u 34 rada koji su kao izvodi predstavljeni na međunarodnim i 12 radova koji su predstavljeni na domaćim naučnim skupovima.

Zdravstvenu specijalizaciju iz Laboratorijske medicine je upisala 2013. godine.

PRILOZI

Prilog I

Spisak skraćenica

A/A	antibiotik/antimikotik
AcP	kisela fosfataza
AH	amonijum hlorid
AIF	faktor koji indukuje apoptozu, engl. <i>Apoptosis-inducing factor</i>
ALP	alkalna fosfataza
AMP	adenozin monofosfat
AMPK	kinaza aktivirana adenozin monofosfatom
AO	akridin oranž
APAF-1	faktor 1 koji aktivira apoptotične proteaze, engl. <i>Apoptosis protease activating factor-1</i>
APS	amonijum persulfat
AST	aspartat amino transferaza
ATG	geni povezani sa autofagijom, engl. <i>Autophagy-related genes</i>
ATP	adenozin trifosfat
BAF	bafilomicin A1
BCL-2	B-ćelijski limfom 2, engl. <i>B-cell lymphoma-2</i>
BECN1	beklin-1
BH3	domen 3 Bcl-2 homologije, engl. <i>Bcl-2 homology domain 3</i>
BSA	albumin seruma govečeta, engl. <i>Bovine serum albumin</i>
CAD	DNAza aktivirana kaspazama, engl. <i>Caspase-activating DNase</i>
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
CCCP	karbonil cijanid 3-hlorofenilhidrazon
CDDP	cisplatin
CDK	ciklin-zavisna kinaza, engl. <i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNK	komplementarna DNK
CMA	autofagija posredovana šaperonima, engl. <i>Chaperone-mediated autophagy</i>
CREB	transkripcioni faktor engl. <i>cAMP response element binding protein</i>
Ct	prag analize ciklusa, engl. <i>Cycle of threshold</i>
CTLA-4	antigen 4 T-citotoksičnih limfocita, engl. <i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DAMP	molekularni obrazac povezan sa oštećenjem, engl. <i>damage-associated molecular pattern</i>
DCT	dopahrom tautomeraza, engl. <i>Dopachrome tautomerase</i>
DD	domen smrti, engl. <i>Death domain</i>
DHE	dihidroetidijum
DHI	dihidroksiindol
DHICA	DHI-2-karboksilna kiselina
DHR	dihidrorodamin
DISC	signalni kompleks koji indukuje smrt, engl. <i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	medijum za ćelijske kulture <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	dimetil sulfoksid
DNAza	dezoksiribonukleaza
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DOPA	dihidroksifenilalanin

EDTA	etilendiamin tetrasirćetna kiselina
EE	0,0-dietil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid
EndoG	endonukleaza G
ERK	kinaza regulisana vanćelijskim signalima, engl. <i>Extracelullar signal-regulated kinase</i>
FBS	fetalni goveđi serum, engl. <i>Fetal bovine serum</i>
FITC	fluorescein izotiocijanat
GABARAP	protein povezan sa receptorom gama-aminobuterne kiseline, engl. <i>GABA receptor associated protein</i>
GRB2	protein 2 vezan za receptor za faktor rasta, engl. <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3	kinaza 3 glikogen sintaze, engl. <i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GTP	guanozin trifosfat
HBSS	slani rastvor <i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HEPES	hidroksietil piperazinetansulfonska kiselina
HRP	peroksidaza rena, engl. <i>Horseradish peroxidase</i>
i.m.	intramuskularno
i.p.	intraperitonealno
IAP	protein inhibitor apoptoze, engl. <i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IC50	inhibitorna koncentracija 50
LC3	laki lanac 3 povezan sa mikrotubulima, engl. <i>Microtubule-associated light chain 3</i>
LDH	laktat dehidrogenaza
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenom, engl. <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	kinaza MAPK
MAPKKK	kinaza kinaze MAPK
MART-1	melaninski protein koji prepoznaju T ćelije 1, engl. <i>melanoma antigen recognised by T-cells 1</i>
MC1R	melanokortin 1 receptor, engl. <i>Melanocortin 1 receptor</i>
MEM	medijum za ćelijske kulture <i>Minimum Essential Medium</i>
MITF	transkripcioni faktor povezan sa mikroftalmijom, engl. <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
MLKL	pseudokinaza mešovitog porekla nalik kinaznom domenu, engl. <i>Mixed-lineage kinase domain-like pseudokinase</i>
MOMP	permeabilizacija spoljašnje mitohondrijalne membrane, engl. <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mTOR	kinaza mehanistička meta rapamicina, engl. <i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
OS	ukupno preživljavanje, engl. <i>Overall survival</i>
PARP-1	poli-ADP-ribozo-polimeraza-1
PBS	fiziološki rastvor sa dodatkom fosfata, engl. <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	reakcija lančanog umnožavanja
PD-1	programirana ćelijska smrt 1, engl. <i>programmed cell death-1</i>
PFS	preživljavanje bez progresije bolesti, engl. <i>Progress-free survival</i>
PI	propidijum jodid
PI3K	fosfatidil inozitol 3 kinaza, engl. <i>Phosphatidyl inositol 3 kinase</i>
PIC	koktel inhibitora proteaza
PIP3	fosfatidil inozitol 3,4,5 trifosfat
PMEL	premelanozomni protein
PMSF	fenilmetilsulfonyl fluorid

PNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfat
PS	fosfatidil serin
PTEN	fosfataza i tenzin homolog, engl. <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RIP	protein koji interreaguje sa receptorom, engl. <i>Receptor-interacting protein</i>
RIPA	esej radioimunoprecipitacije, engl. <i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNAza	ribonukleaza
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kiseonične vrste, engl. <i>Reactive oxygen species</i>
RPMI-1640	medijum za ćelijske kulture <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RR	odgovor na terapiju, engl. <i>Response rate</i>
RTK	receptorske tirozin kinaze
s.c.	supkutano
SCF	faktor stem ćelija, engl. <i>Stem cell factor</i>
sd	standardna devijacija
SDS	natrijum dodecil sulfat, engl. <i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SRB	sulforodamin B
TB	tripan plavo, engl. <i>Trypan blue</i>
TBS	Tris-puferovan slani rastvor
TBS-T	Tris-puferovan slani rastvor sa dodatkom Tween-a
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija
TEMED	tetrametil etildiamin
TERT	reverzna transkriptaza telomeraze, engl. <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TNF	faktor nekroze tumora, engl. <i>Tumor necrosis factor</i>
TSC	protein tuberozne skleroze, engl. <i>Tuberous sclerosis protein</i>
TYR	tirozinaza
TYRP1	protein 1 povezan sa tirozinazom, engl. <i>Tyrosinase-related protein 1</i>
ULK	kinaza slična Unc-51, engl. <i>Unc-51-like kinase</i>
UV	ultraljubičasto, engl. <i>Ultraviolet</i>
α-MSH	α-melanocitni stimulirajući hormon

Prilog II

Spisak korišćenih hemikalija i reagenasa

Hemikalija/reagens	Proizvođač, zemlja porekla
2-merkaptoetanol	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansumporna kiselina (HEPES)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Akridin oranž (AO)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Akrilamid/bisakrilamid	<i>Serva</i> , Nemačka
Albumin seruma govečeta (BSA)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Sjedinjene Američke Države
Amonijum hlorid	Zorka, Srbija
Amonijum persulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
<i>Annexin V-FITC</i> kit za bojenje	<i>R&D Systems</i> , Sjedinjene Američke Države
Antibiotik-antimikotik (Anti/Anti)	<i>GIBCO</i> , Velika Britanija
<i>ApoStat</i>	<i>R&D Systems</i> , Sjedinjene Američke Države
Bafilomicin A1	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Bromfenol plavo	<i>Serva</i> , Nemačka
<i>CaspGlow Fluorescein Active Caspase 3, 8, 9</i> ; kit za bojenje	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Sjedinjene Američke Države
Cisplatin (CDDP)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Dihidroetidijum (DHE)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Dihidrorodamin (DHR)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Dimetil sulfoksid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
DMEM medijum	<i>GIBCO</i> , Velika Britanija
<i>Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL)</i>	<i>GE Healthcare Life Sciences</i> , Sjedinjene Američke Države
EPON smole	<i>Agar Scientific</i> , Velika Britanija
Etanol	Zorka, Srbija
Etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Fenazin metosulfat	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Sjedinjene Američke Države
Fetalni goveđi serum (FBS)	PAA, Austrija
Fosforna kiselina (H ₃ PO ₄)	Zorka, Srbija
Glicerol	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Glicin	<i>Serva</i> , Nemačka
Glukoza	Zorka, Srbija
Glutamin	<i>GIBCO</i> , Velika Britanija
Glutaraldehid	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	PAA, Austrija
Hloroform	<i>Merck</i> , Sjedinjene Američke Države
Hlorovodonična kiselina (HCl)	Zorka, Srbija
IGEPAL CA-630	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države

Izopropanol	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Sjedinjene Američke Države
JC-1	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Kalijum dihidrogen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Zorka, Srbija
Kalijum hlorid (KCl)	Zorka, Srbija
Karbonil cijanid hlorfenil hidrazon (CCCP)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Koktel inhibitora proteaza (PIC)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Kozje anti-zečje antitelo na IgG obeleženo peroksidazom rena	<i>Jackson Immunoresearch</i> , Ujedinjeno Kraljevstvo
L-laktat	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
MEM medijum	<i>GIBCO</i> , Velika Britanija
Metanol	Zorka, Srbija
Natrijum acetat (Na-acetat)	<i>Lach-Ner</i> , Češka
Natrijum deoksiholat (Na-deoksiholat)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Natrijum dodecil sulfat (SDS)	<i>Serva</i> , Nemačka
Natrijum fluorid (NaF)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Natrijum hidrogen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	<i>Merck</i> , Sjedinjene Američke Države
Natrijum hidroksid (NaOH)	<i>Carlo Erba Reagents</i> , Italija
Natrijum hlorid (NaCl)	<i>Centrohema</i> , Srbija
Natrijum kakodilat	<i>Merck</i> , Sjedinjene Američke Države
Natrijum ortovanadat (NaV)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Natrijum piruvat (Na-piruvat)	<i>Capricorn Scientific</i> , Nemačka
<i>n</i> -butanol	Zorka, Srbija
Nemasno mleko u prahu	<i>Carl Roth</i> , Nemačka
Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD)	<i>Boehringer Ingelheim</i> , Nemačka
NP-40	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Osmijum tetroksid	<i>Spi-chem</i> , Sjedinjene Američke Države
Paraformaldehid	<i>Serva</i> , Nemačka
<i>p</i> -jodo-nitrotetrazolijum hlorid	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
<i>p</i> -nitro fenil fosfat (PNPP)	<i>Serva</i> , Nemačka
Prajmeri/probe za gene od interesa (<i>TaqMan</i>)	<i>Fermentas</i> , Litvanija
Propidijum jodid (PI)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Sjedinjene Američke Države
Proteinski marker za elektroforezu (Prestained Protein Marker)	<i>Cell Signaling Technology</i> , Sjedinjene Američke Države
Ribonukleaza (RNAza)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
RNAlater	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Sjedinjene Američke Države
RPMI 1640 medijum	<i>GIBCO</i> , Velika Britanija
Sirćetna kiselina	Zorka, Srbija
Smeša za reverznu transkripciju (nasumični heksameri, dNTP)	<i>Fermentas</i> , Litvanija
Smeša za umnožavanje DNK (<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i>)	<i>Fermentas</i> , Litvanija
Sulforodamin B (SRB)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Tetraetilmetilendiamin (TEMED)	<i>Serva</i> , Nemačka
Trihlorosirćetna kiselina	<i>ICN Pharmaceuticals</i> , Sjedinjene Američke Države
Tripan plavo (TB)	<i>ICN Pharmaceuticals</i> , Sjedinjene Američke Države

Tripsin	<i>Invitrogen</i> , Velika Britanija
Tris baza	<i>Serva</i> , Nemačka
Triton X-100	<i>ICN Pharmaceuticals</i> , Sjedinjene Američke Države
TRIzol	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
<i>Tween 20</i>	<i>Serva</i> , Nemačka
Vodonik peroksid (H ₂ O ₂)	Zorka, Srbija
Zečje antitelo na β-aktin	<i>Cell Signaling Technology</i> , Sjedinjene Američke Države
Zečje antitelo na beklin-1	<i>Cell Signaling Technology</i> , Sjedinjene Američke Države
Zečje antitelo na isečenu kaspazu 3	<i>Cell Signaling Technology</i> , Sjedinjene Američke Države
Zečje antitelo na kaspazu 3	<i>Cell Signaling Technology</i> , Sjedinjene Američke Države
Zečje antitelo na LC3	<i>Cell Signaling Technology</i> , Sjedinjene Američke Države
Zečje antitelo na p62	<i>BioLegend</i> , Sjedinjene Američke Države

Prilog III

Spisak opreme i potrošnog materijala

Oprema/materijal	Proizvođač, zemlja porekla	Tip
Autoklav		
Sušnica		
Laboratorijska vaga		
Laboratorijska analitička vaga		
Vodeno kupatilo		
Standardno laboratorijsko posuđe		
Kavezi za smeštaj životinja i podloga		
Pribor za disekciju		
Hrana za miševe		
Biološki sigurni kabinet, nivo zaštite II	<i>Gelaire, Australija</i>	<i>Gelaire Flow Laboratories TC 72</i>
Inkubator sa CO ₂	<i>Sanyo Electric Biomedical Co, Japan</i>	<i>Sanyo CO2 Incubator MCO-17AI</i>
Invertni mikroskop sa faznim kontrastom	<i>Leica Camera AG, Nemačka</i>	<i>Leica DM IL</i>
Digitalna kamera povezana sa mikroskopom	<i>Leica Camera AG, Nemačka</i>	<i>Leica DCF320</i>
Elektronski mikroskop	<i>FEI, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>Morgagni 268D</i>
Protočni citofluorimetar	<i>BD Biosciences, Nemačka</i>	<i>FACSCalibur</i>
Aparat za vizuelizaciju gelova i membrana	<i>BioRad Laboratories Inc, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>ChemiDoc XRS+</i>
ELISA spektrofotometar	<i>Tecan, Ujedinjeno Kraljevstvo</i>	<i>Sunrise</i>
Automatski hemoanalizator	<i>Abbott, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>Abbott CELL-DYN Ruby</i>
Automatski biohemijski analizator	<i>Abbott, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>Abbott Architect ci8200</i>
Aparat za reverznu transkripciju	<i>Eppendorf, Nemačka</i>	<i>Mastercycler Realplex</i>
Aparat za umnožavanje DNK u realnom vremenu	<i>Applied Biosystems, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>ABI Prism 7500 thermocycler</i>
Aparat za merenje koncentracije RNK	<i>GE Healthcare Life Sciences, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>GeneQuant pro</i>
Centrifuga	<i>Beckman Coulter, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>Allegra X-14</i>
Mini-centrifuga	<i>Eppendorf AG, Nemačka</i>	<i>MiniSpin</i>
Vorteks	<i>Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>IKA MS 1</i>
Rotirajuća podloga	<i>BioSan, Letonija</i>	<i>Multi Bio 3D</i>
Sistem za vertikalnu elektroforezu proteina	<i>BioRad Laboratories Inc, Sjedinjene Američke Države</i>	

Sistem za polu-suvi transfer proteina	<i>GE Healthcare Bio-Sciences, Sjedinjene Američke Države</i>	
Uređaj za kontrolu jačine i napona struje	<i>BioRad Laboratories Inc, Sjedinjene Američke Države</i>	
Automatske pipete	<i>Eppendorf, Nemačka</i>	
Multikanalne automatske pipete	<i>Eppendorf, Nemačka</i>	
Serološke pipete 5 ml, 10 ml, 25 ml	<i>Sarstedt, Nemačka</i>	
Sterilne epruvete sa poklopcem 50 ml, 15 ml	<i>Sarstedt, Nemačka</i>	
Epruvete za protočni citometar	<i>BD Biosciences, Nemačka</i>	
Mikroepruvete od 1,5 ml	<i>Eppendorf AG, Nemačka</i>	
Mikroepruvete od 0,5 ml	<i>Eppendorf AG, Nemačka</i>	
Mikroepruvete za zamrzavanje (engl. <i>crio-vial</i>)	<i>Eppendorf AG, Nemačka</i>	
Petri šolje za adherentne ćelijske kulture prečnika 10 mm, 6 mm	<i>Sarstedt, Nemačka</i>	
Ploče za adherentne ćelijske kulture sa 96 i 6 bunarića	<i>Sarstedt, Nemačka</i>	
Hemocitometar	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Nemačka</i>	<i>Neubauer-improved</i>
Nastavci za automatske pipete	<i>Eppendorf, Nemačka</i>	
Grebalice	<i>Sarstedt, Nemačka</i>	<i>Cell scraper</i>
Filter papir za imunoblot	<i>Munktell, Švedska</i>	
Nitrocelulozne membrane	<i>GE Healthcare Bio-Sciences, Sjedinjene Američke Države</i>	<i>Hybond ECL membranes</i>
Optičke ploče za PCR sa 96 bunara	<i>Sarstedt, Nemačka</i>	
Epruvete sa EDTA	<i>Greiner Bio-One GmbH, Austrija</i>	
Epruvete sa heparinom	<i>Greiner Bio-One GmbH, Austrija</i>	
Insulinski špricevi	<i>Nipro Corporation Ltd., Tajland</i>	

Prilog IV

Mišljenje Etičke komisije za zaštitu i dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
БРОЈ: 2490/2
ДАТУМ: 03.07.2015.
БЕОГРАД

На основу члана 33. и 34. Закона о добробити животиња (Сл. гласник РС бр.41/09), Правилника о спровођењу огледа на животињама и држању експерименталних животиња (Сл. гласник РС бр. 39/10.) и члана 15. Правилника за рад са експерименталним животињама Медицинског факултета у Београду, а на захтев научног радника др Анђелке Исаковић бр. 2490/1 од 05.05.2015. године, Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња на састанку одржаном 02.07.2015.године, издаје

МИШЉЕЊЕ

Коришћење експерименталних животиња у оквиру планираног огледа, ради израде докторске дисертације кандидата др Анђелке Исаковић под називом „Утицај новосинтетисаног органског једињења по типу циклохексил аналога етилендиамин дипропанске киселине на ћелије меланома *in vitro* и *in vivo*“, има етичку и научну оправданост спровођења огледа.

Напомена:

Степен инвазивности: Е

Председник
Етичке комисије за заштиту
добробити огледних животиња
Проф. др Соња Вучковић



Доставити:

- Управи за ветерину Министарства
за пољопривреду и водопривреду РС
- ✓ Етичком савету за добробити огледних животиња
Министарства за пољопривреду и водопривреду РС
- Етичкој комисији за добробити
огледних животиња

Prilog V

**Rešenje o odobrenju sprovođenja oglеda na životinjama Uprave за ветерину
Ministarstva пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије**



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ И
ЗАШТИТЕ ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ
-УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ-
Број: 323-07-06141/2015-05/8
Датум: 06.10.2015. године
Београд

Министарство пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије-Управа за ветерину, на основу члана 34. Закона о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09), члана 192. Закона о општем управном поступку ("Службени гласник СРЈ" бр. 33/97 и 31/2001 и "Службени гласник РС" бр. 30/2010) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије бр. 119-01-13/17/2015-09, од 26.03.2015., решавајући о захтеву Медицинског факултета, Универзитета у Београду за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, доноси:

РЕШЕЊЕ

УСВАЈА СЕ захтев Медицинског факултета, Универзитета у Београду, ул. др Суботића 8, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом:

"Утицај новосинтетисаног органског једињења по типу циклохексил аналога етилендиамин дипропанске киселине на ћелије маланома *in vitro* и *in vivo*".

Образложење

Медицински факултет, Универзитета у Београду, ул. др Суботића 8, Београд обратио се овом министарству дана 15.07.2015. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом "Утицај новосинтетисаног органског једињења по типу циклохексил аналога етилендиамин дипропанске киселине на ћелије маланома *in vitro* и *in vivo*".

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио документацију прописану Законом о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09) и Правилником о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10) и то: податке о називу и седишту правог лица, попуњен захтев за издавање решења о одобрењу

спровођења огледа на животињама, стручно мишљење Етичке комисије о спровођењу предметног огледа, Решење о упису у Регистар за огледе на животињама.

Предметни оглед је предат на мишљење Етичком савету за добробит огледних животиња, који је на састанку, одржаном дана 18.08.2015. године закључно да Образац захтева за одобрење спровођења огледа на животињама има недостатака, које је потребно допунити, па је тако Управа за ветерину, Министарства пољопривреде и заштите животне средине подносиоцу захтева послала допис за допуну поднеска, предмет бр. 323-07-06141/2015-05/2, дана 19.08.2015. године, као и дана 21.09.2015. године, предмет бр. 323-07-06141/2015-05/6. Након поднете допуне, од стране подносиоца захтева, предметни оглед је поново предат на разматрање Етичком савету. На састанку, одржаном дана 05.10.2015. године, након образложења од стране подносиоца захтева, Етички савет за добробит огледних животиња је донео позитивно мишљење за обављање предметног огледа.

Приликом решавања по захтеву, на основу увида у приложу документацију, утврђено је да су се стекли услови за доношење решења као у диспозитиву, сходно одредбама члана 192. Закона о општем управном поступку.

Поука о правном средству: Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор подношењем тужбе Управном суду Србије у року од 30 дана од дана пријема решења.



Доставити:

1. Медицински факултет, Универзитета у Београду, ул. др Суботића 8, 11000 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1а/4, 11000 Београд
3. Евиденција
4. Архива

Prilog VI

Izjave o autorstvu, istovetnosti elektronske i štampane verzije doktorskog rada i izjava o korišćenju

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Анђелка Исаковић

број уписа ММ08/10

Изјављујем

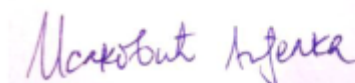
да је докторска дисертација под насловом

Утицај етил естра циклохексил аналога етилендиамин дипропанске киселине на
ћелије меланома миша *in vitro* и *in vivo*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 14. децембар 2017.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Анђелка Исаковић

Број уписа ММ08/10

Студијски програм молекуларна медицина

Наслов рада Утицај етил естра циклохексил аналога етилендиамин дипропанске киселине на ћелије меланома миша in vitro и in vivo

Ментор др Соња Мисирлић Денчић, доцент

Потписани Анђелка Исаковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 14. децембар 2017.

Исаковић Анђелка

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај етил естра циклохексил аналога етилендиамин дипропанске киселине на ћелије меланома миша in vitro и in vivo

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 14. децембар 2017.

