

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mirjana P. Dačević

**ULOGA PURINSKOG NUKLEOZIDNOG
ANALOGA - SULFINOZINA U INHIBICIJI
RASTA MALIGNIH ĆELIJA NEOSETLJIVIH
NA DEJSTVO HEMIOTERAPEUTIKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE**

Mirjana P. Dačević

**THE ROLE OF PURINE NUCLEOSIDE
ANALOG - SULFINOSINE IN GROWTH
INHIBITION OF CANCER CELLS
RESISTANT TO CLASSIC
CHEMOTHERAPEUTICS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

1. **Mentor:** dr Aleksandra Isaković, vanredni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. **Komentor:** dr Milica Pešić, naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Odeljenje za neurobiologiju

Komisija u sastavu:

Dr Ivanka Marković – vanredni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Miodrag Rakić – vanredni profesor, Klinika za neurohirurgiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Sabera Ruždijić – naučni savetnik u penziji

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova doktorska disertacija je delom rađena u Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Aleksandre Isaković. Disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br. III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetski balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“ čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković.

Doktorska disertacija je delom rađena i u Laboratoriji Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod rukovodstvom naučnog saradnika dr Milice Pešić. Disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br. 143009 „Identifikacija specifičnih gena za terapiju kancera“ kojim je rukovodila dr Sabera Ruždijić i u okviru integralnog i interdisciplinarnog istraživačkog projekta br. III 41031 pod nazivom „Identifikacija molekularnih markera za predikciju progresije tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti“ pod rukovodstvom dr Nikole Tanića.

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Aleksandri Isaković na ukazanom poverenju, bezrezervnoj ličnoj i profesionalnoj podršci i velikoj pomoći tokom izrade teze. Uvek optimističan stav, korisni saveti, stručna pomoć i neizmerna podrška učinili su rad na tezi znatno lakšim.

Veliku zahvalnost dugujem mom komentoru, naučnom saradniku dr Milici Pešić, na nesebičnoj stručnoj pomoći, prijateljskoj podršci i značajnim sugestijama, i što me je usmeravala i vodila kroz sve faze ove doktorske teze. Posebno se zahvaljujem na korisnim savetima i pomoći prilikom obrade eksperimentalnih rezultata i oblikovanja publikacija proisteklih iz teze.

Prof. dr Ivanki Marković sam zahvalna na korisnim savetima i sugestijama tokom finalne faze izrade ove teze i na spremnosti da me svojim savetima usmeri u budućim aktivnostima.

Zahvaljujem se prof. dr Miodragu Rakiću na korisnim savetima i sugestijama tokom finalne faze izrade ove teze.

Naučnom savetniku dr Saberi Ruždijić, zahvaljujem se pre svega na mogućnosti da sa njom sarađujem, na ukazanom poverenju i korisnim sugestijama tokom završne faze pisanja teze.

Ani Podolski Renić se zahvaljujem na pomoći tokom eksperimentalnog rada, kao i spremnosti da uvek konstruktivno učestvuje u rešavanju naučnih dilema.

Zorici Milošević na pomoći oko eksperimentalnog rada.

Dr Anđelki Isaković za pomoć prilikom eksperimentalnog rada sa imunoblot tehnikom.

Mojim dragim kolegama iz Galenike: Đorđu, Danki, Maji... na prijateljskoj podršci, nesebičnoj pomoći i uvek korisnim savetima.

Mojoj porodici Đorđu, Ani, Radmili i Mariji se zahvaljujem na velikoj podršci i radosti koju mi pružaju.

Uloga purinskog nukleozidnog analoga – sulfinozina u inhibiciji rasta malignih ćelija neosetljivih na dejstvo hemioterapeutika

Rezime

Efikasno izlječenje tumora je veoma teško postići posebno kada se razvije višestruka rezistencija (MDR) na konvencionalnu antineoplastičnu terapiju. Visoka aktivnost P-glikoproteina (P-gp) je ključni mehanizam razvoja MDR kod različitih tipova karcinoma. Upravo je pronalaženje antitumorskog agensa koji bi istovremeno ubijao ćelije tumora i inhibirao MDR veoma važan korak u razvoju novih terapijskih strategija za lečenje malignih oboljenja. U našem radu smo se bavili istraživanjem efekata koje sulfinozin (SF) ispoljava na dve ćelijske linije sa uspostavljenom MDR fenotipom kod kojih je P-gp pumpa prekomerno eksprimirana (nesitnoćelijski karcinom pluća tj. NCI-H460/R i glioblastom tj. U87-TxR). SF je uzrokovao sličan citotoksičan efekat kod senzitivnih (NCI-H460 i U87) i rezistentnih (NCI-H460/R i U87-TxR) ćelijskih linija, dok kod normalnih ćelija (HaCaT) citotoksičnost nije uočena ni pri tretmanu sa visokim dozama (100 μ M). SF kod rezistentnih ćelija dovodi do indukcije apoptoze, što je potvrđeno i aktivacijom efektorske kaspaze 3. Apoptoza zavisna od kaspaza je praćena pojavom autofagije. Nakon dejstva SF-a dolazi do povećanja sadržaja kiseoničnih reaktivnih vrsta i smanjenja koncentracije glutaciona (GSH). SF svojim delovanjem dovodi i do smanjenja ekspresije ključnog enzima glutationskog sistema γ GCS i ekspresije *gst- π* iRNK. Posledično, SF dovodi do značajnog smanjenja ekspresije iRNK gena koji su odgovorni za tumorsku progresiju: *hif-1 α* , *mdr1* i *vegf* i u hipoksičnim uslovima. SF takođe dovodi do inhibicije ekspresije i aktivnosti P-gp-a. Pokazano je da SF kod rezistentnih ćelija dovodi do povećanja akumulacije standardnog hemioterapeutika doksorubicina (DOX). Svoj najbolji efekat SF ispoljava nakon 72 h i ovaj efekat je sličan efektu koji postižu tarikvidar i Dex-verapamil. Može se zaključiti da SF dovodi do senzitivizacije rezistentnih ćelijskih linija na DOX u naizmeničnom tretmanu. Uz to, SF dovodi do smanjenja ekspresije iRNK vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) i utiče na modulaciju njegove sekrecije. Na osnovu svega navedenog zaključujemo da se SF može klasifikovati kao multi-potentni antikancerski agent posebno za primenu kod rezistentnih maligniteta.

Ključne reči: sulfinozin (SF), višestruka rezistencija na lekove (MDR), NSCLC ćelije (NCI-H460/R), ćelije glioblastoma (U87-TxR), P-glikoprotein

The Role of Purine Nucleoside Analog - Sulfinosine in Growth Inhibition of Cancer Cells Resistant to Classic Chemotherapeutics

Summary

Achieving an effective treatment of cancer is difficult, particularly when resistance to conventional chemotherapy is developed. P-glycoprotein (P-gp) activity governs multi-drug resistance (MDR) development in different cancer cell types. Identification of anti-cancer agents with the potential to kill cancer cells and at the same time inhibit MDR is important to intensify the search for novel therapeutic approaches. We examined the effects of sulfinosine (SF), a quite unexplored purine nucleoside analog, in MDR (P-gp over-expressing) non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and glioblastoma cell lines (NCI-H460/R and U87-TxR, respectively). SF showed the same efficacy against MDR cancer cell lines and their sensitive counterparts. However, it was non-toxic for normal human keratinocytes (HaCaT). SF induced caspase-dependent apoptotic cell death and autophagy in MDR cancer cells. After SF application, reactive oxygen species (ROS) were generated and glutathione (GSH) concentration was decreased. The expression of key enzyme for GSH synthesis, gamma Glutamyl-cysteine-synthetase (γ GCS) was decreased as well as the expression of *gst- π* mRNA. Consequently, SF significantly decreased the expression of *hif-1 α* , *mdr1* and *vegf* mRNAs even in hypoxic conditions. SF caused the inhibition of P-gp (coded by *mdr1*) expression and activity. The accumulation of standard chemotherapeutic agent – doxorubicin (DOX) was induced by SF in concentration- and time-dependent manner. The best effect of SF was obtained after 72 h when it attained the effect of known P-gp inhibitors (Dex-verapamil and tariquidar). Accordingly, SF sensitized the resistant cancer cells to DOX in subsequent treatment. Furthermore, SF decreased the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) on mRNA and protein level and modulated its secretion. In conclusion, the effects on P-gp (implicated in pharmacokinetics and MDR), GSH (implicated in detoxification) and VEGF (implicated in tumor-angiogenesis and progression) qualify SF as multi-potent anti-cancer agent, which use must be considered, in particular for resistant malignancies.

Key words: sulfinosine, multidrug resistance, NSCLC, glioblastoma cells, P-glycoprotein

Lista skraćenica

ABC – ATP binding cassette (ATP vezujući transporteri)	E2F1- E2F transkripcioni faktor 1 (učestvuje u kontroli ćelijskog ciklusa i delovanja tumor supresora)
ADP – adenzin difosfat	EGF(R) – epidermal growth factor (receptor) (epidermalni faktor rasta ili njegov receptor)
Akt – familija serin/treonin specifičnih protein kinaza	ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay
ANOVA – analysis of variance	ERK – extracellular signal-regulated kinase (kinaza regulisana vanćelijskim signalima)
AP-1 – aktivator protein-1	FAK – fokalna adhezijska kinaza
APRT – adenin fosforibozil transferaza	Fas ligand/receptor – pripada TNF familiji (pokreće apoptozu)
ATP – adenzin trifosfat	FBS – fetalni goveđi serum
AXL – član podfamilije receptora tirozin kinaza (učestvuje u sprovođenju signala iz vanćelijskog matriksa u citoplazmu i u stimulaciji proliferacije ćelija)	FGF – fibroblast growth factor (faktor rasta fibroblasta)
Bad – Bcl-2-associated death promoter	Flk-1/KDR - kinase insert domain receptor (receptor – VEGFR2)
Bak – Bcl-2 homologous antagonist/killer	Flt-1 – Fms-related tyrosin kinase 1 (receptor – VEGFR1)
Bax – Bcl-2-associated X protein	Flt-4 – Fms-related tyrosin kinase 4 (receptor – VEGFR3)
Bcl-2 – B cell lymphoma-2 (familija proapoptotskih i antiapoptotskih proteina, koja reguliše propustljivost na spoljnoj membrani mitohondrija)	FOK – focal adhesion kinase (protein tirozin kinaza uključena u procese ćelijske adhezije)
Bcl-X _L – B cell lymphoma-extra large	gapdh - gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
Bcl-X _S - B cell lymphoma-extra small	GCS – glukozilceramid sintaza
Bid - BH3 Interacting Domain Death Agonist Protein	GRB – growth factor receptor bound protein (protein vezan za receptor faktora rasta)
cdk – ciclyn dependent kinase (ciklin zavisna kinaza)	GSH – redukovani glutation
c-Fos – pripada familiji transkripcionih faktora ranog odgovora (sa c-Jun formira AP-1)	GSR – glutation reduktaza
c-Jun - pripada familiji transkripcionih faktora ranog odgovora (sa c-Fos formira AP-1)	GSSG – glutation disulfid
c-myc – protoonkogen (kodira transkripcione faktore, koji regulišu ekspresiju velikog broja gena)	GST – glutation-S-transferaza
COX – ciklooksigenaza	gst- π - gen koji kodira π formu GST
Dex-VER – dex verapamil	GS-X – eksportna pumpa za komplekse konjugovane glutationom
DEPC – dietil pirokarbonat	γ GCS - γ -glutamilcistein sintetaza
DNK – deoksiribonukleinska kiselina	hif-1 α - hypoxia inducible factor 1 (transkripcioni faktor koji se aktivira u hipoksičnim uslovima)
DOX – doksorubicin	
DTNB – ditiobisnitrobenzoeva kiselina	
DTT – ditiotreitol	

hif-2 α – **hypoxia inducible factor 2**
(transkripcijski faktor koji se aktivira u hipoksičnim uslovima)
HMGI(Y) – **high mobility group I(Y) protein** (učestvuje u regulaciji transkripcije, arhitekturi hromatina)
HPRT – hipoksantin fosforibozil transferaza
HRP – **horseradish peroxidase**
IC₅₀ – inhibitorna koncentracija (50% inhibicije ćelijskog rasta u odnosu na kontrolu)
IDR – **individual drug resistance**
IMPDH – inozin monofosfat dehidrogenaza
JNK – c-Jun-NH₂-terminalna kinaza (pripada MAPK)
kDNK – komplementarna DNK (**cDNA**)
Kit – receptor citokina sa tirozin kinaznom aktivnošću
LRP – **lung resistance protein**
MAPK – **mitogen activated protein kinase**
Mdm2 – **murine double minute2** (ligaza koja učestvuje u negativnoj regulaciji p53)
MDR – **multidrug resistance**
mdr1 – gen koji kodira P-gp
MEK - **mitogen-activated protein kinase kinase**
MMP – metaloproteinaze vanćelijskog matriksa
MNK – serin/treonin kinaza koja reaguje sa MAPK
MRP- **multidrug resistance associated protein** (protein povezan sa nastankom MDR)
MTT – dimetiltiliazolil difeniltetrazolijum bromid
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBD – **nucleotide binding domain** (ATP vezujući domen na ABC transporteru)
NF κ B – nuklearni faktor κ B
NHE – Na⁺/H⁺ razmenjivač

NSCLC – **non- small cell lung carcinoma**
(nesitnoćelijski karcinom pluća)
PAX – **paired box gene** (kodira PAX familiju transkripcijskih faktora)
PBS – fosfatni pufer
PCR – **polymerase chain reaction**
(lančana reakcija polimeraze)
PDGF(R) – **platelet derived growth factor (receptor)** (faktor ili receptor faktora rasta poreklom od krvnih pločica)
P-gp – P-glikoprotein
PI-3K – fosfatidil inozitol 3kinaza
PKA – protein kinaza A
PKC – protein kinaza C
PMSF – fenimetilsulfonil fluorid (inhibitor serin proteaza)
PRPP – fosforibozil pirofosfat
PTEN – homolog tirozin fosfataza i tenzina (tumor supresor, koji sprečava brz rast ćelija)
PTX - paklitaksel
Raf – MAPK kinaze kinaza
ras – **retrovirus-associated DNA sequences** (protoonkogen)
Ras – familija malih GTPaza (učestvuje u ERK/MAPK signalizaciji i stimulaciji proliferacije ćelija)
Rb – retinoblastoma tumor supresor
RFC – replikacioni faktor C
RNK – ribonukleinska kiselina
RT – reverzna transkripcija
S1P – sfingozin-1-fosfat
SCLC – **small cell lung carcinoma**
(sitnoćelijski karcinom pluća)
SF – sulfinozin
SMP – sulfinozin monofosfat
SRB – sulforodamin B
SSA – sulfosalicilna kiselina
Taq - **Thermus aquaticus** (bakterija iz koje je izolovana termostabilna DNK polimeraza)
TB – **trypan blue dye exclusion**
TBE – Tris boratni EDTA pufer

TMD – **transmembrane domain** (domen ABC transportera, koji prolazi kroz membranu)

TNF- α - **tumor necrosis factor- α** (faktor tumorske nekroze)

Topo – topoisomeraza

TPMT – tiopurin metiltransferaza

TRAIL - **TNF-related apoptosis-inducing ligand** (transmembranski protein homolog ostalim članovima TNF familije)

Tris – trihidroksimetil aminometan

Tukey HSD – **Tukey high speed data** (metod višestruke komparacije u statistici)

tXMP – tioksantin monofosfat

VEGF – **vascular endothelial growth factor** (vaskularni endotelijalni faktor rasta)

VER - verapamil

WHO – **World Health Organization** (Svetska zdravstvena organizacija)

wt – **wild type**

(X)IAP – **(X-linked) inhibitor of apoptosis protein** (član familije inhibitora apoptoze)

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1	Karcinogeneza	1
1.1.1.	<i>Nekontrolisana proliferacija</i>	2
1.1.2.	<i>Izbegavanje ćelijske smrti</i>	3
1.1.2.1.	<i>Apoptoza</i>	3
1.1.2.2.	<i>Autofagija</i>	7
1.1.3.	<i>Indukcija angiogeneze</i>	7
1.1.4.	<i>Oksidativni stres i karcinogeneza</i>	9
1.2.	Molekulski fenotip i terapija NSCLC	10
1.3.	Molekulski fenotip i terapija glioma	15
1.4.	Višestruka rezistencija na lekove	18
1.4.1.	<i>Klasični mehanizam MDR-a - Smanjena akumulacija hemioterapeutika</i>	19
1.4.1.1.	<i>P-glikoprotein</i>	22
1.4.1.2.	<i>In vitro modeli za proučavanje rezistencije - doksorubicin i paklitaksel</i>	23
1.4.2.	<i>Rezistencija posredovana detoksifikacijom</i>	26
1.4.3.	<i>Odupiranje apoptozi</i>	28
1.4.3.1.	<i>Tumor supresorski geni i MDR</i>	28
1.4.3.2.	<i>Poremećaj balansa proapoptotskih i antiapoptotskih proteina</i>	28
1.4.3.3.	<i>Poremećaj funkcije kaspaza</i>	29
1.5.	Strategije za prevazilaženje MDR	30
1.5.1.	<i>Razvoj kompetitivnih modulatora</i>	32
1.5.2.	<i>Razvoj nekompetitivnih modulatora</i>	33
1.5.3.	<i>Razvoj novih strategija za modulaciju MDR</i>	33
1.6.	Sulfinozin	34
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
3.	METODOLOGIJA	38
3.1.	Supstance	38
3.2.	Hemikalije i reagensi	38
3.3.	Ćelijske linije	39
3.3.1.	<i>NCI-H460 i NCI-H460/R</i>	39
3.3.2.	<i>U87 i U87-TxR</i>	40
3.3.3.	<i>HaCaT</i>	40
3.4.	Održavanje kulture ćelija	40
3.4.1.	<i>Održavanje NCI-H460 i NCI-H460/R u ćelijskoj kulturi</i>	40
3.4.2.	<i>Održavanje U87 i U87-TxR u ćelijskoj kulturi</i>	41
3.4.3.	<i>Održavanje HaCaT u ćelijskoj kulturi</i>	41
3.4.4.	<i>Trodimenzionalna ćelijska kultura u Matrigel-u</i>	41
3.5.	Eksperimentalne varijacije u tretmanima	42
3.5.1.	<i>Jednokratni tretmani (72h)</i>	42
3.5.2.	<i>Jednokratni tretman (72h) praćen oporavkom ćelija (72h)</i>	42
3.5.3.	<i>Kombinovani tretmani</i>	42
3.6.	Određivanje broja ćelija	43
3.7.	Određivanje vijabilnosti ćelija	43
3.7.1.	<i>SRB test vijabilnosti</i>	43
3.8.	Protočna citometrija - FACS analiza ćelija	44
3.8.1.	<i>CFSE bojenje - analiza ćelijske proliferacije</i>	44
3.8.2.	<i>Aneksin V-propidijum jodid - analiza ćelijske smrti</i>	45
3.8.3.	<i>ApoStat – analiza pan-kaspazne aktivnosti</i>	46
3.8.4.	<i>Akridin-oranž (AO) bojenje – analiza autofagije</i>	46
3.8.5.	<i>DHE bojenje - analiza slobodnih radikala</i>	47
3.8.6.	<i>Akumulacija DOX-a</i>	47
3.8.7.	<i>Analiza ekspresije proteina (P-gp i VEGF)</i>	47
3.9.	Kolorimetrijska detekcija glutationa (GSH)	48

3.10.	<i>Određivanje koncentracije VEGF-a u supernatantu ćelijske kulture</i>	49
3.11.	<i>Western blot</i>	50
3.12.	<i>Analiza ekspresije gena RT-PCR metodom</i>	51
3.12.1.	<i>Izolacija i kvantifikacija RNK</i>	51
3.12.2.	<i>Provera kvaliteta RNK</i>	52
3.12.3.	<i>Reakcija reverzne transkripcije</i>	52
3.12.4.	<i>PCR reakcija</i>	53
3.12.5.	<i>Analiza PCR produkta</i>	54
3.13.	Statistička obrada podataka	54
4.	REZULTATI	55
4.1.	Efekat SF-a na vijabilitet tumorskih i normalnih ćelija	55
4.2.	Antiproliferativno dejstvo SF-a kod tumorskih ćelija	56
4.2.1.	<i>SF tretman u dodimenzionalnoj i trodimenzionalnoj kulturi</i>	57
4.3.	SF izaziva apoptozu zavisnu od kaspaza u MDR ćelijskim linijama (NCI-H460/R i U87-TxR)	57
4.4.	SF dovodi do indukcije autofagije u MDR ćelijskim linijama (NCI-H460/R i U87-TxR)	61
4.5.	SF modulira detoksifikacioni kapacitet MDR ćelijskih linija (NCI-H460/R i U87-TxR)	62
4.5.1.	<i>SF povećava produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta u MDR ćelijama</i>	62
4.5.2.	<i>SF utiče na koncentraciju glutationa u MDR ćelijama</i>	62
4.5.3.	<i>SF utiče na nivo ekspresije <i>gst-π</i> iRNA u MDR ćelijama</i>	64
4.5.4.	<i>SF utiče na nivo ekspresije γGCS kod MDR ćelija</i>	64
4.6.	SF dovodi do smanjenja ekspresije <i>hif-1α</i> , <i>mdr1</i> i <i>vegf</i> iRNK u MDR ćelijama	66
4.7.	SF inhibira ekspresiju i aktivnost P-gp pumpe u MDR ćelijama (NCI-H460/R i U87-TxR)	68
4.7.1.	<i>Efekat SF-a na ekspresiju P-gp-a</i>	68
4.7.2.	<i>Efekat SF-a na aktivnost P-gp-a</i>	69
4.8.	SF dovodi do senzitivizacije MDR ćelija (NCI-H460/R i U87-TxR)	71
4.9.	SF modulira unutarćelijski pul VEGF ₁₆₅ u MDR ćelijama (NCI-H460/R i U87-TxR)	73
4.9.1.	<i>SF utiče na ekspresiju <i>vegf165</i> iRNK kod MDR ćelija</i>	73
4.9.2.	<i>SF utiče na sekreciju VEGF u MDR ćelijskim linijama</i>	73
5.	DISKUSIJA	75
5.1.	Sulfinozin inhibira rast tumorskih ćelija	76
5.2.	Sulfinozin dovodi do indukcije apoptoze zavisne od kaspaza	77
5.3.	Sulfinozin modulira ćelijski detoksifikacioni kapacitet	78
5.4.	Sulfinozin dovodi do smanjenja ekspresije <i>hif-1α</i> iRNK	79
5.5.	Sulfinozin dovodi do inhibicije ekspresije i aktivnosti P-glikoproteina	80
5.6.	Hemiosenzitivizacija sulfinozinom	81
5.7.	Sulfinozin modulira unutarćelijski sadržaj VEGF ₁₆₅	82
5.8.	Predloženi mehanizam dejstva sulfinozina	83
6.	ZAKLJUČCI	84
7.	LITERATURA	86

1. UVOD

1.1. KARCINOGENEZA

Karcinogeneza predstavlja kompleksan proces u toku koga dolazi do poremećaja u kontroli normalnog ćelijskog rasta, diferencijacije i deobe sa tendencijom rasta karakterističnih klonova prekancerogenih i kancerogenih ćelija. Sukcesivna akumulacija genetskih promena u ćelijama (hromozomske aberacije/mutacije DNK sekvenci) ima za posledicu pojavu tumora tj. bolesti abnormalne genske ekspresije (Aguilera i Gómez-González, 2008). Hipoteza o genetskoj nestabilnosti kao endogenom mehanizmu nagomilavanja mutacija je danas opšte prihvaćena (Li i sar., 2009). Pojava mutacija je uslovljena nepravilnostima u procesima koji održavaju integritet genoma - replikacija, popravka grešaka u DNK molekulu ili zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa. Pored toga, na pojavu mutacija utiču i faktori koji doprinose nestabilnosti genoma kao što su osetljiva mesta u hromozomu i sekvence DNK sa visokim nivoom transkripcije (Aguilera i Gómez-González, 2008). Sve nastale promene u genomu, od tačkastih mutacija do velikih hromozomskih rearanžmana, imaju za posledicu inaktivaciju negativnih medijatora ćelijske proliferacije - tumor supresor gena i aktivaciju pozitivnih medijatora proliferacije tj. onkogeni, ili nove izmene u genima odgovornim za stabilnost genoma. Progresija tumora preko preneoplazije do definisanog maligniteta rezultat je ekspanzije klonova ćelija koje se navedenim genetskim promenama neprestano selekcionišu sa sve većim proliferativnim potencijalom (Coleman i Tsongalis, 2006; Weinberg, 1989).

Maligno transformisane ćelije se odlikuju određenim karakteristikama koje ne pronalazimo kod normalnih ćelija, i to su: nekontrolisana proliferacija, izbegavanje supresora rasta, odupiranje ćelijskoj smrti, besmrtnost, produžena angiogeneza tj. vaskularizacija tumora, invanzivnost i metastaziranje, deregulacija metaboličkih procesa i onesposobljavanje imunog sistema (Hanahan i Weinberg, 2011).

1.1.1. Nekontrolisana proliferacija

Nekontrolisana proliferacija, se pre svega odlikuje promenama u postojećim regulatornim procesima odgovornim za razmnožavanje i rast ćelija. Kancerogene ćelije beskonačnom deobom postaju autonomne, što se često označava kao njihovo „asocijalno ponašanje“. Tumorska ćelija postiže nekontrolisanu proliferaciju na više načina: autokrinom proizvodnjom faktora rasta, povećanjem nivoa svojih membranskih receptora ili konstitutivnom aktivacijom nekog od elemenata nishodnog signalnog puta koji promoviše rast (Hanahan i Weinberg, 2001). Istovremeno se uključuju mehanizmi pomoću kojih tumor izbegava programe koji negativno regulišu ćelijsku proliferaciju, a to su inaktivacija tumor-supresorskih proteina uključenih u kontrolu rasta i gubitak mehanizama kontaktne inhibicije (Hanahan i Weinberg, 2011; Varagić i sar., 2004).

Najpotentniji tumor supresorni regulatorni gen je *p53* koga nazivamo čuvarom genoma i koji se aktivira u uslovima oštećenja DNK, hipoksije, stalne mitogene stimulacije, ali i pod dejstvom onkogeno (*c-myc*, *ras* ili *E2F1*). Glavna uloga ovog proteina se ogleda u sprečavanju mutacija i očuvanju stabilnosti genoma (Sherr i McCormick, 2002). Aktivacija *p53* može dovesti do privremenog ili trajnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G_1 ili G_2 fazi. Ovu aktivaciju karakterišu dva događaja, poluživot P53 proteina se značajno produžava što dovodi do brzog nagomilavanja proteina u stresom pogođenoj ćeliji i usled konformacionih promena P53 se aktivira kao transkripcioni regulatorni faktor (Brambilla i sar., 1998). Kritični momenat koji dovodi do aktivacije *p53* je fosforilacija N-terminalnog domena. P53 se u ćelijama vezuje za DNK domen koji stimuliše druge gene odgovorne za produkciju P21 koji kao potentni inhibitor ciklin zavisne kinaze interreaguje sa cdk2. Nastankom kompleksa P21-cdk2 zaustavlja se ćelijski ciklus što ćeliju uvodi u proces starenja. S druge strane, velika oštećenja prvenstveno DNK aktiviraju *p53* koji uvodi ćeliju u apoptozu. P53 pokreće kaskadu događaja koji će dovesti do apoptoze aktiviranjem proapoptotskih gena Bcl-2 familije kao što je *bax*. U slučaju kada oštećenje nije veliko P53 će umesto apoptoze podstaći popravku DNK isecanjem neodgovarajućih nukleotida ili baza (Sherr i saradnici, 2002). Mutacije u *p53* genu su veoma česta pojava kod malignih oboljenja, a najčešće kod tumora pluća (Brambilla i saradnici, 1998).

Ćelijski ciklus je veoma organizovan i složen proces kojim se pre deobe obezbeđuje kompletna i precizna replikacija DNK i ćelijskih komponenti. Ovaj proces je pod strogom kontrolom tumor-supresor gena u restrikcionim tačkama prelaza iz G₁ u S fazu i iz G₂ u M fazu ćelijskog ciklusa.

Gen za Rb protein je prvi kloniran tumor supresorski gen (Friend i sar., 1986), koji kodira familiju fosfoproteina odgovornih za zaustavljanje ćelija u G1 fazi kao odgovor na oštećenje DNK (Harrington i sar., 1998) ili neke regulatorne signale rasta (Classon i Harlow, 2002) npr. TGF-β (Herrera i sar., 1996). Ovaj protein takođe igra ključnu ulogu u procesu ćelijske diferencijacije (Goodrich, 2006). Ulaskom u ćelijski ciklus dolazi do fosforilacije Rb proteina od strane kompleksa ciklin/cdk (ciklin zavisna kinaza), i posledičnog otpuštanja E2F1 i hromatinskih regulatora u trenutku prelaska iz G1 u S fazu. U proliferišućim ćelijama tumora Rb je najčešće inaktiviran tj. hiperfosforilisan negativnom regulacijom od strane cdk (Lipinski i Jacks, 1999).

1.1.2. Izbegavanje ćelijske smrti

Tumorske ćelije u cilju izbegavanja apoptoze razvijaju mehanizme kao što su gubitak funkcije P53, povećanje ekspresije anti-apoptotskih molekula, ali i smanjenje ekspresije pro-apoptotskih molekula koji promovišu apoptozu (Kerr i sar., 1972). Pored toga, druge vrste ćelijske smrti, kao što su autofagija i nekroza takođe pozitivno utiču na opstanak malignih ćelija. Autofagija ima protektivno dejstvo na tumorske ćelije (White i DiPaola, 2009), dok se tokom nekroze aktiviraju inflamatorne ćelije imunog sistema koje pomažu procese neoangiogeneze, proliferacije tumorskih ćelija i invazije okolnog tkiva. Nekrotične ćelije oslobađaju različite regulatorne faktore, kao što je IL-1 koji direktno stimuliše ćelije u neposrednoj blizini na proliferaciju (Grivennikov i sar., 2010).

1.1.2.1. Apoptoza

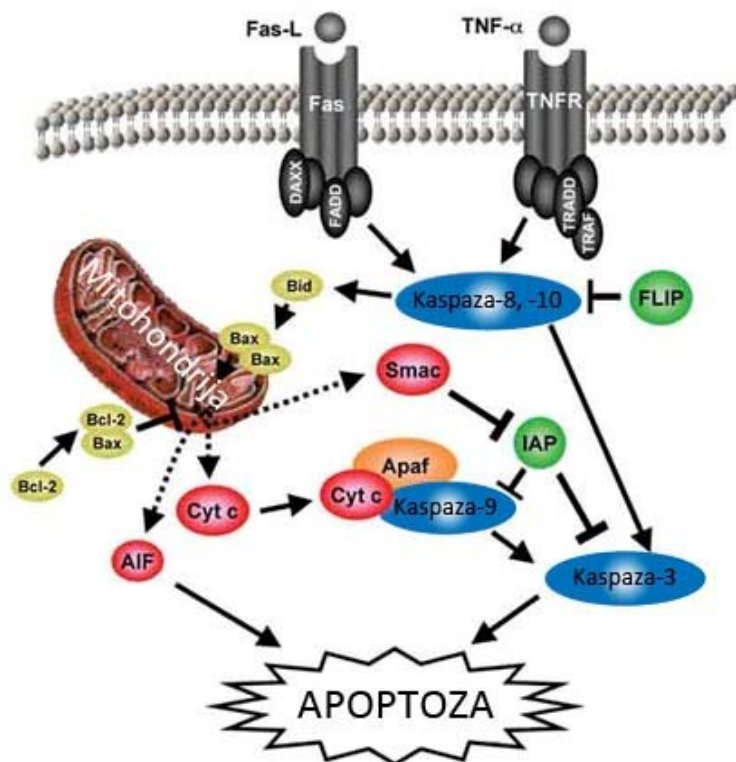
Apoptoza ili programirana ćelijska smrt tipa I, je poseban oblik ćelijske smrti nužan za razvoj organizma i održavanje ćelijske homeostaze tj. ravnoteže između gubitka i stvaranja ćelija normalnog tkiva tokom života (Chinnaiyan i sar., 1995). Ovaj proces se

odvija aktivacijom serije koordinisanih, programiranih događaja, pod kontrolom određenih gena. Ideja da proces apoptoze predstavlja barijeru ka razvoju tumora se prvi put javila još 1972. godine, kada su istraživači Kerr, Wyllie i Currie opisali masovnu apoptozu kod hormonski zavisnih tumora nakon uklanjanja dejstva hormona (Kerr i sar., 1972).

Glavne morfološke karakteristike ćelija koje su ušle u proces apoptoze su kondenzacija jedra i hromatina koje prati nuklearna fragmentacija, zaokrugljivanje ćelije, smanjenje zapremine ćelije (piknoza) i uvlačenje pseudopodija (Kroemer i sar., 2005). Integritet ćelijske membrane ostaje očuvan tokom celog procesa. U kasnijim fazama apoptoze može doći do „bubrenja“ ćelijske membrane i formiranja tzv. apoptotskih tela (Kroemer i sar., 2005), ali ćelije obično bivaju fagocitovane pre formiranja apoptotičnih tela. Ukoliko ne dođe do fagocitoze apoptotičnih tela, ona se raspadaju na način koji vrlo podseća na nekrotični tip ćelijske smrti, a sam proces se zove sekundarna nekroza (Wong, 2011). Tokom apoptoze dolazi do brojnih biohemijskih promena, kao što su: aktivacija kaspaza (cistein zavisne serin proteaze), razgradnje proteina i nukleinskih kiselina i rearanžiranja fosfolipida ćelijske membrane (Kumar i sar., 2010). Rano tokom procesa apoptoze dolazi do premeštanja fosfatidil-serina iz unutrašnjeg sloja u spoljašnji sloj ćelijske membrane („flip-flop“ difuzijom), što omogućava ćelijama fagocitnog sistema da prepoznaju i fagocituju apoptotične ćelije bez indukcije inflamatornog odgovora (Hengartner, 2000).

Klasično se opisuju dva puta aktivacije: unutrašnji i spoljašnji, koji se razlikuju prema inicijaciji tj. početku procesa apoptoze (Slika 1). Oba puta aktivacije kaspaza se susreću u tzv. zajedničkom putu, koji u stvari predstavlja egzekutorsku tj. izvršnu fazu apoptoze (Wong, 2011). Treći put aktivacije kaspaza je unutrašnji put povezan sa endoplazmatskim retikulumom, međutim on je još uvek nedovoljno proučen (Heath Engel i sar., 2008; David i sar., 2003).

Ključni enzimi u celokupnom lancu, nezavisno od načina pokretanja apoptoze, su kaspaze (Žlender, 2003) koje su prisutne u citoplazmi kao proenzimi i aktiviraju se kaskadno proteolitičkim isecanjem. Svoju potpunu proteolitičku aktivnost postižu kao tetrameri nakon dvostrukog isecanja (Köhler i sar., 2002).



Slika 1. Regulacija apoptoze (www.bioscience.org)

Vezivanje liganda indukuje konformacionu promenu u unutarćelijskom domenu receptora i formira vezno mesto za adapterski protein, a ceo novonastali kompleks koji formiraju ligand, receptor i adapterski protein se naziva signalni kompleks koji indukuje smrt (engl. „*death-inducing signalling complex*“ - DISC) (Herngartner, 2000). DISC indukuje prevođenje prokaspaze 8 u aktivnu kaspazu 8 (inicijatorska kaspaza spoljašnjeg puta), koja započinje apoptozu delujući na nishodne egzekutorske kaspaze (prokaspaze 3, 6 i 7). Na ovaj način dolazi do degradacije enzima i ćelijske smrti (Zimmerman i Green, 2000).

Drugi apoptotski put je mitohondrijski i uključuje aktivaciju proapoptotskih i inaktivaciju antiapoptotskih proteina (Karp, 2008; Danial i Korsmeyer, 2004). Mitohondrijalni put aktivacije apoptoze mogu da pokrenu ireverzibilno genetsko oštećenje, porast unutarćelijske koncentracije kalcijumovih jona ili oksidativni stres. Međutim, bez obzira koji će stimulus pokrenuti unutrašnji put, dolazi do naglog povećanja propustljivosti mitohondrijalne membrane i otpuštanja različitih proapoptotskih molekula u citoplazmu (kao što je citohrom C) (Korsmeyer, 2004). Poznato je najmanje petnaest

Danas je poznato 14 članova porodice kaspaza (kaspaze 1-14). Dele se na inicijatorske kaspaze - prokaspaze 2, 8, 9 i 10, i efektorske kaspaze - prokaspaze 3, 6 i 7 (Žlender, 2003). Spoljašnji apoptotski put se aktivira vezivanjem „liganda smrti“ (npr. TNF- α ili Fas liganda) za svoje „receptore smrti“ (TNFR1 odnosno Fas receptor).

proteina u Bcl-2 grupi koji se dele na proapoptotske kao što su Bad, Bax, Bak, Bcl-xl, Bag, Bid, Bik, Hrk, i antiapoptotske kao što su Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Brag-1, A1 (Koomagi i Volm, 1999). Balans proapoptotskih i antiapoptotskih činioca određuje osetljivost ćelije na apoptozu (Adams i Cory, 1998).

I drugi apoptotski faktori mogu da budu otpušteni iz intermembranskog prostora mitohondrija, kao npr. faktor koji indukuje apoptozu (engl. „*apoptosis inducing factor*“ - AIF), sekundarni aktivator kaspaza poreklom iz mitohondrija (engl. „*second mitochondria-derived activator of caspase*“ - Smac), direktni IAP vezujući protein-DIABLO (engl. „*direct IAP Binding protein with Low pI*“) i Omi/protein visokih temperaturnih zateva A-HtrA2 (engl. „*high temperature requirement protein A*“) (Kroemer i sar., 2007). Citohrom C zajedno sa faktorom koji aktivira proteaze uključene u proces apoptoze (engl. „*apoptotic protease activating factor 1*“ - APAF-1) i kaspazom-9 gradi kompleks koji se naziva apoptozom i aktivira egzekutorsku kaspazu 3 (Kroemer i sar., 2007). Sa druge strane, Smac/DIABLO ili Omi/HtrA2 indukuju apoptozu vezujući se za inhibitore proteina apoptoze (engl. „*inhibitor of apoptosis proteins*“ - IAP), što dovodi do raskidanja kompleksa IAP-a i kaspaza 3 i 9 i aktivacije apoptoze (LaCasse i sar., 2008).

Kaspaza-3 razgrađuje inhibitor kaspazom aktivirane dezoksiribonukleotidaze (engl. „*caspase activated deoxyribonuclease*“ - CAD), pri čemu je CAD odgovoran za internukleozomalnu degradaciju DNK. Pored toga, egzekutorske kaspaze indukuju razgradnju protein kinaza, citoskeletnih proteina koji vrše popravku DNK i inhibitornih subjednica proteina iz familije endonukleaza. One imaju i uticaj na citoskelet, ćelijski ciklus i signalne puteve, što sve zajedno doprinosi nastanku promena tipičnih za apoptozu (Ghobrial i sar., 2005).

U slučajevima kada je oštećenje DNK uzrok pokretanja ćelijske smrti, ključni protein je P53 koji je u normalnim ćelijama prisutan u neaktivnom obliku. P53 na transkripcionom nivou indukuje sintezu Bax proteina, a inhibira stvaranje Bcl-2. Pored toga reguliše i ekspresiju survivina, inhibitora apoptoze, koji može direktno inhibirati inicijatorske kaspaze 8 i 9, a posledično efektorske kaspaze 3 i 7 (Rust i Gores, 2000).

1.1.2.2. Autofagija

Obzirom da je autofagija mehanizam kojim normalne i tumorske ćelije obezbeđuju supstrate za sintezu ATP-a, ona može biti važan faktor koji omogućava malignim ćelijama da prežive u uslovima kada je ograničena dostupnost glukoze i drugih nutrijenata (Levine i Kroemor, 2008). Signalni put koji uključuje PI3-kinazu, Akt i mTOR reguliše i autofagiju. U slučaju nishodne regulacije PI3K signalnog puta dolazi do indukcije apoptoze i/ili autofagije (Levine i Kroemor, 2008; Sinha i Levine, 2008; Blasco, 2005) tako da izgladnjivanje, radioterapija i određeni citotoksični lekovi mogu indukovati autofagiju kod malignih ćelija koja paradoksalno postaje citoprotektivna (Sinha i Levine, 2008; Mathew i sar., 2007). Nekada, u uslovima teškog stresa maligne ćelije se povlače u reverzibilno stanje mirovanja (White i DiPaola, 2009; Sinha i Levine, 2008), što može biti uzrok pojavi recidiva tumora u kasnim stadijumima bolesti nakon primene hemioterapije (Sinha i Levine, 2008; Mathew i sar., 2007). Neke hipoteze pretpostavljaju da je za inicijaciju tumora neophodan nizak nivo autofagije (Edinger i Thompson, 2004). Prema tom konceptu, autofagija omogućava preživljavanje tumorskih ćelija u grupama sve do formiranja neovaskulature. Prekomerna ekspresija Ras protoonkogene može da inicira autofagiju kao faktor preživljavanja ćelija u unutrašnjosti tumora dok se ne obavi adekvatna neoangiogeneza (Kang i Avery, 2008). Pored toga, autofagija može zaštititi tumorske ćelije uklanjanjem oštećenih organela i proteina radi smanjenja oštećenja DNK i posledične genetske nestabilnosti ili čišćenjem „ćelijskog otpada“ u slučaju nekroze i inflamacije (Mathew i sar., 2007).

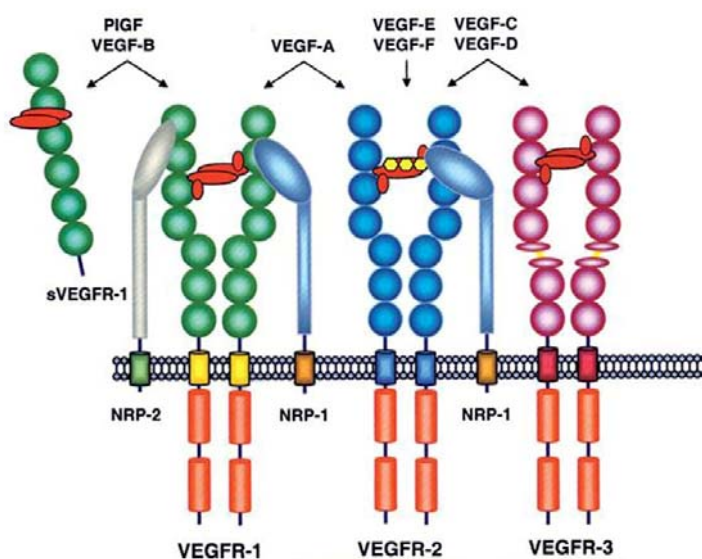
1.1.3. Indukcija angiogeneze

Tokom progresije tumora, kako bi se ispunile potrebe neoplastičnog tkiva za kiseonikom i hranljivim materijama, dolazi do aktivacije procesa angiogeneze. Stvaranje tumorskog krvotoka je kritičan i neophodan korak za dalji rast tumora. Angiogeneza ili neovaskularizacija podrazumeva formiranje novih kapilara iz već postojećih krvnih sudova, i odvija se posredstvom angiogenih faktora kao što su vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), bazalni fibroblastni faktor rasta (bFGF), angiopoetin, interleukin-8 (IL-8) i timidin fosfat (Yuan i sar., 2000). Pojačana ekspresija angiogenih faktora, ali i smanjena ekspresija

trombospondina-1 (TSP-1) kod tumora indukuju stalno stvaranje novih krvnih sudova koji prate njegov rast (Ferrara, 2004; Yuan i sar., 2000).

Hiperekspresija i/ili mutacija receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR - erbB1, erbB2 i erbB3), koji pripada porodici tirozin kinaznih receptora, otkrivena je u mnogim malignim ćelijama epitelijalnog porekla. Epidermalni faktor rasta (EGF) se vezuje za tirozin kinazni receptor - EGFR, a signali aktivacije bivaju prosleđeni preko Ras proteina, PI3-kinaze, fosfolipaze C, protein tirozin fosfataze i Src tirozin kinaze na MAP kinazni put čija hiperekspresija dovodi do fenotipskih promena i razvoja tumora (Hanahan i Folkman, 1996; Johnson i Vaillancourt, 1994). Nedavno je pokazano da je aktivacija MAP kinaznog puta, odgovornog za neoangiogenezu tumora pluća, preduslov njegovog rasta i metastaziranja. Promene u K-Ras i c-Mos onkoproteina, koji predstavljaju okidače za hiperekspresiju MAPK, je u direktnoj korelaciji sa stepenom angiogeneze tumora kao i sa sintezom VEGF-a (Brambilla, 2006; Zacharatos i sar., 2001; Kapitanović i sar., 2000).

VEGF familija obuhvata više glikoproteina međusobno slične građe, a pripisuje im se posebno značajna uloga u angiogenezi tokom reproduktivnog perioda. VEGF familiju čini 5 članova: VEGF (A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i VEGF-E (Slika 2).



Slika 2. Vezivanje VEGF za receptore (www.rosenthallab.com)

VEGF-A se javlja u nekoliko izoformi: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆, od kojih je VEGF₁₆₅ najzastupljeniji. VEGF se vezuje za dva receptora (Slika 2), VEGFR1 koji je prisutan kod mirujućih i proliferišućih endotelijalnih ćelija i odgovoran za održavanje endotela i VEGFR2 koji je odgovoran za nastanak novih endotelijalnih ćelija i njihovo hemotaktičko

kretanje. Najznačajnija osobina VEGF-A u odnosu na sve druge članove iste familije je njegova pojačana produkcija u uslovima hipoksije (Decaussin i sar., 1999). Regulacija odgovora na hipoksiju na molekularnom nivou je relativno kompleksna, a uključuje međudelovanje onkogeno (najčešće H-Ras), nekoliko transmembranskih protein-kinaza (poput EGFR) i pomoćnih transkripcionih faktora povezanih sa hipoksijom hif-1 α i hif-2 α (Shweiki i sar., 1992). Oba faktora zavise od količine parcijalnog kiseonika, pa u normoksičnim uslovima bivaju vrlo brzo enzimski razgrađeni, dok ih hipoksija stabilizuje i prolongira njihovu aktivnost. Jednom aktivirani hif-1 α ili hif-2 α se vezuje za VEGF promotor. Navedeni mehanizam je predominantni regulatorni put sinteze VEGF-a, i istovremeno je odgovoran za ushodnu regulaciju stvaranja proteina VEGF. Hipoksija provocira ekspresiju i sekreciju VEGF-a, a njegovo vezivanje za receptor aktivira PI-3K i Akt kinazu, ERK1 i ERK2 (sa ili bez *ras* aktivacije), kao i fokalnu adhezionu kinazu (FAK) (Shweiki i sar., 1992). VEGF i njegovi receptori su prisutni u tumorskim ćelijama, gde autokrinim i parakrinim mehanizmima obezbeđuju migraciju i opstanak tumora. Ekspresija VEGF-a je prognostički parametar i kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća njegova povišena ekspresija veoma loše utiče na tok i prognozu bolesti (Decaussin i sar., 1999).

1.1.4. Oksidativni stres i karcinogeneza

Oksidativni stres je stanje u kojem oksidativni procesi preovladavaju antioksidativne sposobnosti ćelija tkiva ili organizama (Finkel i Holbrook, 2000). U ravnotežnim uslovima, slobodni radikali se razgrađuju ćelijskim antioksidansima tj. uz pomoć enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaze i glutation peroksidaze ili neenzimatski uz pomoć glutationa (GSH) (Chelikani, 2004; Chaudiere i Tappel, 1983; Keele, 1971). Do pomaka ravnoteže dolazi u slučaju smanjenja antioksidativne sposobnosti organizma ili povećanog stvaranja slobodnih radikala. U patološkim procesima koncentracija i aktivnost slobodnih radikala je povećana, a ovo je posredovano vanćelijskim otpuštanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. „*Reactive Oxygen Species*“ - ROS) iz granulocita, aktivacijom ksantin oksidaze i fosfolipaze, promenom u transportnom lancu elektrona u mitohondrijama itd. Razlike između patološkog i „fiziološkog“

oksidativnog stresa se ogledaju u različitim promenama na makromolekulima, pojedinačnim ćelijama, ali i u celom organizmu. Jak oksidativni stres dovodi do teškog oštećenja ćelijske strukture što ishodi u ćelijskoj smrti (Simić i Taylor, 1988).

ROS su glavni uzrok toksičnosti kiseonika u ćeliji, u kancerogenezi imaju veoma važnu ulogu (Helbock i sar., 1998) pa se može reći da tumor predstavlja stanje oksidativnog stresa (Townsend i Tew, 2003). Superoksidni anjon i vodnik peroksid se smatraju „tumorskim inicijatorima“ (Barzegar i Moosavi-Movahedi, 2011; Wade i Wahl, 2006) i njihova aktivnost se zasniva na smanjenoj ćelijskoj antioksidacionoj zaštiti. Iako su tumorske ćelije u mnogo većoj meri izložene oksidativnom stresu, pokazuju i veću otpornost na njega. Mehanizam otpornosti tumorskih ćelija na oksidativni stres nije u potpunosti rasvetljen. Smatra se da jedan od faktora otpornosti može biti pojačano stvaranje GSH (Hayes i sar., 2005, Ganesaratnam i sar., 2004; Townsend i Tew, 2003). Uz to, stalni oksidativni stres u malignim ćelijama može dovesti do neprekidne aktivacije transkripcionih faktora, što za posledicu ima intenzivnu ćelijsku proliferaciju zbog promene u ekspresiji gena *c-fos*, *c-jun* i *c-myc* (Abdalla, 2011; Wade i Wahl, 2006).

1.2. MOLEKULSKI FENOTIP I TERAPIJA NSCLC

Karcinom pluća je najzastupljenije i najsmrtonosnije maligno oboljenje kod ljudi i samim tim predstavlja veliki globalni zdravstveni problem. Podjednako se javlja kod oba pola, kako u razvijenim tako i u zemljama u razvoju, može biti primarno ili sekundarno oboljenje u zavisnosti da li se primarni maligni proces pojavio na plućima ili je u pitanju metastatski proces sa drugih organa. Postoji nekoliko tipova karcinoma pluća koji su podeljeni u dve velike grupe. Prvu grupu čine sitnoćelijski karcinomi pluća (engl. „*Small Cell Lung Carcinoma*“ - SCLC) koji se javlja u 20% slučajeva i ima tendenciju ranog širenja putem krvi najčešće u mozak, jetru, kosti i nadbubrežne žlezde. Drugu, češću histološku formu čine ne-sitnoćelijski karcinomi pluća (engl. „*Non-small Cell Lung Carcinoma*“ - NSCLC) koji se javljaju u 80% slučajeva (Lantuejoul & Brambilla, 2006).

Standardni pristup terapiji karcinoma pluća predstavlja kombinacija hemioterapije i zračenja, a kod malog broja pacijenata vrši se i hirurško odstranjivanje (Gridelli i sar.,

2003b). Upotreba klasičnih hemioterapeutika u kliničkoj praksi je empirijska, zasnovana na najboljem postignutom odgovoru na terapiju i sveukupnom preživljavanju na osnovu rezultata u velikim kliničkim ispitivanjima. Takav pristup zahteva primenu kombinovane hemioterapije, koju prati povećanje toksičnosti, pri čemu se u razmatranje ne uzimaju razlike u hemiosenzitivnosti među pacijentima (Petty i saradnici, 2004). Jedinu priliku za izlečenje NSCLC pruža hirurško odstranjivanje, koje je moguće izvršiti samo u 15-20% slučajeva rano otkrivenog karcinoma. Čak i nakon radikalnog odstranjivanja, svega 40% pacijenata živi 5 i više godina. Lokalno uznapredovali karcinomi su ustanovljeni kod jedne trećine obolelih. Trenutni efekti aktuelne hemioterapije kod uznapredovalih formi NSCLC su povećanje srednjeg vremena preživljavanja i sprečavanje pojave recidiva kod operisanih pacijenata kod kojih je NSCLC dijagnostikovanim u ranom stadijumu (Saijo, 2006). Platinski lekovi su i dalje terapija izbora bilo da se primenjuje pojedinačno ili u kombinaciji sa taksanima (paklitaksel, docetaksel) ili vinka alkaloidima (vinorelbin, vinkristin), analozima kamptotecina (irinotekan, topotekan), gemcitabinom ili pemetreksedom (Chang, 2011).

Kod NSCLC terapija se pokazala efikasnijom u slučaju kombinovanja cisplatina sa docetakselom, paklitakselom, gemcitabinom, etoposidom ili vinorelbinom. Brojne studije su pokazale da karboplatinske kombinacije poseduju sličnu efikasnost ali manju toksičnost u odnosu na cisplatinske kombinacije (Ramalingam & Belani, 2008).

Primena ciljane terapije u smislu modulacije ili prekidanja glavnih signalnih puteva koji kontrolišu abnormalnu proliferaciju i preživljavanje tumorskih ćelija predstavlja značajni napredak u terapiji karcinoma pluća (Sawyers, 2004). Međutim, ukupna srednja stopa preživljavanja kod pacijenata sa NSCLC i dalje ostaje veoma niska (Zhu i sar., 2006). Osim što se najveći broj slučajeva karcinoma pluća otkrije u odmaklom stadijumu, veoma važan faktor koji doprinosi visokoj stopi smrtnosti kod NSCLC je urođena rezistencija na hemioterapiju (Roy i sar., 2007; Berger i sar., 2005). Iz tog razloga se uporno radi na ispitivanju i pronalaženju uspešne ciljane terapije kod pacijenata sa NSCLC (Tabela 1).

Nastanak NSCLC ubrzavaju poremećaji u velikom broju heterogenih signalnih puteva koji uključuju mutacije u ključnim regulatornim proteinima rasta (K-Ras, EGFR, B-RAF, MEK-1, HER2, MET, EML-4-ALK, KIF5B-RET i NKX2.1) i inaktivaciju puteva inhibicije rasta (P53, PTEN, p16 i LKB1) (Johnson i sar., 2012).

Tabela 1. Ciljane terapije trenutno u kliničkim ispitivanjima za NSCLC

Ciljni molekul	Lekovita supstanca	Karcinomi
EGFR	gefitinib	NSCLC
EGFR	erlotinib	NSCLC
EGFR/HER2	EKB-569	kolorektalni karcinom, NSCLC
EGFR/HER2	HKI-272 (neratinib)	karcinom dojke, NSCLC
PanErbB	CI-1033	karcinom dojke, NSCLC
VEGFR	AMG 706	NSCLC, karcinom rektuma, karcinom kolona, karcinom pankreasa, ezofagealni karcinom, karcinom tiroidne žlezde
EGFR/VEGFR/RET	vandetanib	Uznapredovali solidni tumori, Multipli mijelom, NSCLC
	everolimus	karcinom dojke, GIST, glioblastom, karcinom prostate, NSCLC
	deferolimus	Hematološki maligniteti, karcinom prostate, sarkom, karcinom dojke, karcinom endometrijuma, NSCLC, gliomi, RCC
p53	nutlin	Maligna oboljenja
	JNJ-26854165	Solidni tumori
$\alpha\text{v}\beta\text{3}$ i $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ integrini	cilengitid	Tumor mozga i centralnog nervnog sistema, uznapredovali NSCLC, Hematološki maligniteti

Analiza mutacija EGFR-a u egzonima 19 i 21, je od izuzetnog značaja kada se u terapiji primenjuju tirozin kinazni inhibitori (TKI), gefitinib i erlotinib. Prisustvo K-Ras mutacija je pokazatelj kraćeg preživljavanja bez obzira na datu citotoksičnu terapiju ili EGFR-TKI terapiju. Viši nivo regulatora ribonukleotid reduktaze, (RRM1) povezan je sa dužim preživljavanjem (Zeng i sar., 2007) i slabim odgovorom na terapiju gemcitabinom (NCCN, 2010).

Iako je pušenje glavni faktor rizika za razvoj karcinoma pluća, čak oko 25% ovih tumora se javlja kod ljudi koji nikada nisu pušili (Sun i sar., 2007). U osnovi ove patogeneze su verovatno mutacije na nivou tirozin kinaznog EGFR, jer primena EGFR-TKI kod ovih pacijenata daje bolji efekat u odnosu na pacijente pušače kod kojih ova mutacija nije potvrđena (Rudin i sar., 2009; Samet i sar., 2009; Sun i sar., 2007). Mutacije na nivou K-Ras i P53 se javljaju češće kod karcinoma pluća pušača i udružene su sa promenama i u drugim putevima promocije rasta (Le Calvez i sar., 2005). Mutacija K-Ras protoonkogen je glavni uzrok onkogene transformacije kod 30% adenokarcinoma. Jedan od puteva koji je najčešće pogođen onkogenom alteracijom kod humanih karcinoma, pa i kod NSCLC je RAS/RAF/MEK/ERK signalna kaskada (Brambilla i Gazdar, 2009). Poremećaj regulacije EGFR je veoma čest kod različitih tipova tumora, uključujući i NSCLC gde se prekomerna

ekspresija proteina javlja u 62% slučajeva (Gazdar i Minna, 2008; Rowinsky, 2004; Hirsch i sar., 2003), a somatske mutacije EGFR-a u 30% (od toga nepušači oko 50%, a pušači 5-15%) (Forbes i sar., 2008; Marchetti i sar., 2005; Pao i sar., 2004). Međutim, svi slučajevi karcinoma pluća sa mutacijom EGFR koji inicijalno dobro reaguju na primenu gefitiniba ili erlotiniba, razvijaju kompleksnu rezistenciju na ove lekove već nakon 6 meseci do dve godine (Oxnard i sar., 2011).

EML4-ALK mutacije se primarno sreću kod adenokarcinoma i to nepušača ili bivših pušača (Horn i Pao, 2009; Koivunen i sar., 2008). Krizotinib (PF-0 2341066), inhibitor tirozin kinaze (TKI), je terapijski najuspešniji kod NSCLC pacijenata sa ALK translokacijom, pa je i odobren za lečenje u pomenutoj indikaciji (Katayama i sar., 2011).

Povišen nivo HGF (engl. „*Hepatocyte Growth Factor*“) i povišena ekspresija odgovarajućeg receptora - HGFR, koji kodira MET gen se dovode u vezu sa mnogo agresivnijom formom i lošijom prognozom NSCLC (Siegfried i sar., 1998). Aktivacija HGFR indukuje specifičnu fosforilaciju nekoliko ostataka tirozina, što za posledicu ima aktivaciju nishodnih signalnih puteva uključujući RAS/Erk, PI3K/Akt i c-Src kinazni put (Mazzone i Comoglio, 2006). Promene u MET genu uključuju amplifikaciju, prekomernu ekspresiju i mutaciju u velikom broju solidnih tumora kao npr. papilarnom karcinomu bubrega, karcinomu želuca i NSCLC (Olivero i sar., 1996).

Nakon homo- ili hetero-dimerizacije HER2/ErbB2 sa članovima iste familije tirozin kinaznih receptora, veliki broj nishodno regulisanih puteva (PI3K, MAPK i JAK/STAT put) dovodi do aktivacije različitih kinaza (Muthuswamy i sar., 1999; Olayioye i sar., 1998). Ovaj protein je prekomerno eksprimiran u 20% NSCLC, dok se mutacija HER2 javlja u 2% slučajeva (Shigematsu i Gazdar, 2006). Monoklonsko antitelo trastuzumab se vezuje za HER2, indukuje njegovu nishodnu regulaciju i posledično inhibira ćelijski ciklus (Franklin i sar., 2004). Mali molekul, koji inhibira oba receptora i EGFR i HER2, lapatinib (GW572016) ispoljava efekat ali u manjoj meri u smislu nishodne regulacije Src i Akt signalnog puta (Franklin i sar., 2004; Xia i sar., 2002).

Promene u *p53* genu su jedan od najznačajnijih događaja kod karcinoma pluća, jer imaju važnu ulogu u malignoj transformaciji plućnog epitela. Mutacije *p53* se u veoma velikom procentu javljaju kod karcinoma pluća, i to 40-60% kod NSCLC i 70% kod SCLC, uz

već postojeće mutacije na nivou EGFR ili K-Ras (Mogi i Kuwano, 2011; Mao, 2001). Kod žena nepušača sa adenokarcinomom pluća u 83% slučajeva predominantno se javljaju tranzicije, dok su kod pušača u pitanju transverzije (60%) i delecije (20%) (Gealy i sar., 1999). Česta pojava gubitka heterozigotnosti (engl. „*Loss of Heterozygosity*“ - LOH) u ćelijama karcinoma pluća na mestu *p53* gena na hromozomu 17p13 ukazuje da je ovaj gen uključen u patogenezu malignih bolesti pluća. Frekvencija mutacija *p53* je najveća kod karcinoma skvamoznih ćelija, dok je malo manja kod adenokarcinoma. Uloga mutiranog *p53* u prognozi karcinoma pluća i dalje ostaje kontraverzno pitanje, ali obzirom na to da ova mutacija ukazuje na rezistenciju na hemioterapiju, može se dovesti u vezu sa lošijom prognozom bolesti (Vogt i sar., 2002).

PTEN (engl. „*Phosphatase and Tensin Homolog*“) je tumor supresor gen koji kodira lipidno proteinsku fosfatazu (Tammemagi i sar., 1999). PTEN negativno reguliše signalni put PI3K tako što vrši defosforilaciju PI-(3,4,5)-trifosfata, koji posreduje u aktivaciji Akt. Ovo rezultira u inhibiciji PI3K-Akt-mTOR puta, dovodeći do zaustavljanja ćelija u G1 fazi i apoptoze. PTEN takođe inhibira ćelijsku migraciju kroz regulaciju fokalnih adhezionih kinaza i aktivnosti P53 (Liu i sar., 2008; Li i Ross, 2007; Eng, 2003). Gubitak heterozigotnosti (LOH) PTEN je veoma čest kod NSCLC i dešava se u približno 50% slučajeva (Marsit i sar., 2005).

Ciklin zavisne kinaze (cdk) inhibitor *p16* (*p16^{INK4A}/CDKN2/MTS1*) je prvi od četiri otkrivena INK4 gena. Predstavlja bitnu komponentu stroge kontrole ćelijskog ciklusa. On inhibira ciklin-D zavisnu fosforilaciju Rb i njegove srodnike *p130* i *p107*, menjajući ciklin-D u *cdk4/6*-ciklin-D kompleksu (Sherr, 1996). Inhibicija Rb fosforilacije održava Rb aktivnim na E2F-ciljnim promoterima gena koji su neophodni za ulazak ćelije u S fazu (Trimarchi i Lees, 2002). Genetske promene *p16^{INK4A}* tako dovode do neogranične ektopične ćelijske proliferacije kroz gubitak kontrole zaustavljanja ćelija u G1 fazi. Kod NSCLC, aberacije u *p16^{INK4A}* se dešavaju u veoma visokom procentu (oko 17–58%) i obično su u pitanju homozigotne delecije. Hipermetilacija *p16* promotera je u negativnoj korelaciji sa preživljavanjem, tj. delecija ovog cdk-inhibitora doprinosi lošijoj prognozi NSCLC.

1.3. MOLEKULSKI FENOTIP I TERAPIJA GLIOMA

Najčešći primarni tumori mozga kod odraslih su gliomi koji se mogu podeliti u tri podgrupe u zavisnosti od ćelijskog porekla na astrocitne, oligodendroglijalne i oligoastrocitne tumore (Louis i sar., 2007; Roberts i sar., 2001). Među primarnim tumorima mozga najčešći je glioblastoma multiforme (GBM) koji čini 12-15% svih intrakranijalnih maligniteta i 60-75% svih astrocitnih tumora. Ovo je najmalignija neoplazma poreklom od astrocita koja odgovara gradusu IV, a karakterišu je nekontrolisana ćelijska proliferacija, difuzna infiltracija, izražena sklonost ka nekrozi, angiogeneza, snažna rezistencija na apoptozu i genetska nestabilnost. Intrakranijalni tumori su veoma specifični po tome što je razlika između benignih i malignih formi mnogo manje izražena, zbog čega i benigne promene mogu dovesti do smrtnog ishoda ili teškog neurološkog ispada. Anatomska lokalizacija, takođe bez obzira na histološke osobine tumora, ima veliki uticaj na maligni tok bolesti. Primarni intrakranijalni tumori čine oko 2% svih malignih tumora, a od njih su najbrojniji astrocitomi visokog stepena maligniteta koji čine oko 38% (Levin i sar., 2001).

Unazad 40 godina sprovedeno je na stotine kliničkih studija u cilju produženja preživljavanja pacijenata sa GBM primenom nekog novog agensa, ali bez značajnijeg uspeha. Trenutne terapijske opcije glioma uključuju kombinaciju hirurške resekcije, radioterapije i hemioterapije. Primena kompletne hirurške resekcije nije moguća obzirom na difuzni infiltrativni rast ovih tumora (Bralten i French, 2011). Temozolamid se kod pacijenata sa glioblastomima pokazao efikasnim u produženju životnog veka za 3 meseca (Stupp i sar., 2005), i najefikasniji je kod pacijenata sa hipermetilacijom O6-metilguanin-DNK metiltransferaze (MGMT) promotera (Hegi i sar., 2005). Adjuvantno primenjeni prokarbazin, lomustin i vinkristin nakon hirurškog odstranjivanja usporavaju progresiju bolesti, ali ne dovode do produženja života kod pacijenata sa oligodendrogliomima i oligoastrocitomima (Giannini i sar., 2008; van den Bent i sar., 2006).

Dok hirurško odstranjivanje i dalje ostaje terapija izbora, traga se za uspešnom ciljanom terapijom (Tabela 2), koja bi u kombinaciji sa klasičnom hemioterapijom ili radioterapijom dovela do boljih rezultata u lečenju GBM (Sathornsumetee i sar., 2007).

Tabela 2. Ciljana terapija za GMB (www.clinicaltrials.gov; Sathornsumetee i sar., 2007).

Ciljni mehanizam	Ciljni molekul	Primenjena mono-terapija	Kombinovana terapija	
Tirozin kinazni receptor	EGFR	erlotinib	erlotinib + zračenje;	
			erlotinib + temozolomid;	
			erlotinib + temsirolimus;	
			erlotinib + sorafenib;	
		gefitinib	gefitinib + everolimus;	
		cetuksimab	cetuksimab + temozolomid + zračenje;	
		EGFRvIII i amp wtEGFR	mAb 806	
		PDGFR	imatinib (PDGFR, c-Kit, Abl)	imatinib + temozolomid;
				imatinib + vatalanib + hidroksiurea;
				imatinib + hidroksiurea;
		VEGFR i multi-RTK	AZD2171 (VEGFR, PDGFR, c-Kit); vatalanib (VEGFR, PDGFR, c-Kit); sunitinib malat (PDGFR, VEGFR1/2, c-Kit); AEE788 (EGFR, VEGFR1/2); ZD6474 (EGFR, VEGFR2/3); lapatinib (EGFR, HER2); sorafenib (RAF, VEGFR2/3, PDGFR, c-Kit);	sorafenib + temsirolimus; sorafenib + (temsirolimus/ tipifarnib/erlotinib);
			pazopanib (VEGFR, PDGFR, Kit) tandutinib (FLT3, PDGFR)	pazopanib + lapatanib;
		Ligand	VEGF	bevacizumab VEGF-Trap
Prenos signala	Akt	perifosin		
	PKC	tamoksifen	tamoksifen + bortezomib;	
		enzastaurin		
	mTOR	AP23573		
		everolimus sirolimus temsirolimus	everolimus + temozolomid; temsirolimus + temozolomid + radiation;	
Modifikacija proteina	HDAC	suberoilanilid hidroksamična kiselina	SAHA + temozolomid;	
	Farneziltransferaza	tipifarnib		
		lonafarnib	lonafarnib + temozolomid;	
		depsi-peptid	lonafarnib + temozolomid;	
Ostalo	$\alpha\beta3$ Integrin	cilengitid	cilengitid + zračenje;	
	Steroidni receptori	sintetski retinoidi (npr. al-trans i 13-cis retinoična kiselina);		
	Proteozom	bortezomib		
	Sp1 transkripcioni faktor	tetra-O-metil nordihidroguairetična kiselina		

Ćelije glioblastoma karakteriše ekstremna rezistencija na hemioterapiju (Quezada i sar., 2013). Ovom fenomenu u najvećoj meri doprinosi prisustvo membranskih ABC (engl. „*ATP-binding Cassette Superfamily*“) efluksnih pumpi koje se u velikoj meri eksprimiraju i na krvno-moždanoj barijeri (Efferth, 2001). Pored toga, MDR se kod GBM javlja kao posledica genske nestabilnosti koja je uzrokovana brojnim mutacijama i gubicima heterozigotnosti, hromozomskim delecijama i genetskim amplifikacijama. Ovakvom fenotipu doprinose i ostale karakteristike GBM kao što su izražena invazivna svojstva tumorskih ćelija da se šire duž struktura korpus kalozuma i lociraju iza krvno moždane barijere i prisustvo matičnih ćelija (Louis i sar., 2007). GBM je među najbolje prokrvljenim tumorima u ljudskoj populaciji. Vaskularizacija tumora uključuje nekoliko mehanizama: klasična angiogeneza, nastajanje krvnih sudova iz postojećih usled migracije tumorskih ćelija i vaskulogeneza. Hipoksija se smatra glavnim uzrokom ubrzane angiogeneze u koju je uključeno više od 100 gena. Glavni činilac vaskularne disfunkcije je VEGF kojeg zbog nastale hipoksije u većoj meri proizvode tumorske ćelije u blizini nekrotičnih regiona.

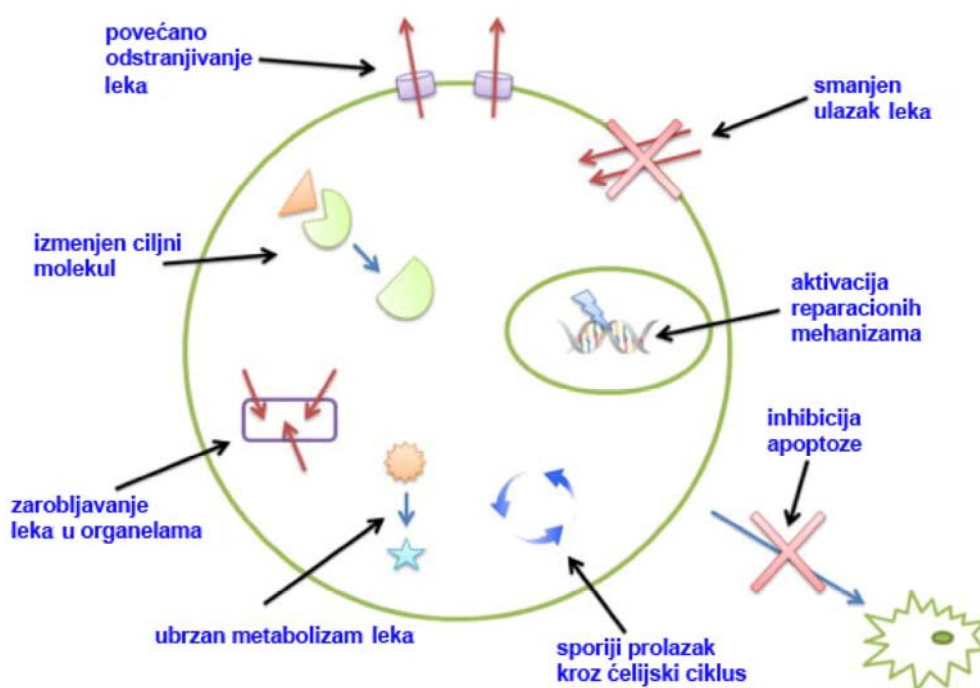
Brz i infiltrativni rast GBM karakteriše širenje u perivaskularni prostor i angioinvazija, dok se tumor retko širi u subarahnoidalni prostor i duž likvora. Opisani su brojni molekularni medijatori ove invazije, uključujući aktivaciju TGF- β i Akt puta. Jedan od važnih aspekata invazije GBM je sekrecija proteolitičkih enzima, čime je omogućena migracija tumorskih ćelija kroz vanćelijski matriks (Louis i sar., 2007).

Amplifikacija *EGFR* gena u primarnim GBM se javlja kod oko 40% tumora, u sekundarnim GBM je retka, dok ona nije pokazana kod pacijenata mlađih od 35 godina. Najčešća genetska promena je LOH hromozoma 10, koji se javlja u 60 do 80% slučajeva, podjednako u primarnim i sekundarnim GBM. Neke rekurentne genetske alteracije mogu biti prognostički faktor, te je shodno tome utvrđeno da je kod 20 do 25% pacijenata sa GBM kod kojih je nađen LOH hromozoma 1p preživljavanje bilo vrlo kratko (<20% pacijenata preživi duže od godinu dana) (Burton i sar., 2002). Promene na *p53* se takođe smatraju prognostičkim faktorom kod pacijenata sa gliomima (Milinkovic i sar., 2012).

1.4. VIŠESTRUKA REZISTENCIJA NA LEKOVE

Višestruka ukrštena rezistencija na lekove (MDR) predstavlja fenomen kojim se tumorska ćelijska populacija štiti od velikog broja lekova koji se međusobno razlikuju po hemijskoj strukturi i mehanizmu dejstva. Rezistencija na antitumorske lekove je jedna od glavnih prepreka uspešnoj primeni hemioterapije. Neki tumori kao što su karcinomi pluća i rektalni karcinomi ispoljavaju takozvanu primarnu ili urođenu (inherentnu) rezistenciju zbog koje od početka ne reaguju na standardnu hemioterapiju (Roy i sar., 2007). S druge strane, mnogi senzitivni tumori na početku lečenja dobro reaguju na primenjenu terapiju, ali vremenom stižu rezistenciju.

Višestruka ukrštena rezistencija je specifična po tome što tumorske ćelije izložene dejstvu jednog hemioterapeutika postaju rezistentne ne samo na njega, već i na druge hemioterapeutike koji su strukturno i funkcionalno različiti. U osnovi rezistencije nalazi se kombinacija brojnih mehanizama (Slika 3).



Slika 3. Mehanizmi rezistencije na antineoplastične lekove (Gong, 2012)

Najbolje proučeni mehanizmi za koje je potvrđen i klinički značaj su (Stavrovskaya, 2000):

1. Aktivacija transmembranskih proteina tj. efluksnih pumpi koji iz ćelije izbacuju supstance različite hemijske strukture;
2. Aktivacija enzima glutationskog detoksifikacionog sistema;
3. Promene u genima i proteinima koji regulišu proces apoptoze (posebno *p53* i *Bcl-2*).

Klasičan mehanizam MDR-a je prekomerna ekspresija efluksnih membranskih pumpi koje izbacuju hemioterapeutik iz ćelija. Najtipičnije efluksne pumpe u ćelijskoj membrani su P-glikoprotein (P-gp) i MRP1 (engl. „*Multi-drug Resistance Associated Protein 1*“). Ove pumpe su odgovorne za transport brojnih supstrata iz ćelija i nisu specifične samo za antitumorske lekove (Choi, 2005). Ovaj mehanizam je najčešći uzrok stečene rezistencije koja se javlja nakon primene hemioterapije.

Do MDR takođe mogu dovesti mutacije, koje su u osnovi maligne transformacije ćelija i patogeneze bolesti. U razvoju rezistencije učestvuju i tumorska mikrosredina, komunikacija između tumorskih ćelija i ćelija u okruženju, sastav vanćelijskog matriksa, citokini, hormoni i brojni faktori rasta (Sarkadi i sar., 2006).

Urođena tj. *de novo* rezistencija nastaje u toku karcinogeneze i sve ćelije sa ovakvim genotipom su rezistentne na klasičnu hemioterapiju (Goodman & Gilman's, 2007). Urođena rezistencija je genetski uslovljena mutacijama na *p53* genu koje vode ka narušavanju funkcije P53, zbog čega se ćelije odupiru apoptozi ili zaustavljanju u restrikcionim tačkama ćelijskog ciklusa. Utvrđena je pozitivna korelacija između mutacija na *p53* i ćelijske osetljivosti na hemioterapeutik (O'Connor i sar., 1997). Ćelije sa mutiranim *p53* razvijaju rezistenciju na lekove koji imaju različiti mehanizam dejstva (npr. cisplatin i 5-fluorouracil).

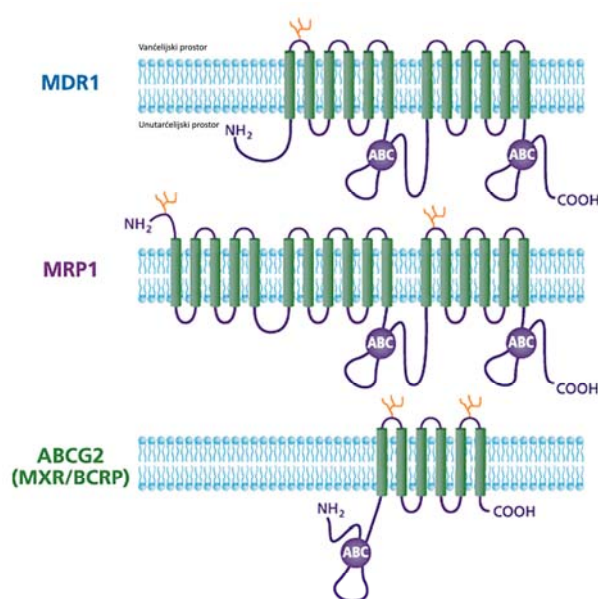
1.4.1. Klasični mehanizam MDR-a - Smanjena akumulacija hemioterapeutika

Razvoj rezistencije na hemioterapiju se dovodi u vezu sa prisustvom efluksnih pumpi na ćelijskoj membrani koje izbacuju lek iz ćelije i na taj način onemogućavaju njegovo dejstvo (Gottesman, 2002). Postoje tri glavna tipa humanih MDR membranskih

transportera i svi pripadaju superfamiliji ABC transportera, koji vrše ATP-zavisan transport: ABCB1/MDR1/P-glikoprotein, ABCC1/MRP1 i ABCG2/MXR/BCRP (Slika 4). Ove pumpe prepoznaju veoma širok spektar različitih supstrata. Iako među njima postoje sličnosti u pogledu strukture i supstrata, ove pumpe se razlikuju kako prema lokaciji gena koji ih kodiraju, tako i prema aminokiselinskoj sekvenci (Gottesman i Pastan, 1993).

ABC transporteri su konstitutivno prisutni u normalnim ćelijama uključujući ćelije tankog creva, debelog creva, pankreasa, epitelne ćelije bubrega, mozga, testisa i endotelne ćelije (Choi, 2005).

U skladu sa tkivnom distribucijom, ABC transporteri su odgovorni za apsorpciju i sekreciju endogenih i egzogenih supstanci i funkcionišu kao efluksne pumpe za lipide, različite lekove, prirodne supstance i peptide. Endogeni supstrati za P-gp pumpu su



kortikosteron (Wolf i Horwitz, 1992), beta estradiol, 17beta-D-glukuronid (Liu i sar., 1996), endogeni holestatski metabolit estradiola 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfoholin (opšti trombocitni faktor aktivacije) (Ernest i Bello-Reuss, 1999), glutamat (Liu i Liu, 2001) i endorfin (King i sar., 2001). Pokazano je da P-gp pumpa otklanja beta-amiloid, uzročnik Alchajmerove bolesti (Vogelgesang, 2002; Lam, 2001).

Slika 4. Modeli membranskih transportnih proteina (www.sigmaaldrich.com)

MRP1 (engl. „*multidrug resistance associated protein*“) pumpa vrši efluks različitih konjugovanih supstrata kao što su leukotrien C4 konjugat (Jedlitschky, 1999), steroidni konjugati, aflatoksin konjugovan sa GSH (Loe i sar., 1995). MRP1 je prisutan u normalnim tkivima mišića, pluća, slezine, bešike i adrenalne žlezde (Zaman i sar., 1993). Niska bazalna ekspresija MRP1 uočena je u mnogim tkivima i ćelijama, uključujući i zrele ćelije krvne loze

(Loe i sar., 1996). MRP2 (ili kanalikularni multispecifični transporter organskih anjona – cMOAT) se nalazi u jetri gde vrši izlučivanje glutationskih i glukuronskih konjugata kroz kanalikularnu membranu u žuč (Mayer i sar., 1995). Takođe, MRP2 je prisutan u bubrezima na apikalnoj strani proksimalnog tubularnog epitela, gde vrši izlučivanje endogenih supstanci i ksenobiotika. MRP1 se nalazi na bazolateralnoj strani bronhijalnih cilijarnih epitelnih i mukoznih ćelija. Bazalne ćelije seromukoznih žlezda pluća i alveolarni makrofazi su takođe MRP1 pozitivni (Scheffer i sar., 2002) dok se kod bazalnih ćelija MRP1 nalazi duž cele plazma membrane (Brecht i sar., 1998).

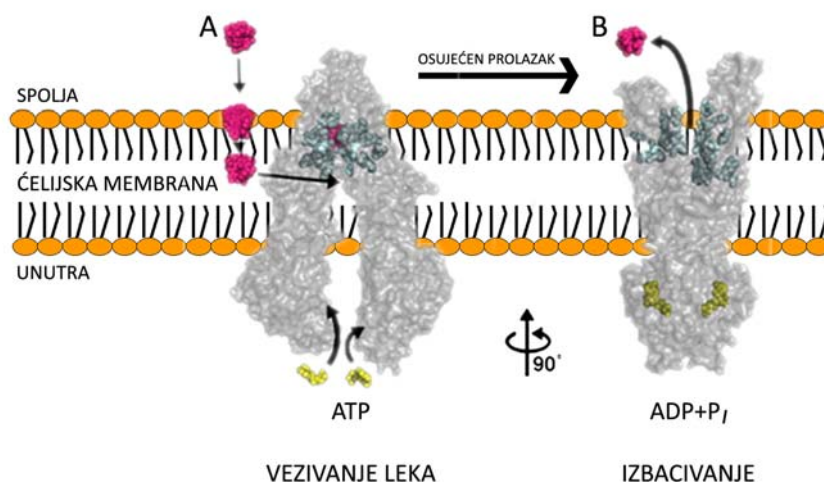
ABCG2 transportni protein je prvi put otkriven kao transporter za mitoksantron. Ova transportna pumpa je eksprimirana u velikom broju tkiva uključujući digestivni trakt, bubrege, placentu, endotelijalne ćelije mozga i hematopoetske stem ćelije. Njegova ekspresija u mlečnim žlezdama je veoma snažno indukovana tokom trudnoće i dojenja. Slično kao P-gp pumpa, ABCG2 ima ulogu u zaštiti tkiva od toksina i ksenobiotika. Pored toga, odgovoran je za transport riboflavina (vitamin B2) u mleko (van Herwaarden i sar., 2005). Ovaj transporter je i marker pluripotentnih hematopoetskih stem ćelija, gde interreaguje sa hemom i sprečava akumulaciju porfirina, omogućavajući preživljavanje stem ćelija u hipoksičnim uslovima (Krisnamurthy i sar., 2004). Ova transportna pumpa iz ćelija može izbaciti kako nemodifikovane lekove tako i konjugate lekova. Transportuje i pozitivno i negativno naelektrisane lekove, uključujući i sulfatne konjugate (Staud i Pavek, 2005; Ishikava i sar., 1994). ABCG2 transportuje i nove ciljane terapeutike, kao što su imatinib i gefitinib (Sharom, 2008).

Veoma značajnu fiziološku ulogu ovi transportni proteini ostvaruju na tkivno-krvnim barijerama, kao što su krvno-moždana barijera, krvno-placentalna barijera i krvno-testisna barijera u cilju obezbeđivanja homeostaze u određenim tkivima osetljivim na ksenobiotike (Choi, 2005). Povišena ekspresija ovih pumpi se očekuje kod tumora poreklom od ćelija koje inače normalno eksprimiraju ove transportne proteine (debelo crevo, bubrezi, nadbubrežna žlezda, pankreas, jetra).

1.4.1.1. P-glikoprotein

Prvi otkriveni, najviše proučavan i najbolje okarakterisan transportni protein je membranski glikoprotein P-gp (170 kDa) kodiran od strane *mdr1* gena (Gros i sar., 1988). Glavna uloga P-gp-a se ogleda u zaštiti ćelija od toksičnih agenasa (Schinkel, 1997). Posredstvom P-gp pumpe, hidrofobni lekovi se izbacuju iz ćelije u neizmenjenoj formi. Urođena prekomerna zastupljenost P-gp-a je prisutna kod karcinoma debelog creva, bubrega, hepatoma, tumora nadbubrežne žlezde, NSCLC, ali i kod hematoloških maligniteta, kao što su akutna mijeloidna leukemija, hronična limfatična leukemija i limfomi T-ćelija (Goldstein, 1989). P-gp zavisani (stečeni) rezistentni fenotip se razvija kao odgovor na primenu epipodofilotoksina (npr. etoposid), antraciklina (npr. doksorubicin - DOX), vinka alkaloida (vinkristin) i taksana (paklitaksel - PTX) (Abolhoda i sar., 1999). Kao odgovor na hemioterapiju, prekomerna ekspresija P-gp pumpe se javlja kod adenokarcinoma pluća i materice, tumora dojke i sarkoma, uključujući i osteosarkome (Goldstein i sar., 1989), kod hematoloških maligniteta, posebno multipnog mijeloma (Marie i sar., 1996).

Do sada je predloženo nekoliko funkcionalnih mehanizama efluksa ksenobiotika P-gp pumpom (Sharom i sar., 1997). Model klasične pumpe podrazumeva da se lek transportuje iz citoplazme kroz poru P-gp molekula uz energiju koja se oslobađa hidrolizom ATP-a (Altenberg i sar., 1994). U tzv. engl. „*vacuum cleaner*“ modelu, P-gp pumpa u lipidnom dvosloju može detektovati hidrofobne supstrate i direktno ih izbaciti van ćelije. Pretpostavlja se da se izbacivanje leka odvija u dva koraka. Pre nego što supstrat reaguje sa P-glikoproteinom, on se nalazi u ekvilibrijumu u vodenom delu između dva lipidna sloja membrane. Zatim, hidroliza ATP-a dovodi do konformacionih promena na P-glikoproteinu i on izbacuje lek u vanćelijski prostor. Model flipaze (Higgins i Gottesman, 1992) se zasniva na tome da lek koji je insertovan u lipidni dvosloj ćelijske membrane može biti premešten (engl. „*flipped*“) u spoljni sloj membrane, odakle sporom difuzijom biva izbačen u vanćelijski prostor. Trenutno najprihvatljiviji je hidrofobni model, engl. „*vacuum cleaner*“, koji je dokazan u velikom broju studija (Sharom, 2008; Higgins i Gottesman, 1992).



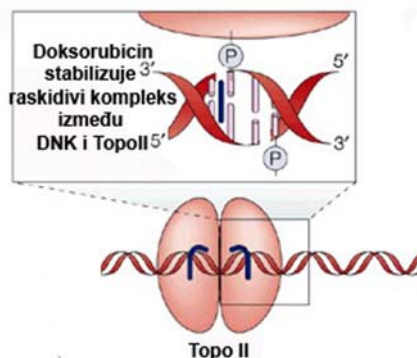
Slika 5. P-gp efluksna pumpa (preuzeto i adaptirano sa www-ssrl.slac.stanford.edu)

Mdr1 gen (ABCB1), koji kodira P-glikoprotein se nalazi na hromozomu 7 (7q21.1). Promene u ekspresiji *mdr1*, kao što je amplifikacija fragmenta genoma koji sadrži ovaj gen, stabilizacija i povišen nivo sinteze *mdr1* iRNK, ali i promene u obradi samog P-glikoproteina ili uticaj P-gp supstrata mogu dovesti do nastanka rezistencije. Amplifikacija *mdr1* je prisutna u ćelijskim linijama sa visokom ekspresijom P-glikoproteina u *in vitro* uslovima, dok u uzorcima pacijenata sa rezistentnim tumorima nije pronađena (Bosh & Croop, 1996). Inducibilnost *mdr1* gena zavisi od tipa ćelije. Uticaj na aktivnost *mdr1* gena vrše različiti stimulusi koristeći različite signalne puteve. Čak i hemioterapeutici koji nisu supstrati za P-gp mogu učestvovati u regulaciji ekspresije *mdr1* gena (Chaudhary & Roninson, 1991). U regulaciju promotorskog regiona *mdr1* su uključeni i *p53*, *ras* i *raf*, *c-fos* i *c-jun* (Bhushan i sar., 1992). Protein kinaza C, protein kinaza A, a verovatno i neke druge protein kinaze učestvuju u regulaciji P-gp aktivnosti (Chaudhary & Roninson, 1991).

1.4.1.2. *In vitro* modeli za proučavanje rezistencije - doxorubicin i paklitaksel

Doxorubicin (DOX) je antraciklinski antibiotik, koji interkalira u DNK lanac i inhibira DNK replikaciju (Slika 6). Paklitaksel (PTX) je lek koji pripada grupi taksana i svoje antitumorsko dejstvo ispoljava vezujući se za β -tubulin što dovodi do stabilizacije deobnog vretena i sprečavanja depolimerizacije mikrotubula (Chen i sar., 1999) (Slika 7). Primena

ovih lekova u standardnoj hemioterapiji u uobičajenim terapijskim protokolima dovodi do razvoja MDR kod velikog broja tumora (Sanfilippo i sar., 1991; Slovak i sar., 1988).



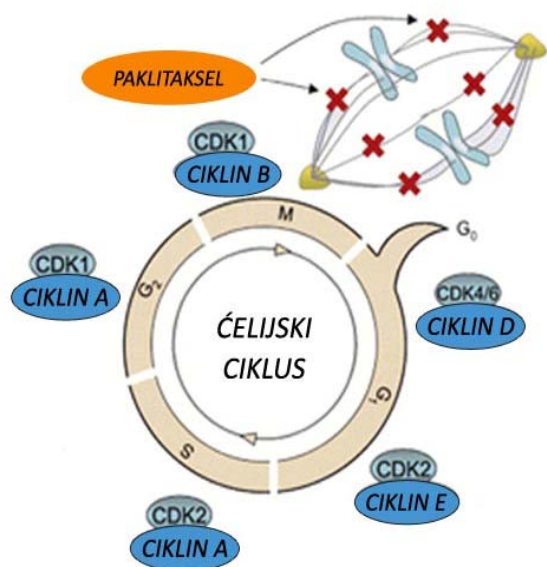
Slika 6. Mehanizam dejstva doksorubicina (Hurley, 2002)

In vitro modeli tumorskih ćelija kod kojih se stabilni MDR fenotip uspostavlja izlaganjem ćelija sukcesivno rastućim koncentracijama ovih lekova u toku dužeg vremenskog perioda predstavljaju pogodne sisteme za ispitivanje novodizajniranih antitumorskih lekova (Meltem i sar., 2006). Iako ovako nastali *in vitro* modeli ne oslikavaju u potpunosti situaciju *in vivo*, veoma je značajan njihov doprinos proučavanju mehanizama i mogućnostima reverzije rezistencije. DOX poseduje široki spektar antitumorskih aktivnosti pa se koristi u lečenju brojnih maligniteta uključujući i tumore pluća (Pronzato i sar., 2001; Hortobagyi, 1997). Svoj citotoksični efekat DOX ostvaruje dejstvom na Topoizomerazu II i stvaranjem dvolančanih prekida na DNK, što predstavlja signal za aktiviranje apoptoze. Procesom redoks cikliranja kvinonske grupe DOX-a dolazi do stvaranja reaktivnih oksigenih vrsta koje izazivaju lipidnu peroksidaciju membrane (Tritton & Yee, 1982). Takođe, DOX pokreće stvaranje NO, malog signalnog molekula, koji reguliše brojne fiziološke i patološke procese unutar ćelije. NO može delovati kao citotoksični i proapoptotski agens, a pokazano je da DOX inhibira rast tumora preko NO-zavisnih mehanizama (Lind i saradnici, 1997). Apoptoza koju indukuje DOX može biti povezana i sa smanjenjem ekspresije inhibitora apoptoze – XIAP i sa podsticanjem fosforilacije Bcl-2 (Hu i sar., 2003).

Rezistencija na DOX može nastati udruživanjem brojnih mehanizama, ali najčešće je povezana sa mutacijama i promenama u ciljnom molekulu – Topoizomerazi II i

povišenom ekspresijom transportnih proteina, prvenstveno P-gp i MRP1 (Beck i sar., 1999). Pod dejstvom DOX-a ćelije pojačavaju detoksifikacionu aktivnost da bi se zaštitile od reaktivnih oksigenih vrsta i lipidne peroksidacije, što takođe može doprineti razvoju rezistencije (Awasthi i sar., 1992). Neka istraživanja pokazuju da u nastanku rezistencije na antracikline kod mnogih tumorskih ćelijskih linija važnu ulogu mogu imati i aktivacija NFκB (Wang i sar., 1999), povišena ekspresija AXL (receptor tirozin kinaze) (Lay i sar., 2007) i povišena aktivnost NHE (Na⁺/H⁺ razmenjivača) (Miraglia i sar., 2005).

Kada je PTX prvi put uveden u hemioterapiju smatralo se da će zbog svog novog mehanizma dejstva ispoljavati efekat i u tumorima koji ekspimiraju MDR (Yusuf i sar., 2003). Međutim, kao u slučaju doksorubicina, daunorubicina, vinblastina ili vinkristina i primena PTX-a dovodi do razvoja MDR koja je uslovljena povećanom aktivnošću ATP zavisnih efluksnih pumpi (Wind i Holen, 2011). U nastanku rezistencije na PTX, uključeni su i drugi mehanizmi kao što su molekularne promene u ciljnom molekulu (β-tubulinu), promene u proteinima regulatorima apoptoze i mitoze, i promene u lipidnom sastavu i potencijalnoj prekomernoj ekspresiji interleukina 6 (IL-6) (Yusuf i sar., 2003).



Kao inhibitor mitoze, PTX se primenjuje u terapiji karcinoma pluća, jajnika, dojke, glave i vrata i uznapredovalih formi Kapoši sarkoma (Saville i sar., 1995). PTX dovodi do defekta u mitotskom vretenu, hromozomskoj segregaciji i podeli ćelija. Kao posledica dejstva PTX blokira se ulazak ćelije u mitozu (Slika 7), prolongira se aktivacija mitotskih kontrolnih tačaka okidača apoptoze ili dolazi do reverzije u G₁-fazu ćelijskog ciklusa bez ulaska u deobu (Brito i sar., 2008; Rajnish i sar., 2004).

Slika 7. Mehanizam dejstva paklitaksela (Wessely i sar., 2006)

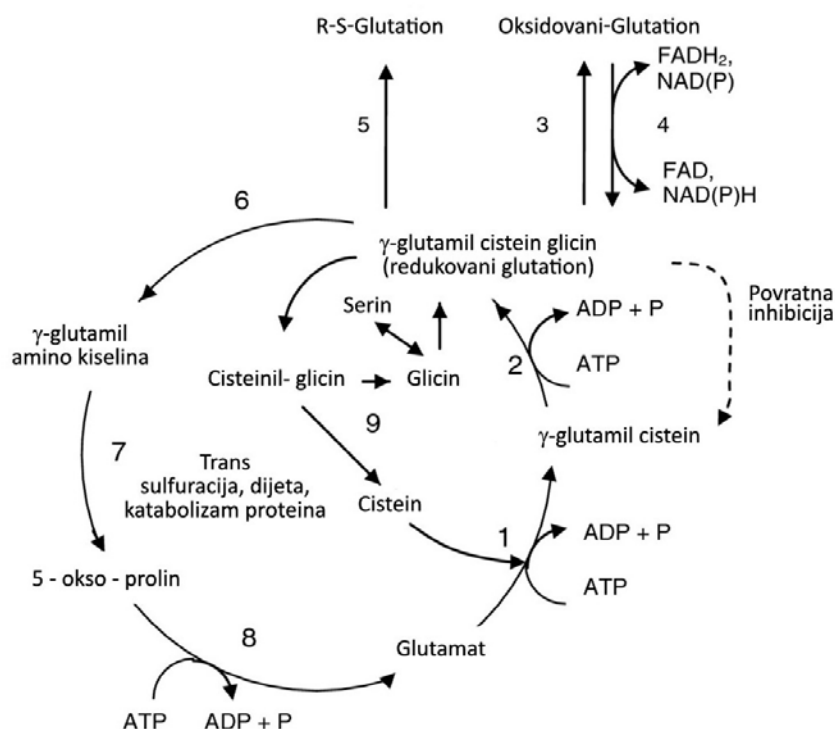
1.4.2. Rezistencija posredovana detoksifikacijom

Ćelijski glutationski sistem je kritična komponenta detoksifikacije citostatika. Nakon ulaska u ćeliju, neki lekovi podležu biotransformaciji i prolaze kroz nekoliko faza metabolizma, pre nego što budu odstranjeni iz ćelije. U prvoj fazi, supstance podležu oksidaciji, redukciji ili hidrolizi, dok se u drugoj fazi ksenobiotici konjuguju sa glukuronskom kiselinom, sulfatnim, metil, acetil ili glutationskim grupama. Jedinjenja konjugovana sa glutationom se u trećoj fazi izbacuju iz ćelije posredstvom GS-X pumpi, u koje spada i MRP1 (Ishikawa, 1992). Biotransformacija i transport ksenobiotika van ćelije predstavljaju osnovu ćelijske zaštite. Isuviše aktivan detoksifikacioni sistem u tumorskim ćelijama smanjuje efikasnost hemioterapije.

Glutationski sistem detoksifikacije je veoma važan mehanizam za održavanje homeostaze u ćelijama sisara (Shen i sar., 1997). Glavne komponente ovog sistema su glutation (GSH), enzimi i transportne pumpe. GSH je linearni tripeptid koji se sastoji od glutamina, cisteina i glutamata. Oksidovana forma glutationa ili glutation disulfid (GSSG) nastaje povezivanjem dva GSH molekula pod katalitičkim dejstvom glutation peroksidaze (GPX). Reverzibilan proces se odvija posredstvom glutation reduktaze (GSR).

GSH pravi konjugate sa ksenobioticima, toksičnim superoksidima ili antitumorskim agensima pod katalitičkim dejstvom glutation-S-transferaze (GST), zbog čega ove supstance postaju manje aktivne i lakše rastvorljive u vodi (Slika 8).

GSH takođe vrši detoksifikaciju peroksida nastalih od oksigenih radikala i posredstvom transhidrogenaza redukuje oksidovane centre na DNK, proteinima i drugim biomolekulima (Yang i sar., 2006). Ključni enzimi za funkcionisanje glutationskog sistema detoksifikacije su gama glutamil-cistein sintetaza (γ GCS) i GST.



Slika 8. Glutationski sistem detoksifikacije (Main i sar., 2012)

Humane citosolne GST svrstane su u 8 klasa (α , κ , μ , π , σ , θ , ζ , ω). GST μ detoksifikuje karcinogene iz duvanskog dima i druge, kao što su benzo(a)piren, stiren-7,8 oksid i *trans*-stilben oksid (Mohr i sar., 2003). GST θ detoksifikuje molekulske toksine kao što su etilen oksid i metilhalogenoidi, metil bromid, epoksibutani, holometani, karcinogeni iz duvanskog dima i antitumorski agensi (Rebbeck, 1997).

Povišen nivo ekspresije GST π je često u sprezi sa povišenim nivoom ekspresije P-glikoproteina (Tew, 1994), pa se dovodi u vezu sa pojavom stečene rezistencije na mnoge antitumorske lekove. Moguće je da se kod nekih tumorskih ćelija radi o koordinisanoj regulaciji ekspresije gena iz nekoliko različitih detoksifikacionih sistema.

Povećana koncentracija GSH, povećana aktivnost GSH enzima i efluksnih GS-X pumpi smanjuje efikasnost primenjenih antitumorskih terapeutika, posebno kod tumora pluća gde visoka koncentracija GSH može ukazati na prisustvo urođene rezistencije (Yang i sar., 2006).

1.4.3. ODUPIRANJE APOPTOZI

Da li će ćelija ući u apoptozu ili nastaviti napredovanje kroz ćelijski ciklus zavisi od odnosa između složene grupe gena i proteina koji međusobno reaguju regulišući ćelijski ciklus. Rezistencija se može razviti ukoliko ćelije štiteći se od apoptoze menjaju ekspresiju proteina koji treba da odgovore na povredu ćelije kao što je hemioterapija (Shabbits i sar., 2003).

1.4.3.1. Tumor supresorski geni i MDR

Promene koje dovode do narušavanja funkcije P53 su veoma česte kod tumora bilo da se radi o mutacijama u *p53* genu ili poremećenoj regulaciji ekspresije. Kod više od 50% tumora prisutne su mutacije *p53* gena (Shabbits i sar., 2003). Gubitkom P53 tumorske ćelije su u mogućnosti da se umnožavaju i u prisustvu oštećenja na DNK. Sposobnost provere i zaustavljanja ćelijskog ciklusa zbog oštećenja ne postoji, a sprečena je i aktivacija proapoptotskih faktora (Stavrovskaya, 2000). Pozitivna korelacija između P53 statusa i osetljivosti ćelija na različite citotoksične lekove je utvrđena kod velikog broja tumorskih ćelijskih linija (O'Connor i sar., 1997).

Sistem koji takođe utiče na pojavu rezistencije na hemioterapeutike je signalni put u kojem učestvuje tumor supresor PTEN. Njegova supresorska funkcija je u vezi sa negativnom regulacijom fosfatidil-inozitol 3 kinaza (PI-3K)/Akt signalnog puta, ključnog regulatora ćelijskog preživljavanja. PTEN, kada je usled oštećenja ugrožen opstanak ćelije, povećava osetljivost na hemioterapiju. Ćelije bez PTEN-a pokazuju rezistenciju na brojne apoptotske stimulse: UV zračenje, $TNF\alpha$, cikloheksamid, sorbitol itd (Stambolić i sar., 1998).

1.4.3.2. Poremećaj balansa proapoptotskih i antiapoptotskih proteina

Bcl-2 familija proteina igra ključnu ulogu u regulaciji mitohondrijalnog unutrašnjeg puta apoptoze. Bcl-2 protein otkriven je pre skoro 30 godina, kodiran je istoimenim genom, a ime mu potiče od B ćelijski limfom 2 (engl. „*B cell lymphoma*“) jer je prvi put identifikovan u B ćelijskom limfomu sa translokacijom 14-18 (Tsujimoto i sar., 1984).

Većina članova Bcl-2 familije su dimerni proteini, smešteni na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani gde regulišu njenu propustljivost, a imaju funkciju jonskih kanala ili mogu da formiraju permeabilizacione pore (Minn i sar., 1997). Na osnovu funkcije i Bcl-2 homolognih (BH) domena svi pripadnici Bcl-2 familije su podeljeni u 3 grupe. Prvu grupu čine antiapoptotski članovi koji imaju sva 4 BH domena i tu spadaju Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1, i Bcl-B/Bcl2L10. Drugu grupu čine proapoptotski proteini koji imaju samo BH-3 domen i nazivaju se engl. „BH-3-only“ proteini i tu spadaju Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk, i Bik. Treću grupu čine takođe proapoptotski proteini, ali oni za razliku od druge grupe imaju sva 4 BH domena i nju čine Bax, Bak i Bok/Mtd (Dewson i sar., 2010).

Smanjena sposobnost ćelija da uđu u apoptozu ili rezistencija na apoptozu može nastati zbog prekomerne ekspresije antiapoptotskih proteina, smanjene ekspresije proapoptotskih proteina, ili kombinacije oba. Pokazano je da prekomerna ekspresija Bcl-2 proteina štiti ćelije karcinoma prostate od indukcije apoptoze (Raffo i sar., 1995). Prekomerna ekspresija Bcl-xl gena je odgovorna za nastanak MDR na lekove, „štiteći“ ćelije od ulaska u apoptozu (Minn i sar., 1996). Tako na primer, u hroničnoj limfocitnoj leukemiji maligne ćelije imaju antiapoptotski fenotip sa prekomernom ekspresijom Bcl-2 proteina i niskim koncentracijama proapoptotskih proteina kao što je Bax (Goolsby i sar., 2005).

1.4.3.3. Poremećaj funkcije kaspaza

Kaspaze se mogu grubo podeliti u 2 grupe: kaspaze koje učestvuju u produkciji citokina i koje su aktivne tokom inflamatornog odgovora (kaspaze 1, 4, 5, 13 i 14) i kaspaze koje imaju ključnu ulogu u apoptozi (kaspaze 2, 3, 6, 7, 8, 9 i 10). Nishodna regulacija kaspaze-9 je čest događaj kod pacijenata u stadijumu II kolorektalnog karcinoma i u korelaciji je sa lošom prognozom (Shen i sar., 2009).

Kaspaze vrše proteolizu ključnih ćelijskih komponenti, kao što su DNK reparacioni proteini, citoskeletni i strukturni proteini (laminin B1 i aktin). Njihovom aktivnošću ćelija se nepovratno razgrađuje i javljaju se biohemijski i morfološki znaci apoptoze (Shabbits i sar., 2003). Pretpostavlja se da članovi familije inhibitora apoptoze (IAP) deluju kao inhibitori kaspazne aktivnosti. Visoka ekspresija XIAP-a i survivina, koji inhibiraju kaspaze, povezana

je sa lošom kliničkom prognozom i rezistencijom na hemioterapeutike i jonizujuće zračenje kod različitih malignih tumora (LaCasse i sar., 1998).

IAP su grupa srodnih proteina koji regulišu apoptozu, ćelijsku deobu i prenos signala. Oni se karakterišu prisustvom BIR domena (engl. „*baculovirus IAP repeat*“) (LaCasse i sar., 2008), a do danas ih je opisano osam: NAIP (BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), X-vezani IAP (XIAP, BIRC4), Survivin (BIRC5), Apollon (BRUCE, BIRC6), Livin/MLIAP (BIRC7) i IAP-u sličan protein 2 (BIRC8) (Vucic i sar., 2007). IAP su endogeni inhibitori kaspaza, koji se vezuju za konzervirani BIR domen u aktivnom centru kaspaza, što onemogućava kaspaze da pristupe supstratima, ili indukuje razgradnju aktivnih kaspaza (Wei i sar., 2008). Poremećaj ekspresije IAP-a prisutan je u mnogim malignim oboljenjima. Visoka ekspresija IAP-a je uočena u karcinomu pankreasa, a rezistencija na hemioterapiju je posredovana prekomernom ekspresijom proteina c-IAP2 (Lopes i sar., 2007). Apollon je prekomerno eksprimiran u ćelijama glioma i odgovoran je za rezistenciju na apoptozu indukovano cisplatinom i kamptotecinom (Chen i sar., 1999). I za mnoge druge članove IAP familije pokazana je jasna veza sa malignim tumorima.

1.5. STRATEGIJE ZA PREVAZILAŽENJE MDR

Potruga sa netoksičnim agensom koji će uspešno prevazići MDR je dugogodišnji izazov u oblasti dizajna antitumorskih lekova. Hemioterapeutici se danas uglavnom primenjuju u kombinacijama koje obezbeđuju upotrebu nižih koncentracija dva ili tri leka, te se na taj način pored sinergističkog efekta smanjuje i neželjena sistemska toksičnost. Međutim, problem rezistencije i dalje ostaje nerešen.

U dizajniranju specifičnog pristupa za prevazilaženje rezistencije, primenjivog u kliničkoj praksi, postoje brojne prepreke: ograničeno razumevanje kliničkog značaja različitih molekularnih događaja uključenih u formiranje rezistencije kod tumora, nedostaci odgovarajuće dijagnostike, nemogućnost predviđanja odgovora na određene hemioterapeutike, poteškoće u određivanju zastupljenosti MDR molekula u pojedinim ćelijskim populacijama tumora, kao i postojanje ćelijskih populacija unutar tumora koje su

spodobne da istovremeno uključe nekoliko različitih mehanizama rezistencije kao odgovor na hemioterapiju.

Dva su osnovna pristupa u savladavanju problema MDR (Borowski i sar., 2005):

1. razvoj leka koji će biti sposoban da ispolji citotoksični efekat i prema MDR ćelijama tumora, i
2. razvoj supstanci/lekova koje će biti sposobne da povrate (revertuju) citotoksičnost postojećih klasičnih hemioterapeutika.

Samo prostim povećanjem primenjene doze standardnog hemioterapeutika nije moguće ostvariti bolji terapijski efekat jer se ujedno povećava i njegova neželjena sistemska toksičnost, a mehanizam rezistencije biva i dalje stimulisan. U terapiji se mogu primenjivati i drugi hemioterapeutici, koji nisu supstrat za ABC transportne pumpe, kao što su ciklofosfamidi, antimetaboliti (nukleozidni analozi) ili modifikovani hemioterapeutici koji ne ispoljavaju afinitet ka pumpama. Najčešće korišćeni pristup za reverziju MDR fenotipa je hemiosenzitizacija agensima koji modulišu transportne proteine, prvenstveno P-glikoproteina.

Agensi koji deluju na nivou ekspresije ili aktivnosti membranskih transportnih proteina se nazivaju MDR modulatori. Klasična farmakološka strategija u postizanju ovog cilja uključuje istovremenu primenu P-gp inhibitora i citotoksičnog agensa koji je supstrat za P-glikoprotein. Različitim mehanizmima može se inhibirati P-gp efluks: blokadom vezujućeg mesta za lek na P-glikoproteinu, inhibicijom ATP hidrolize, i promenom integriteta ćelijske membrane (Ernst i sar., 2010; Yang i sar., 2008). Modulatori koji i sami predstavljaju supstrate za P-gp i takmiče se sa hemioterapeutikom za vezujuće mesto na P-glikoproteinu, vrše kompetitivnu inhibiciju, dok nekompetitivni inhibitori blokiraju ATP-aznu aktivnost P-glikoproteina. Modulacija P-glikoproteina kroz interakcije sa membranskim fosfolipidima menja fizičko-hemijske karakteristike lipidne membrane i narušava fiziološko okruženje ovog transportera (Takara i sar., 2006). Veliki broj MDR modulatora, od sintetičkih do prirodno dobijenih supstanci, su u *in vitro* uslovima pokazali dobar rezultat u prevazilaženju rezistencije na klasične hemioterapeutike, međutim, iako su neki od njih prošli i kroz kliničke faze ispitivanja još uvek nisu odobreni za terapijsku primenu.

1.5.1. Razvoj kompetitivnih modulatora

Do danas su ispitivane tri generacije jedinjenja inhibitora P-gp-a. Prvu generaciju MDR modulatora čine kompetitivni supstrati P-gp-a kao što su verapamil (blokator kalcijumskih kanala), ciklosporin A (imunosupresor) i kvinidin (antiaritmik) koji se dugi niz godina primenjuju u kliničkoj praksi za druge indikacije. Oni nisu u potpunosti selektivni za P-gp i mogu izazvati ozbiljna neželjena dejstva. Doze ovih lekova neophodne za postizanje hemiosenzitivizacije dovode do izražene kardiotoksičnosti, imunosupresije, odnosno renalne toksičnosti i hepatotoksičnosti. Pored toga, blokiranje aktivnosti P-glikoproteina može poremetiti funkciju krvno-moždane barijere kao i homeostazu u organizmu koja se delom održava aktivnošću ovog transportera.

Drugu generaciju MDR modulatora čine analozi i stereoizomeri prve generacije lekova kao što su deksverapamil, valspodar ili sinhonin koji ispoljavaju veću selektivnost za P-glikoprotein i veću aktivnost. Deksverapamil je značajno manje toksičan, valspodar ne ispoljava imunosupresivno dejstvo a u hemiosenzitivizaciji je deset puta snažniji od ciklosporina A. Dva nova molekula VX-710 i VX-853 su efikasna u blokadi obe MDR pumpe, P-glikoproteina i MRP1 (Lee, 2010).

Razvoj terapijski efikasnog modulatora ograničavaju mnogi faktori među kojima su toksičnost i farmakokinetičke interakcije (Hall i sar., 2009; Mayur i sar., 2009; Takara i sar., 2006). Modulatori prve generacije su toksični za normalno tkivo obzirom da ispoljavaju i druge efekte osim inhibicije P-glikoproteina, tako da dalja klinička ispitivanja ovih modulatora nakon faze I nisu odobrena (Robert i Jarry, 2003). Modulatori druge generacije imaju mnogo bolji toksikološki profil, ali njihovu kliničku primenu ograničavaju drugi faktori. Oni pored inhibicije P-gp-a blokiraju i druge ABC transportere kao što su MRP2 (Krishna i Mayer, 2000). U slučaju kombinacije modulatora druge generacije sa hemioterapeuticima koji su supstrati za P-gp javljaju se neželjena dejstva u vidu neutropenije i mijelotoksičnosti (L'homme i sar., 2008). Pored toga, ovi molekuli su supstrati za citohrom P-450 (CYP), pa su neizbežne njihove farmakokinetičke interakcije sa antitumorskim lekovima u oksidativnim reakcijama posredovanih CYP-om, što za posledicu može imati intoksikaciju citotoksičnim lekom (Kang i sar., 2001).

1.5.2. Razvoj nekompetitivnih modulatora

Treća grupa modulatora obuhvata molekule koji su dizajnirani tako da njihove specifične fizičko-hemijske karakteristike kao što su lipofilnost, pozitivno naelektrisanje pri neutralnom pH i prisustvo aromatičnog prstena prevaziđu manjkavosti prethodnih generacija MDR modulatora (Mayur i sar., 2009). Oni se sa visokim afinitetom vezuju za P-gp (Yang i sar., 2008). U ovu grupu spadaju LY 335979 (zosukvidar), GF 120918, XR9051 (tarikvidar), OC144-093, R101933 (lanikvidar). U reverziji MDR-a su efikasni pri nanomolarnim koncentracijama i ne poseduju druga farmakološka dejstva. Iako su ovi molekuli ispitivani u dobro dizajniranim kliničkim studijama do sada nisu pokazali zadovoljavajući efekat da bi bili uvedeni u terapijsku primenu (Fletcher i sar., 2010).

Pri kombinaciji klasičnih hemioterapeutika sa trećom generacijom MDR modulatora ne dolazi do ispoljavanja značajnih farmakokinetičkih efekata, što ukazuje na nepostojanje interakcije ovih inhibitora sa CYP-om ili drugim ABC transporterima (Cnubben i sar., 2005). I i II faza kliničkih studija u kojima se ispituju MDR modulatori treće generacije kao što su zosukvidar, tarikvidar, lanikvidar su završene (Lee, 2010). Treća generacija modulatora MDR je za sada pokazala najveću selektivnost, ali neka klinička ispitivanja faze III su prekinuta zbog pojave izražene toksičnosti ili zbog lošijeg terapijskog efekta u odnosu na efekat koji se dobijao primenom već postojeće klasične hemioterapije (Cripe i sar., 2010). Otežavajući faktori zbog kojih treća generacija inhibitora za sada ne daje bolji terapijski efekat su nepostojanje dijagnostike za MDR, nemogućnost empirijskog smanjenja doze hemioterapeutika i postojanje polimorfizma u *mdr1* genu (Szakacs i sar., 2006; Lepper i sar., 2005; Gottesman i sar., 2002).

1.5.3. Razvoj novih strategija za modulaciju MDR

Do danas su razvijene mnoge supstance različite hemijske strukture, sa različitim mehanizmom dejstva koje pokazuju potencijal za modulaciju MDR i uopšteno se mogu podeliti na:

1. Agensi koji stabilizuju mikrotubule, tj. inhibitori depolimerizacije mikrotubula (npr. epotiloni, druga i treća generacija taksana) (Lazo i sar., 2010; Galmarini, 2009; Gross i sar., 2008; Ferlini i sar., 2003).
2. Inhibitori polimerizacije tubulina (npr. kriptoficini, halihondrini, hemiasterlini, STX140), koji sprečavaju polimerizaciju tubulina i promovišu depolimerizaciju filamenata mikrotubula (Ismael i sar., 2008; Newman i sar., 2008).
3. Inhibitori topoizomeraze I (lipofilni kamptotecini, homokamptotecini, dibenzonafthiridinoni) (Teicher, 2008).
4. Inhibitori topoizomeraze II (lipofilni antraciklini) (Chhikara i sar., 2012).
5. Jedinjenja čija je aktivnost snažnija u prisustvu P-gp-a (NSC73306: isatin- β tiosemikarbazonski derivat) (Blagosklonny, 2003).

Unazad nekoliko godina je u studijama opisan fenomen koji se naziva „kolateralna setljivost“ (Szakács i sar., 2006; Blagosklonny, 2003), a odnosi se na paradoksalnu senzitivnost MDR ćelija tumora na neke od novih agenasa koji nisu supstrati za P-gp (Hall i sar., 2009). Inhibicija ćelijskog rasta pod dejstvom NSC73306 je u pozitivnoj korelaciji sa nivoom ekspresije P-gp-a (Ludwig i sar., 2006).

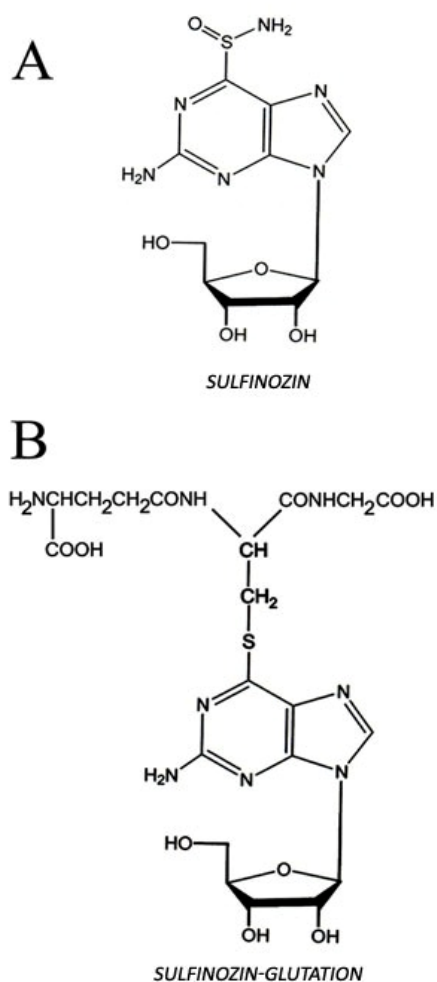
Efekat nekih starijih lekova kao što su purinski nukleozidni i nukleotidni analozi uključuje i reverziju MDR. S obzirom na njihovu poznatu efikasnost i blagu toksičnost, pogodni su za kombinovanje sa drugim hemioterapeuticima. Uticaj na ekspresiju P-gp i posledičnu akumulaciju antitumorskih lekova, kvalifikuje purinske analoge kao korisne agense za reverziju MDR (Dačević i sar., 2013; Pesic i sar., 2010; Pesic i sar., 2009).

Inovativne strategije se kreću u pravcu povratka prirodnim produktima, dizajniranju peptidomimetika i dvostruko aktivnih liganada, koji počinju da se uvode kao četvrta generacija P-gp inhibitora (Palmeira i sar., 2012).

1.6. SULFINOZIN

Sulfinozin ([R,S]-2-amino-9- β -D-ribofuranozilpurine-6-sulfinamid) pripada grupi tiopurinskih analoga. Oksidovani atom sumpora na šestom ugljenikovom atomu ga čini veoma reaktivnim agensom sa velikim antitumorskim potencijalom (Slika 9A). Za hemijsku

sintezu sulfinozina, koja se odvija u dva koraka, kao početni materijal koristi se 6-tioguanozin.



Slika 9. Strukturne formule – sulfinozina (A);
adukt sulfinozina sa glutationom (B) (Pešić i sar., 2009)

Međutim, u odnosu na 6-tioguanozin, sulfinozin pokazuje slabo inhibitorno dejstvo na *de novo* sintezu purina kao i na sintezu RNK i DNK (Fujitaki i sar., 1989). Složenost metabolizma sulfinozina potvrđena je u *in vivo* sistemu gde sulfinozin veoma brzo nakon primene formira adukte sa sulfhidrilnim jedinjenjima: glutationom (GSH) (Slika 9B) i cisteinom (Cys) (Fujitaki i sar., 1989). Pokazano je i da GSH adukt sulfinozina dejstvom γ -glutamil transpeptidaze, a zatim cisteinil glicinaze postaje Cys adukt sulfinozina (Riley i saradnici, 1989) koji dalje može biti pretvoren u 6-tioguanozin (Elfarra i sar., 1988).

Metabolička aktivacija sulfinozina je složenija u odnosu na druge tiopurine. Pretvaranje sulfinozina u odgovarajuće fosforilisane forme odvija se posredstvom različitih purinskih spasonosnih enzima. Dejstvom purin nukleozid fosforilaze (PNP) oslobađa se baza sulfinozina (2-aminopurin-6-sulfinamid) koju sa istim afinitetom u sulfinozin 5'-monofosfat (SMP) pretvaraju ili adenin fosforibozil transferaza (APRT) ili hipoksantin fosforibozil transferaza (HPRT). Pored toga, sulfinozin može direktno postati SMP posredstvom adenozin kinaze. Brojni putevi metaboličke aktivacije smanjuju mogućnost razvoja rezistencije na sulfinozin, dok odstranjivanje jednog enzima odgovornog za metaboličku aktivaciju u eksperimentalnom sistemu dovodi do brzog razvoja rezistencije na ostale tiopurinske analoge.

Sulfinozin bar jednim delom ostvaruje svoje dejstvo posredstvom fosforilisanog metabolita 6-tioguanozina (Fujitaki i sar., 1989).

U *in vivo* eksperimentima je pokazano da se Cys i GSH takmiče za formiranje adukta sa sulfinozinom. Istovremena primena sulfinozina i GSH 16 puta povećava količinu GSH adukta, a za 61% smanjuje količinu Cys adukta. Prilikom primene sulfinozina i Cys, GSH adukt se potpuno eliminiše. U *in vitro* uslovima već 1 h nakon primene sulfinozina dolazi do značajnog smanjenja sadržaja GSH u tumorskim ćelijama i taj efekat se održava narednih 24 h. Međutim, istovremenom primenom sulfinozina i Cys efekat na smanjenje sadržaja GSH izostaje. Pored toga, pokazano je da sulfinozin smanjuje aktivnost GST kod tumorskih, ali ne i kod normalnih ćelija. Lipidna peroksidacija uočena nakon tretmana sulfinozinom u mikrozomima isključivo tumorskih ćelija, može biti posledica oslobađanja slobodnih radikala prilikom konjugacije sulfinozina sa GSH (Crabtree i sar, 1989).

Za sulfinozin je u *in vitro* uslovima dokazano da inhibira funkciju P-gp-a, ekspresiju *mdr1* i da ispoljava sinergistički inhibicioni efekat sa DOX-om, kurkuminom i verapamilom kod NSCLC ćelija (Pešić i sar., 2010; Pešić i sar., 2009; Andjelković i sar., 2008). Efekat koji se postiže pri kombinovanoj primeni sulfinozina sa drugim antitumorskim lekovima ili modulatorima omogućava da se navedeni lekovi primene u nižoj koncentraciji pri kojoj se ispoljavaju blaža neželjena dejstva. Pretpostavlja se da bi sulfinozin zbog svog kompleksnog mehanizma i dokazanog sinergističkog efekta mogao biti koristan za postizanje reverzije rezistencije na klasične hemioterapeutike.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ovog istraživanja je rasvetljavanje mehanizama koji leže u osnovi antitumorskog i senzitivizirajućeg efekta koje sulfinozin ostvaruje kod rezistentnih ćelijskih linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća - NCI-H460/R i glioblastoma - U87-TxR. U tom smislu su postavljeni ciljevi i definisani sledeći zadaci:

1. Uporediti citotoksični efekat sulfinozina kod rezistentnih (NCI-H460/R i U87-TxR) i odgovarajućih senzitivnih tumorskih ćelijskih linija (NCI-H460 i U87), kao i kod normalnih humanih keratinocita (HaCaT)
2. Odrediti tip ćelijske smrti izazvane dejstvom sulfinozina (apoptoza, autofagija, aktivacija efektorskih kaspaza) kod rezistentnih tumorskih ćelijskih linija
3. Ispitati uticaj sulfinozina na glutationski detoksifikacioni sistem (produkcija kiseoničnih reaktivnih vrsta, koncentracija redukovanog glutaciona, ekspresija gama-glutamil-cistein-sintetaze, ekspresija glutation-S-transferaze π) kod rezistentnih tumorskih ćelijskih linija
4. Ispitati efekat sulfinozina na ekspresiju hipoksija indukujućeg faktora (HIF-1 α) i njime regulisane gene *mdr1* i *vegf* kod rezistentnih tumorskih ćelijskih linija
5. Ispitati efekat sulfinozina na ekspresiju membranskog transportera P-glikoproteina kod rezistentnih tumorskih ćelijskih linija
6. Utvrditi potencijal sulfinozina za modulaciju rezistentnog fenotipa ispitivanjem njegovog efekta na akumulaciju supstrata P-glikoproteina - doksorubicina
7. Utvrditi potencijal sulfinozina za modulaciju sekrecije vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) kod rezistentnih tumorskih ćelijskih linija
8. Ispitati senzitivizirajući potencijal sulfinozina u kombinaciji sa klasičnim hemioterapeutcima

3. METODOLOGIJA

3.1. SUPSTANCE

Sulfinozin (SF) je sintetisan iz 6-tioguanozina prema poznatoj proceduri (Revankar i sar., 1990). SF je pre upotrebe čuvan na -20°C. Neposredno pred eksperiment pravljen je svež 1 mM rastvor SF-a u dejonizovanoj vodi.

U eksperimentima su korišćene i sledeće supstance: doksorubicin (DOX, EBEWE Arzneimittel GmbH, Vienna, Austria), R±Verapamil (Dex-VER, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), tarikvidar (TQ) dobijen na poklon od Dr. Sven Rottenberg iz Holandskog Instituta za kancer u Amsterdamu i CoCl₂ (Fisher Scientific, USA).

Pre tretmana pravljeni su sveži rastvori CoCl₂, dok su alikvoti DOX-a odmrzavani sa -20°C. Dex-VER je čuvan na sobnoj temperaturi u koncentraciji od 1 mM. TQ je rastvaran u dimetilsulfoksidu (DMSO) i 10 μM alikvoti su čuvani na -20°C.

3.2. HEMIKALIJE I REAGENSI

- RPMI 1640 medijum, Minimum Essential Medijum (MEM), rastvor penicilin-streptomycin, rastvor antibiotika i antimikotika, L-glutamin i tripsin/EDTA proizvođača PAA, Beč, Austrija.
- Serum fetusa govečeta (FBS), sulfordamin B (SRB) i akridin oranž proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka.
- Matrigel je poklon od Dr. Sanje Mijatović iz Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Propidijum jodid (PI) proizvođača Roche Applied Science, Bazel, Švajcarska.
- Annexin-V-FITC (AV) proizvođača Abcam, Cambridge, Velika Britanija.
- ApoStat - pankaspazni inhibitor proizvođača R&D systems, Mineapolis, SAD.
- FITC konjugovano anti-P-gp antitelo proizvođača BD Biosciences, Velika Britanija.

- Izotipska kontrola IgG2bk proizvođača Abcam, Kembridž, Velika Britanija.
- PE-konjugovano anti-VEGF antitelo proizvođača R&D Systems, Minneapolis, MN SAD.
- IgG2a izotipska kontrola proizvođača Abcam, Cambridge, Velika Britanija.
- Karboksifluorescein sukcinimidil estar (CFSE) i dihidroetidijum proizvođača Molecular ProbesH, Invitrogen, CA, SAD.
- Primarno antitelo za kaspazu 3 i β -aktin proizvođača Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, SAD.
- Primarno antitelo za gama-glutamil-cistein sintetazu (γ GCS) je poklon od prof. dr Bate Koraća iz Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Anti-zečije IgG antitelo proizvođača Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, SAD
- GSH Colorimetric Detection Kit proizvođača BioVision, CA, SAD.
- Quantikine Human VEGF ELISA Kit proizvođača R&D Systems, Minneapolis, SAD.
- Koktel inhibitora proteaze proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka.
- TRIZOL proizvođača Invitrogen Life Technologies, SAD.
- Etidijum bromida proizvođača Merck, Nemačka.
- Agaroza proizvođača MP Global.

3.3. ĆELIJSKE LINIJE

3.3.1. NCI-H460 i NCI-H460/R

Parentalna NCI-H460 humana ćelijska linija je nabavljena od American Type Culture Collection (ATCC, SAD), gde se vodi pod oznakom HTB177. NCI-H460 je ćelijska linija humanog karcinoma pluća dobijena iz pleuralnog fluida pacijenata sa krupnoćelijskim neuroendokrinim karcinomom pluća. Odgovarajuća rezistentna ćelijska linija sa uspostavljenim MDR-fenotipom NCI-H460/R koja stabilno raste u prisustvu 100 nM doksorubicina (DOX), selekcijom je dobijena iz NCI-H460 ćelijske linije (Pesic i sar., 2006). Ova rezistentna ćelijska linija je hipotriploidna sa prosečnim brojem hromozoma 57. Ćelije

su adherentne sa epitelijalnom morfologijom i rastu u monosloju. Karakteriše ih prisustvo *wt* (engl. „wild type“) *p53* gena.

3.3.2. U87 i U87-TxR

Parentalna U87 humana ćelijska linija je nabavljena od American Type Culture Collection (ATCC, SAD). Parentalne ćelijske linije se smatraju senzitivnim obzirom da su dobijene od pacijenata koji nisu podvrgnuti terapiji, a kod kojih je dijagnostikovao primarni tumor (glioblastom). Odgovarajuća rezistentna ćelijska linija sa uspostavljenim MDR fenotipom U87-TxR je dobijena nakon izlaganja U87 ćelija postepeno rastućim koncentracijama paklitaksela (PTX) (100-300 nM) u toku 9 meseci (Podolski-Renić i sar., 2011).

3.3.3. HaCaT

Ćelijska linija normalnih humanih keratinocita – HaCaT je nabavljena od Cell Line Service (CLS, Nemačka). HaCaT ćelije vode poreklo iz kože pacijenta obolelog od malignog melanoma. Do njihove imortalizacije u *in vitro* uslovima došlo je spontano, jer imaju aktivirane telomerase. Iako predstavljaju normalne ćelije zbog neskraćivanja telomera smatraju se transformisanim (Boukamp i sar., 1988).

3.4. ODRŽAVANJE KULTURE ĆELIJA

Sve kulture ćelija su održavane u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan) na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Pasaža ćelija je vršena po postignutoj konfluenciji 80%, a medijum je menjan svakog trećeg dana. Za postavljanje eksperimenata ćelije su uvek korišćene u logaritamskoj eksponencijalnoj fazi rasta.

3.4.1. Održavanje NCI-H460 i NCI-H460/R u ćelijskoj kulturi

NCI-H460 i NCI-H460/R ćelije su kultivisane u RPMI-1640 medijumu (PAA, Austrija) uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma – FBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), 2 mM L-glutamina (PAA, Austrija) i smeše antibiotika streptomicina 10 mg/ml, penicilina

10 000 U/ml i antimikotika amfotericina B 25 µg/ml (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Pasaža ćelija je vršena po dostizanju 80-90% konfluentnosti u flaskovima površine 25 cm² i 75cm² (Nalgene Nunc, Danska) pomoću 0,25% tripsin/EDTA rastvora (PAA, Austrija). Broj ćelija je određivan na invertnom mikroskopu. Ćelije su potom zasejavane u odgovarajućoj gustini u svež medijum za dalje eksperimente ili za dalje umnožavanje i održavanje u kulturi (8 000 ćelija/cm² za NCI-H460 i 16 000 ćelija/cm² za NCI-H460/R liniju).

3.4.2. Održavanje U87 i U87-TxR u ćelijskoj kulturi

U87 i U87-TxR ćelije su kultivisane u MEM medijumu (PAA, Austrija) uz dodatak 10% FBS, 2 mM L-glutamina i smeše antibiotika 5000 U/ml penicilina i 5 mg/ml streptomicina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Pasaža ćelija je vršena dva puta nedeljno po dostizanju 80-90% konfluentnosti u flaskovima površine 25 cm² i 75cm². Nakon postupka tripsinizacije ćelije su brojane na invertnom mikroskopu. Ćelije su potom zasejavane u odgovarajućoj gustini u svež medijum za dalje eksperimente ili za dalje umnožavanje i održavanje u kulturi (16 000 ćelija/cm² za U87 i 32 000 ćelija/cm² za U87-TxR liniju).

3.4.3. Održavanje HaCaT u ćelijskoj kulturi

HaCaT ćelije su gajene u DMEM medijumu uz dodatak 10% FBS, 4 g/l glukoze, 2 mM L-glutamina i smeše antibiotika 5000 U/ml penicilina i 5 mg/ml streptomicina. Pasaža ćelija je vršena jednom nedeljno. Ćelije su za dalje eksperimente ili za dalje umnožavanje i održavanje u kulturi zasejavane u gustini od 64 000 ćelija/cm² u svežem medijumu.

3.4.4. Trodimenzionalna ćelijska kultura u Matrigel-u

Za kultivaciju ćelija u trodimenzionalnoj kulturi ćelije su zasejavane u istom broju kao za dvodimenzionalnu kulturu (monosloj u medijumu). Ćelije su sejane na prethodno rekonstituisanoj želatinoznoj membrani (Matrigel; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) u RPMI 1640 medijumu sa 10% FBS. Ćelije su fotografisane na „Zeiss Axiovert“ mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Oberkochen, Germany).

3.5. EKSPERIMENTALNE VARIJACIJE U TRETMANIMA

3.5.1. Jednokratni tretmani (72h)

Za ispitivanje jednokratnog efekta supstanci (SF, DOX) na inhibiciju ćelijskog rasta, ćelije su zasejavane 24 h pre tretmana. Nakon adaptacije ćelija, tretman supstancama je trajao 72 h. Opseg koncentracija korišćenih u tretmanima je varirao za različite supstance: SF (1-100 μ M), DOX (0,1-10 μ M). Kao kontrola su korišćene istovremeno zasejane odgovarajuće netretirane ćelije.

Za potrebe testova vijabilnosti ćelije su zasejavane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Nunc, Nalgene, Danska) u sledećoj gustini: NCI-H460 – 2 000, NCI-H460/R – 4 000, U87 – 4 000, U87-TxR – 8 000, HaCaT – 16 000 ćelija po bunariću u 200 μ l odgovarajućeg medijuma.

3.5.2. Jednokratni tretman (72h) praćen oporavkom ćelija (72h)

Za ispitivanje odloženog dejstva SF-a, primenjen je jednokratni tretman ćelija (72h) praćen oporavkom ćelija u čistom medijumu (72h). Efekat na ćelijama je ispitivan nakon oporavka. NCI-H460/R i U87-TxR ćelije su zasejavane u gustini od 500, odnosno od 1 000 ćelija po bunariću. Kao kontrola su korišćene istovremeno zasejane netretirane ćelije.

3.5.3. Kombinovani tretmani

Istovremenim i naizmeničnim tretmanom ispitano je kombinovano dejstvo SF-a sa DOX-om. U istovremenom tretmanu, 24 h nakon zasejavanja, ćelije su tretirane različitim koncentracijama SF-a i DOX-a i efekat je meren nakon 72 h. Kao kontrola su korišćene netretirane ćelije i ćelije tretirane samo DOX-om. NCI-H460/R i U87-TxR ćelije su zasejavane u gustini od 2 000, odnosno od 8 000 ćelija po bunariću.

U naizmeničnom tretmanu, ćelije su izlagane dejstvu SF-a tokom 72 h, a potom je medijum promenjen, pa su ćelije tretirane različitim koncentracijama DOX-a naredna 72 h. Kao kontrola su korišćene netretirane ćelije i ćelije tretirane samo DOX-om, ali nakon 72 h rasta u čistom medijumu. NCI-H460/R i U87-TxR ćelije su zasejavane u gustini od 500, odnosno od 1 000 ćelija po bunariću.

3.6. ODREĐIVANJE BROJA ĆELIJA

Bojenjem ćelija tripan plavim (engl. „*trypan blue*“) dobija se uvid u njihovu brojnost i kvalitet, što obezbeđuje da se ćelije u željenom broju dalje umnožavaju ili koriste za potrebe određenog eksperimenta. Određena zapremina u kojoj se nalaze ćelije iz celokupne ćelijske suspenzije se boji tripan plavim (0,4%-ni rastvor u PBS-u; BDSL, Klmarnock, UK). Princip bojenja se zasniva na činjenici da tripan plavo ne prodire u unutrašnjost živih ćelija koje imaju intaktnu ćelijsku membranu, te one ostaju nebojene (pod mikroskopom se vide kao svetle beličaste ćelije). Plava boja prodire u unutrašnjost mrtvih ćelija kod kojih je narušen integritet ćelijske membrane (pod mikroskopom se vide kao tamno plave ćelije). Brojanjem i živih i mrtvih ćelija može se proceniti vijabilitet ćelija u datoj kulturi (broj živih ćelija / ukupan broj svih ćelija x 100%).

Brojanje ćelija je vršeno mikroskopski u Neubauer-ovoj komorici. Ukupan broj živih ćelija je određivan po sledećem obrascu:

$$\frac{\text{ukupan broj ćelija/ml}}{\text{prosečan broj ćelija po kvadratu komorice x razblaženje ćelija x } 10^4},$$

gde je 10^4 faktor komorice.

3.7. ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI ĆELIJA

3.7.1 SRB test vijabilnosti

Sulforodamin B (SRB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) je negativno naelektrisna supstanca sa dve sulfonske grupe kojima se elektrostatički vezuje za bazne ostatke aminokiselina, bojeći ukupne proteine ćelija ružičastom bojom. Test je izveden prema opisanoj proceduri (Skehan i sar., 1990). Ukratko, na kraju perioda predviđenog za tretman ćelija u mikrotitar ploče sa 96 bunarića, dodavano je po 50 μ l 50% trihlor-sirćetne kiseline u svaki bunarić radi fiksacije ćelija. Fiksacija je trajala 1 h na 4°C. Ćelije su potom ispirane četiri puta tekućom vodom. Nakon toga, po 50 μ l 0,4% rastvora SRB boje u 1% sirćetnoj kiselini je dodavano u svaki bunarić i ostavljano 30 min na sobnoj temperaturi.

Višak boje je potom uklanjan ispiranjem 3 puta sa 250 μ l 1% sirćetne kiseline po bunariću. Ploča je zatim sušena na 45°C u termostatu. SRB koji je vezan za proteine je na kraju rastvoren u 10mM TRIS-u (200 μ l po bunariću). Na kraju testa apsorbancu je određivana na ELISA čitaču (LKB 5060-006 Micro Plate Reader, Austria), na talasnoj dužini 540 nm sa korekcijom na 670 nm.

3.8. PROTOČNA CITOMETRIJA - FACS analiza ćelija

Protočna citometrija omogućava precizno ispitivanje različitih karakteristika kod ćelija koje su razdvojene jedna od druge i rastvorene u puferskom sistemu (npr. PBS-u). Ćelije obojene određenom fluorescentnom bojom osvetljava laser svetlošću odgovarajuće talasne dužine, što dovodi do emitovanja svetlosti od strane ćelije tj. fluoresciranja. Nakon prolaska pored lasera, signali sa svake ćelije se transformišu u „električne događaje“ koji se pomoću softvera očitavaju kao veličina i granularnost ćelije i intenzitet fluorescence. Za analiziranje uzoraka korišćen je FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Analizirano je po 10 000 ćelija u svakom uzorku, i tako dobijeni podaci su statistički obrađivani u programu BD Cell Quest Pro.

Metodom protočne citometrije praćena je: ćelijska proliferacija, tip ćelijske smrti (apoptoza/nekroza), aktivacija kaspaza, prisustvo kiselih citoplazmatskih vezikula, produkcija slobodnih kiseoničnih radikala, akumulacija DOX-a i Rho123, kao i ekspresija P-gp-a i VEGF-a.

Ćelije su zasejavane u ploče sa 6 bunarića i to 80 000 NCI-H460 ili NCI-H460/R ćelija, odnosno 160 000 U87 ili U87-TxR ćelija po bunariću za jednokratni tretman, a 25 000 NCI-H460 ili NCI-H460/R ćelija, odnosno 50 000 U87 ili U87-TxR ćelija za jednokratni tretman praćen oporavkom.

3.8.1. CFSE bojenje - analiza ćelijske proliferacije

Proliferacija ćelija je ispitivana primenom karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estera (CFSE). Nakon inkorporacije u ćeliju, CFSE ima stabilnu fluorescencu tokom 15 ćelijskih deoba, ali posle svake deobe intenzitet fluorescence se smanjuje. Intenzitet CFSE

fluorescence po ćeliji je obrnuto srazmeran broju ćelijskih deoba. Za potrebe eksperimenata u kojima je ispitivana ćelijska proliferacija, 5×10^6 ćelija/ml su izlagane dejstvu 1 mM CFSE, 10 min na 37°C u mraku. Zatim su ćelije dva puta ispirane u svežem medijumu, i zasejavane u ploče sa 6 bunarića u gustini od 5×10^4 ćelija po bunariću. Za ispitivanje efekta SF-a na ćelijsku proliferaciju, ćelije su neposredno nakon preuzimanja CFSE tretirane sa 10 μ M SF-a. Po isteku 72 h, netretirane (kontrolne) i tretirane ćelije su tripsinizirane i ispirane dva puta u PBS-u. Za analizu rezultata, ćelije su resuspendovane u 500 μ l PBS-a i analizirane na protočnom citometru očitavanjem zelene fluorescence na kanalu FL-1.

3.8.2. Aneksin V-propidijum jodid - analiza ćelijske smrti

Za analizu ćelijske smrti korišćeno je dvostruko obeležavanje ćelija, aneksinom-V (AV) konjugovanim fluorescein izotiocijanatom (FITC), koji fluorescira u zelenom spektru i propidijum jodidom (PI), koji fluorescira u crvenom spektru. Ova metoda se zasniva na detekciji fosfatidil serina koji tokom apoptoze prelazi u spoljašnji sloj ćelijske membrane. AV se velikim afinitetom vezuje za fosfatidil serin, pa ćelije koje su u apoptozi fluoresciraju zeleno. PI se umeće u molekule nukleinskih kiselina, ali ne prolazi kroz intaktnu ćelijsku membranu. Na taj način, samo ćelije sa oštećenim integritetom ćelijske membrane fluoresciraju crveno. Ovom metodom moguće je razlikovati 4 populacije ćelija: AV-/PI- (žive ćelije), AV+/PI- (ćelije u ranoj apoptozi), AV+/PI+ (ćelije u kasnoj apoptozi) i AV-/PI+ (nekrotične ćelije).

Nakon tretmana SF-om i postupka tripsinizacije, kontrolne netretirane i tretirane ćelije su sakupljene centrifugiranjem. Ćelijski talog (pelet) je resuspendovan u 100 μ l pufera za vezivanje aneksina (engl. „*annexin binding buffer*“ - ABB) sastava: 10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ (pH 7.4), u koji je dodato 0.2 μ l AV i 1 μ l PI (prema preporuci proizvođača „Abcam“). Po završenoj inkubaciji (30 min na 37°C u mraku), u svaki uzorak je dodavano po 400 μ l aneksin vezujućeg pufera i analiza AV/PI bojenja je vršena u toku narednih sat vremena na protočnom citometru. Intenzitet zelene fluorescence je očitavan na FL1-H, a crvene na FL2-H kanalu.

3.8.3. ApoStat – analiza pan-kaspazne aktivnosti

Kaspaze su serin proteaze koje učestvuju u inicijaciji (kaspaze 8 i 9) i egzekuciji procesa apoptoze (kaspaza 3). Za utvrđivanje aktivacije kaspaza, korišćen je ApoStat (pankaspazni inhibitor) konjugovan FITC-om. ApoStat prodire kroz ćelijsku membranu i ireverzibilno se vezuje za aktivirane kaspaze. Višak nevezanog reagensa se uklanja ispiranjem.

Nakon tretmana SF-om, ćelije su tripsinizirane, pa inkubirane ApoStat-om u odnosu na zapreminu medijuma 1:100, 30 min na 37°C. Po završetku inkubacije sa ApoStat-om, ćelije su ispirane i resuspendovane u PBS-u, a zatim analizirane na protočnom citometru. Povećanje intenziteta fluorescence u tretmanu u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije) praćeno je na kanalu FL-1.

3.8.4. Akridin-oranž (AO) bojenje – analiza autofagije

Kisele citoplazmatske vezikule (aktivni lizozomi) su jedan od markera procesa autofagije. Njihova detekcija se vrši pomoću fluorescentne boje - akridin oranž (AO). U prisustvu kiselog sadržaja AO emituje narandžasto-crvenu fluorescencu, dok citoplazma emituje zelenu fluorescencu. Pri povećanoj aktivnosti lizozoma koja se javlja u toku autofagije, povećava se i intenzitet narandžasto-crvene fluorescence koju emituje AO što se može kvantifikovati protočnom citometrijom. Step en autofagije se određuje kao odnos narandžasto-crvene fluorescence registrovane na kanalu FL-3, i zelene fluorescence registrovane na kanalu FL-1. Na protočnom citometru prati se promena odnosa FL-3/FL-1, koja je proporcionalna porastu broja vezikula sa kiselim sadržajem. Povećanje odnosa FL3/FL1 u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije u kojima je odnos FL3/FL1 podešen na 1) ukazuje na povećanje autofagije u odnosu na kontrolni uzorak.

Nakon tretmana SF-om, ćelije su tripsinizirane, taložene centrifugiranjem i resuspendovane u medijumu sa AO u zapreminskom odnosu 1:100. Nakon inkubacije 15 min na 37°C u mraku, ćelije su centrifugirane, ispirane 2 puta, resuspendovane u PBS-u i analizirane na protočnom citometru.

3.8.5. DHE bojenje - analiza slobodnih radikala

Dihidroksietidijum (DHE) se koristi za detektovanje produkcije reaktivnih oblika kiseonika u ćelijama. Crvena fluorescencija DHE je indikator produkcije superoksidnog anjona. Nakon tretmana SF-om i postupka tripsinizacije, ćelije su inkubirane u PBS-u sa 10% FBS i 10 μ M DHE 45 min. DHE fluorescencija je analizirana na kanalu FL-2. Povećanje intenziteta fluorescencije u tretmanu u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije) ukazuje na prisustvo slobodnih kiseoničnih radikala.

3.8.6. Akumulacija DOX-a

Akumulacija DOX-a u ćelijama je ispitivana na osnovu sposobnosti molekula DOX-a da emituje crvenu fluorescenciju. Očitavanje je vršeno na kanalu FL-2, a intezitet merene fluorescencije je bio upravo proporcionalan akumulaciji DOX-a u ćelijama (James i sar., 1990).

Za ispitivanje akumulacije DOX-a, jednokratni tretman SF-om je trajao 24 h, 48 h i 72h. Nakon postupka tripsinizacije, ćelije su resuspendovane u medijumu sa 20 μ M DOX-a. Uzorci su inkubirani na 37°C 120 minuta. Po završetku inkubacije ćelije su oborene centrifugiranjem, ispirane PBS-om i resuspendovane u hladnom PBS-u. Kao pozitivna kontrola korišćene su ćelije tretirane poznatim inhibitorima P-gp aktivnosti (Dex-VER i TQ).

3.8.7. Analiza ekspresije proteina (P-gp i VEGF)

NCI-H460/R i U87-TxR ćelije su tripsinizirane, ispirane u hladnom PBS-u i 200 000 ćelija je direktno bojeno FITC-konjugovanim P-gp antitelom u zapreminskom odnosu prema PBS-u 1:10, 30 min na ledu u mraku. Izotipska kontrola IgG2b κ je korišćena kako bi se diskriminisala nespecifična fluorescencija.

Za analizu ekspresije VEGF-a, ćelije su fiksirane u 4% paraformaldehidu 10 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su ispirane hladnim PBS-om i resuspendovane u 0,05% saponinskom puferu. Nakon ispiranja u 0,05% saponinskom puferu, 200 000 ćelija je inkubirano sa PE-konjugovanim anti-VEGF antitelom u zapreminskom odnosu 1:20, 30 min u mraku. Ćelije su zatim ispirane saponinskim puferom i resuspendovane u PBS-u. Izotipska kontrola IgG2a je korišćena kako bi se diskriminisala nespecifična fluorescencija.

Uzorci su čuvani na ledu u mraku do očitavanja na protočnom citometru. Fluorescenca FITC-konjugovanog anti-P-gp-a je određena na FL-1 kanalu na talasnoj dužini 530 nm, dok je fluorescenca PE-konjugovanog anti-VEGF-a očitavana na FL-2 kanalu na talasnoj dužini 585 nm.

3.9. KOLORIMETRIJSKA DETEKCIJA GLUTATIONA (GSH)

Koncentracija redukovanog GSH u ćelijama je određivana korišćenjem APOGSH™ Glutathione Colorimetric Detection paketa (GSH Colorimetric Detection Kit, Bio-Vision, USA). Esej se zasniva na reakciji DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina) sa GSH pri čemu se stvaraju 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina i oksidovani glutation (GSSG). 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina je produkt žute boje srazmeran koncentraciji GSH u ćeliji. 5-sulfosalicilna kiselina (SSA) uklanja proteine iz uzorka i štiti GSH od oksidovanja i delovanja γ -glutamil transpeptidaze. Određivanje koncentracije GSH je izvedeno prema proceduri modifikovanoj u odnosu na preporučenu od proizvođača:

1) Priprema standarda i uzoraka – Ćelije su kultivisane i tretirane u flaskovima površine 25 cm². Nakon tripsinizacije, ista zapremina netretiranih i tretiranih ćelija je preneti u ependorfice. Zatim su ćelije centrifugirane 5 min na 700 x g pri temperaturi od 4°C. Nakon odlivanja supernatanta ćelijski talog je resuspendovan u 0,5 ml hladnog PBS-a i uzorci su ponovo centrifugirani 5 min na 700 x g pri temperaturi od 4°C. Talog ćelija je liziran dodavanjem 80 μ l hladnog glutationskog pufera 10 min na ledu. Jedan deo lizata je korišćen za spektrofotometrijsko merenje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima. Zatim je u svaki uzorak dodato po 20 μ l 5% SSA. Uzorci su dobro promešani i centrifugirani 10 min na 8 000 x g pri temperaturi od 4°C. Izdvojen supernatant je prenošen u nove tubice. Razblaženja uzoraka su po potrebi pravljena sa 1% SSA. Koncentracije standarda, u rasponu od 0-100 ng, dobijene su od koncentrovanog standarda (1 μ g/ μ l) rastvorenog u 1% SSA.

2) Određivanje koncentracije GSH - Glutationski pufer (160 μ l) je sipan u svaki bunarić mikrotitar ploče sa 96 bunarića i inkubran 10 min na sobnoj temperaturi. Zatim je glutationskom puferu dodavano po 20 μ l standarda ili uzorka. Finalno, žuta boja je razvijana pažljivim mešanjem uzorka sa 20 μ l rastvora supstrata. Apsorbanca je očitavana

na talasnoj dužini 405 nm na ELISA čitaču (LKB 5060–006 Micro Plate Reader, Vienna, Austria). Koncentracija GSH je određivana na osnovu kalibracione standardne krive formirane u softverskom programu GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., SAD) i kvantifikovana u odnosu na koncentraciju proteina u ćelijskom lizatu.

3.10. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VEGF-a U SUPERNATANTU ĆELIJSKE KULTURE

Mikrotitar ploče sa 96 bunarića obložene monoklonskim antitelom specifičnim za VEGF su korišćene za određivanje koncentracije VEGF-a u supernatantu ćelijske kulture.

1) Priprema standarda i uzoraka – Prema uputstvu proizvođača, rekombinovani humani VEGF je rekonstituisan u 1 ml kalibracionog rastvora RD5K. Na taj način je dobijen VEGF standard koncentracije 2 000 pg/ml. Nakon 15 min, od početnog rastvora je pravljen serija razblaženja: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 i 15,6 pg/ml. Sam kalibracioni rastvor RD5K je korišćen kao nulti standard 0 pg/ml.

MDR ćelijske linije, NCI-H460/R i U87-TxR, su zasejavane u ploče sa 6 bunarića, i nakon 24 h su tretirane SF-om. Supernatant (ćelijski medijum) iz koga se određivao sekretovani VEGF je uzorkovan nakon 24 h, 48 h i 72 h. Nakon odgovarajućeg perioda inkubacije ćelija, medijum iz ćelijske kulture je centrifugiran 10 min na 2 500 rpm. Na taj način je dobijen supernatant u kojem je merena koncentracija sekretovanog VEGF-a. Supernatant koji nije korišćen neposredno, čuvan je na -80°C.

2) Određivanje koncentracije VEGF-a – U bunariće se neposredno pre dodavanja 200 µl standarda ili uzorka, sipa po 50 µl RD1W rastvora. Mikrotitar ploče sa uzorcima i standardima su pokrivane adhezivnom trakom i inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi. Zatim je 3 puta vršeno ispiranje komercijalnim puferom uz potpuno uklanjanje tečnosti iz bunarića. Nakon dodavanja po 200 µl konjugata HRP/Anti-VEGF po bunariću, ploče su pokrivene novom adhezivnom trakom i inkubirane naredna 2 h na sobnoj temperaturi. Bunarići su ponovo ispirani puferom 3 puta i u njih je dodavano po 200 µl rastvora supstrata (H₂O₂:TMB, u zapreminskom odnosu 1:1), 20 min na sobnoj temperaturi. Zatim je dodavano po 50 µl 25 mM H₂SO₄ po bunariću za razvijanje boje. Apsorbanca je određivana na ELISA čitaču na talasnoj dužini 450 nm. Standardna kriva sa koje su

određene koncentracije VEGF-a formirana je u softverskom programu GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., SAD).

3.11. WESTERN BLOT

Za pripremu uzoraka za imunoblot metodu ćelije su zasejavane u Petri šolje prečnika 100 mm (Sarstedt, Numbrecht, Germany), 400 000 ćelija po šolji za NCI-H460/R ćelije, ili 750 000 ćelija po šolji za U87-TxR ćelije. Ćelije su lizirane u toku 30 minuta u puferu za liziranje ćelija (30mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF i 10 μ L proteaza inhibitornog koktela) (Sigma-Aldrich) na ledu, nakon čega su centrifugirane 15 minuta na 14 000 x g na 4°C. Na ovaj način proteini su izdvojeni u supernatantima i dalje analizirani.

Ukupna količina proteina u svakom uzorku izmerena je metodom po Bradfordu. Metoda se zasniva na principu da boja engl. „*Coomassie Brilliant Blue*“ u reakciji sa proteinima prelazi u anjonski oblik, što se manifestuje kao promena od smeđe-crvene u plavu boju. Koncentracija proteina je proporcionalna intenzitetu plave boje čija je apsorbanca očitavana na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Sunrise; Tecan, Dorset, UK) na talasnoj dužini od 570 nm. Koncentracije proteina u uzorcima su određene na osnovu standardne krive, koja je konstruisana na osnovu apsorbaneci standardnih rastvora. Standardni rastvori su formirani rastvaranjem albumina iz seruma govečeta (eng. „*bovine serum albumin*“ - BSA) u *Coomassie Brilliant Blue* boji, krajnje koncentracije: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 i 15 mg/mL.

Jednake količine proteina iz svakog uzorka su nanete na poliakrilamidni gel i razdvojene elektroforezom u prisustvu natrijum dodecil sulfata (engl. „*sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*“ - SDS-PAGE). Razdvojeni proteini su sa poliakrilamidnog gela u toku 1,5 sata prebačeni na nitroceluloznu membranu (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Membrane su inkubirane preko noći na 4°C sa primarnim zečjim antitelima na kaspazu-3 (1:500, AnaSpec, Fremont, CA, USA), gama glutamilcistein sintetazom (1:1000, proizvođač) i β - aktinom (1:5000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Nakon 1,5 h inkubacije na sobnoj temperaturi sa HRP obeleženim anti-zečjim IgG antitelima (1:2000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) trake izdvojenih proteina su

vizuelizovane pomoću hemiluminiscentnog reagensa (engl. „*enhanced chemiluminescence*“ - ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) na rendgenskom filmu (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK). Nivoi ekspresije kaspaze 3 su kvantifikovani uz pomoć ImageJ računarskog programa, i izraženi u odnosu na količinu aktina.

3.12. ANALIZA EKSPRESIJE GENA RT-PCR METODOM

3.12.1. Izolacija i kvantifikacija RNK

Ukupna RNK iz ćelija je izolovana TRIZOL reagensom prema proceduri proizvođača:

1) Liziranje i homogenizacija – NCI-H460/R i U87-TxR ćelije su kultivisane u mikrotitar pločama sa 6 ležišta i tretirane sa 10 μ M SF-a tokom 24 h, 48 h i 72 h. Efekat je upoređen u odnosu na netretirane kontrolne ćelije. Nakon završenog tretmana, ćelije su tripsinizirane i centrifugirane 5 min na 1 800 rpm. Po odlivanju supernatanta, ćelije su resuspendovane u PBS-u sa 0,1% DEPC (dietilpirokarbonat) nakon čega su ponovo centrifugirane 5 min na 1 800 rpm. Supernatant je odlivan, pa su ćelije lizirane 5 min sa 250 μ l TRIZOL-a. Ovako lizirani i homogenizovani uzorci čuvani su na -70°C najviše mesec dana.

2) Razdvajanje faza – Homogenizovani uzorci su otapani na sobnoj temperaturi, da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali. U svaki uzorak je zatim je dodavano 50 μ l hloroforma. Pošto se snažno protresu, uzorci se inkubiraju na sobnoj temperaturi još 2-3 min. Zatim sledi centrifugiranje 15 min na 12 000 x g pri temperaturi od 4°C . Na taj način smeša je razdvajana na tri faze, donju crvenu fenol-hloroformsku, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalazi RNK. Vodenu fazu čini 60% zapremine TRIZOL-a korišćenog za liziranje.

3) Precipitacija RNK – 150 μ l vodene faze se pažljivo prenosi u nove tubice, i dodaje po 125 μ l izopropanola. Uzorci se zatim inkubiraju 10 min na sobnoj temperaturi, pa centrifugiraju 10 min na 12 000 x g pri temperaturi od 4°C . Na taj način RNK precipitira formirajući beličasti talog na dnu tubica.

4) Ispiranje RNK – Supernatant se uklanja i talog RNK se ispira sa 250 µl 75% rastvora etanola u 0,1% DEPC vodi. Uzorci se centrifugiraju 5 min na 7,500 x g pri 4°C.

5) Rastvaranje RNK – Nakon centrifugiranja uzoraka, etanol je odlivan i talog je sušen na sobnoj temperaturi. RNK je rastvarana u 30 µl 0,1% DEPC vode. Koncentracija RNK je merena spektrofotometrijski (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka)

3.12.2. Provera kvaliteta RNK

Kvalitet RNK je ispitivan elektroforezom uzoraka na 1,3% agaroznom gelu (1,3 g agaroze u 100 ml 1 x TBE pufera) sa 0,4 µg/ml etidijum bromida. Uzorak RNK je pre nanošenja na gel mešan sa 0,4% rastvorom bromfenol plavo u 50% glicerolu u zapreminskom odnosu 1:1.

Nakon elektroforeze u 1 x TBE puferu pri 100 V, RNK je vizualizovana na „Gel-Doc“ sistemu (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Kvalitet izolovane RNK je utvrđivan upoređivanjem odnosa inteziteta 28S i 18S traka.

3.12.3. Reakcija reverzne transkripcije

Reverzna transkripcija (RT) je reakcija u kojoj se na osnovu molekula RNK kao matrice sintetiše njoj komplementarni lanac DNK (kDNK). Za reakciju sinteze kDNK potrebni su: reverzna transkriptaza (RNK zavisna DNK polimeraza), deoksiribonukleotidi, inhibitor enzima RNKaze (RNazin) i prajmer za početak sinteze molekula kDNK. Kao prajmeri mogu poslužiti nasumični heksameri, 3' prajmeri ili oligodT-niz od 12-18 dTTP nukleotida.

Ukupna RNK (5µg) dopunjena sa 0,1% DEPC vodom do 25,25 µl je pripremana za RT reakciju 65°C, 10 min. RT miks (0,65 µM oligo-dT₁₆, 1 x pufer, 50 µM dATP, 50 µM dTTP, 50 µM dGTP, 50 µM dCTP, 10 mM DTT, 0,4 UI/µl RNazin i 4 UI/µl M-MLV reverzna transkriptaza) je zatim dodavan ohlađenim uzorcima RNK, 4°C, 2 min do finalne zapremine 50 µl. Reakcija je trajala 1 sat na 42°C, a zaustavljena je zagrevanjem uzoraka 5 min na 95°C. Uzorci su ohlađeni i dobijena kDNK (100 ng/µl) je čuvana na -20°C.

3.12.4. PCR reakcija

Osnovni princip PCR reakcije se zasniva na seriji lančanih reakcija, koje katalizuje DNK zavisna DNK polimeraza („Taq“ polimeraza). Na taj način se umnožava ciljna sevanca na DNK matrici (kod RT-PCR-a to je kDNK). Za ovu reakciju su potrebni DNK, prajmeri (kratki oligonukleotidi komplementarni matrici), dezoksiribonukleotidi, pufer i enzim koji katalizuje ugradnju nukleotida u novi lanac DNK.

Proces amplifikacije se izvodi u seriji cikličnih izmena temperatura čime se obezbeđuje denaturacija molekula DNK, hibridizacija amplimera sa matricom i elongacija umnožaka. Za uspešno umnožavanje svake ciljne sekvence moraju se optimizovati uslovi kao što su temperatura hibridizacije prajmera (engl. „*annealing*“), koncentracija Mg²⁺ jona, koncentracija prajmera, koncentracija kDNK i ukupni broj ciklusa amplifikacije.

Semikvantitativnom RT-PCR analizom se istovremeno amplifikacijom određuje nivo ekspresije gena od interesa u odnosu na nivo ekspresije nekog kontrolnog gena. Kontrolni gen (endogena i interna kontrola) predstavlja konstitutivno eksprimirani gen sa stabilnom ekspresijom nezavisno od tkivnog porekla, sredinskih faktora i stanja u kojem se ćelija nalazi. PCR reakcija je korišćena za detekciju za *gst-π*, *vegf*, *mdr1* i *hif-1α* iRNK (O’Driscoll i sar., 1993; Harada i sar., 1999; Bosch i sar., 1997; Nardinocchi i sar., 2009). Glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaza (*gapdh*) i *β-aktin* (Wong i sar., 1994) su kao interne kontrole koamplifikovani sa svakim ciljnim iRNK tj. kDNK. *Gapdh* je korišćen za normalizaciju ekspresije *mdr1* i *hif-1α*, dok je *β-aktin* korišćen za normalizaciju ekspresije *gst-π* i *vegf* (Wong i sar., 1994; Ponte i sar., 1984). PCR reakcije su izvođene na GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD) pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 95°C 5 min, zatim 24 ciklusa za *hif-1α*, 25 ciklusa za *mdr1*, 28 ciklusa za *gst-p* na 95°C 15 s, na 56°C 30 s, na 72°C 30 s i na 4°C neograničeno dugo. Amplifikacija *vegf* se odvijala 35 ciklusa na 62°C. Da bi se postigla linearna amplifikacija odnos amplimera *gapdh:mdr1* je bio 1:4, *gapdh:hif-1α* 1:6, *β-aktin:gst-p* 1:2, *β-aktin:vegf* 1:5. 100 ng kDNK je upotrebljeno za amplifikaciju svih iRNK, osim *vegf*, gde se u PCR reakciju ulazilo sa 150 ng kDNK. U svim reakcijama koncentracija MgCl₂ je finalno iznosila 2 mM, a finalna koncentracija svakog dNTP 0,2 mM. Provera PCR reakcija je vršena višestrukim ponavljanjem amplifikacije uzoraka poreklom iz dve nezavisne RT reakcije.

3.12.5. Analiza PCR produkta

PCR produkti su analizirani na 2% agaroznom gelu. Na gelu je analiziran ceo reakcioni volumen od 25 μ l sa dodatkom 5 μ l 0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu. Nakon elektroforeze u 1 x TBE puferu produkti su vizualizovani na „Gel-Doc“ sistemu (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Densitometrijska analiza i kvantifikacija dobijenog signala je vršena na „Multi-Analyst/PC Software Image Analysis System“ (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Dobijene vrednosti signala za određeni gen u svakom uzorku su izražene relativno u odnosu na vrednost signala interne kontrole. Tako dobijene relativne ekspresije su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

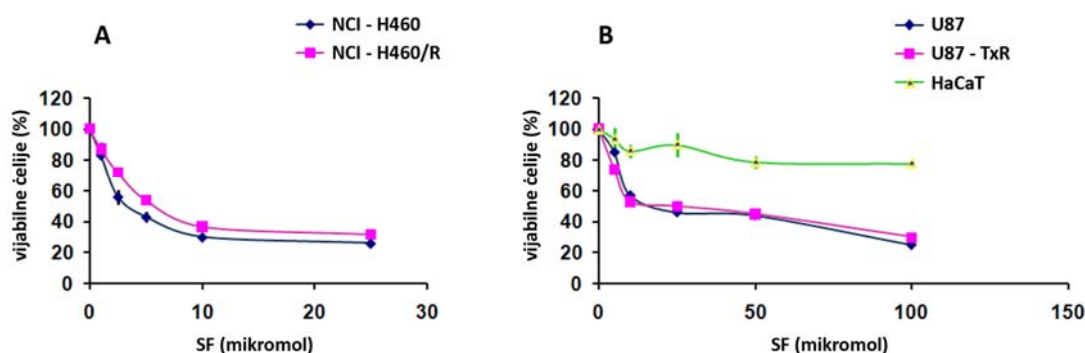
3.13. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati dobijeni u eksperimentima su analizirani u programu STATISTICA 6.0. Na grupama podataka sa normalnom raspodelom, primenjena je analiza varijanse („one-way“ ANOVA). Nakon uočene statističke značajnosti tretmana, primenjen je Tukey honest (HSD) test. Za uzorke koji nisu pokazivali normalnu raspodelu rezultati su statistički obrađeni Studentovim t-testom za više nezavisnih malih uzoraka. Statistička značajnost je izražena kao: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***). Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost (SV) \pm standardna devijacija (SD).

4. REZULTATI

4.1. EFEKAT SF-a NA VIJABILITET TUMORSKIH I NORMALNIH ĆELIJA

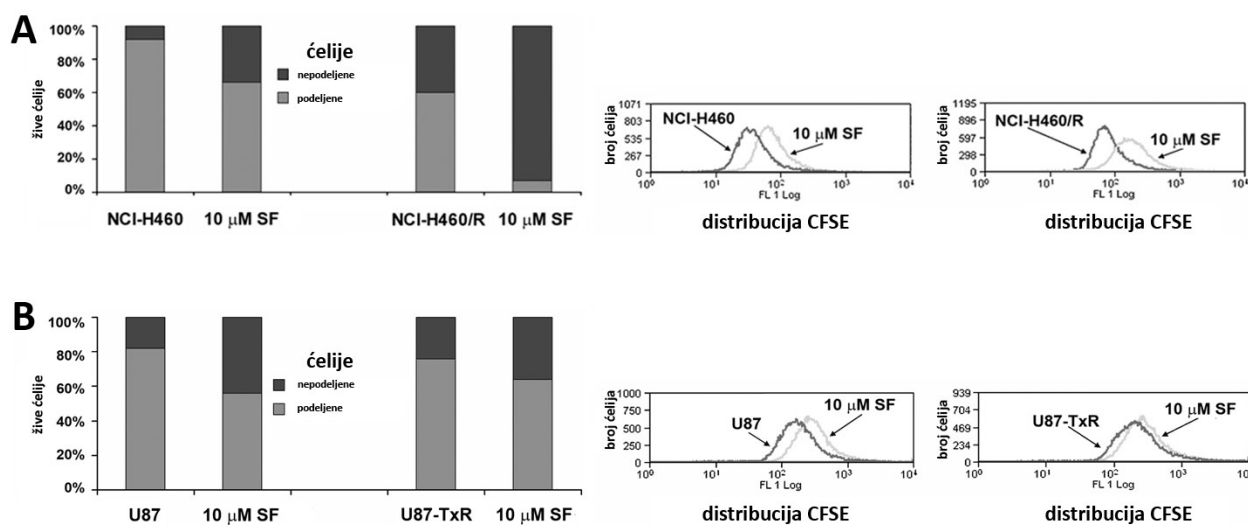
Efekat SF-a na vijabilitet tumorskih ćelija sa MDR fenotipom, NCI-H460/R i U87-TxR, je ispitivan primenom SRB testa. Senzitivne ćelijske linije NCI-H460 i U87 kao i odgovarajuće rezistentne linije NCI-H460/R i U87-TxR su zasejavane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića i tretirane 72 h rastućim koncentracijama SF-a: za NSCLC ćelijske linije 1,25; 2,5; 5; 10 i 25 μM , a za U87 glioblastome 5; 10; 25; 50 i 100 μM . Istovremeno smo ispitali efekat SF-a na normalnu humanu ćelijsku liniju - HaCaT, koja je tretirana istim koncentracijama kao ćelijske linije glioblastoma. Rezultati pokazuju da SF dozno zavisno smanjuje vijabilitet kako senzitivnih ćelijskih linija (NCI-H460 i U87) tako i odgovarajućih rezistentnih linija (Slika 10A, B). IC_{50} za NSCLC ćelijske linije iznosi 4 μM za NCI-H460 i 6 μM za NCI-H460/R (Slika 10A), dok je vrednost IC_{50} za obe ćelijske linije glioblastoma ista i iznosi 20 μM (Slika 10B). Kod normalnih humanih keratinocita (HaCaT ćelije) SF ne dovodi do značajnog smanjenja broja ćelija u odnosu na kontrolu čak i pod dejstvom najveće koncentracije od 100 μM (Slika 10B).



Slika 10. Efekat SF-a na vijabilitet senzitivnih i rezistentnih tumorskih ćelija NSCLC – NCI-H460 i NCI-H460/R (A), glioblastoma U87 i U87-TxR, kao i normalnih humanih keratinocita HaCaT (B). Ćelije su tretirane 72 h odgovarajućim rastućim koncentracijama SF-a. Rezultati su izraženi pomoću srednje vrednosti i standardne devijacije ($X \pm SD$), koje su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata ($n=5$).

4.2. ANTIPROLIFERATIVNO DEJSTVO SF-a KOD TUMORSKIH ĆELIJA

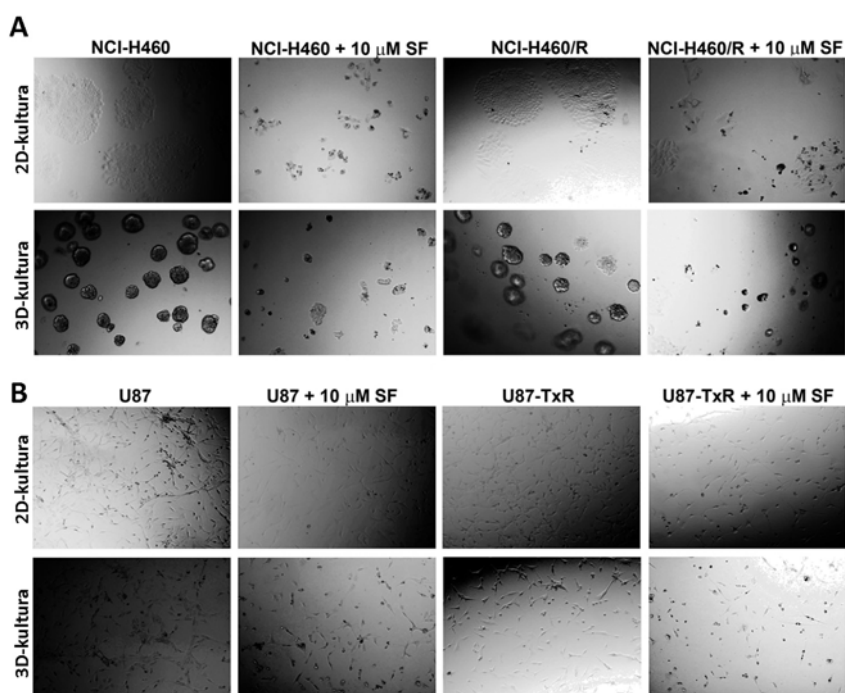
Efekat SF-a je pokazan i primenom CFSE boje, čija fluorescencija opada tokom deobe ćelija pa tako ukazuje na stepen proliferacije. Senzitivne i rezistentne ćelije prethodno inkubirane sa CFSE bojom su zasejavane u mikrotitar ploče sa 6 bunarića i tretirane SF-om 72 h. Kod senzitivnih NCI-H460 netretiranih ćelija (kontrola) populaciju nepodeljenih ćelija čini 10 %, a nakon tretmana SF-om taj procenat raste na 37 %. Kod netretiranih NCI-H460/R ćelija (kontrola) populaciju nepodeljenih ćelija čini 40 % i ovaj procenat se značajno povećava pod dejstvom SF-a na 95 % (Slika 11A). SF pri istoj koncentraciji kod ćelija glioblastoma (U87) ispoljava nešto slabiji efekat. Kod netretiranih U87 (kontrola), populaciju nepodeljenih ćelija čini 18 %, a kod netretiranih U87-TxR (kontrola), 25 %. Nakon tretmana ovaj procenat raste, pa kod U87 iznosi 45 %, a kod U87-TxR 37 % od ukupnog broja ćelija (Slika 11B).



Slika 11. Antiproliferativni efekat SF-a na NSCLC ćelije (A) i ćelije glioblastoma (B) nakon 72 h inkubacije. Desno su prikazani reprezentativni histogrami distribucije CFSE u netretiranim i tretiranim uzorcima, koji pokazuju efekat SF-a na zadržavanje CFSE boje u nepodeljenim ćelijama. Rezultat je očitao na protočnom citometru.

4.2.1. SF tretman u dodimenzionalnoj i trodimenzionalnoj kulturi

Efekat SF-a na rast ćelija u matrigel-u, odnosno u trodimenzionalnoj kulturi je takođe ispitan i upoređen u odnosu na efekat kod ćelija gajenih na plastici tj. u dvodimenzionalnoj kulturi (Slika 12). Rezultati u 3D kulturi pokazuju da dejstvo SF-a dovodi do gubitka kontakta među ćelijama, što je naročito izraženo kod glioblastoma (Slika 12B).



Slika 12. Fazno-kontrastna mikroskopija NSCLC (A) i glioblastoma (B) u dvodimenzionalnoj i trodimenzionalnoj kulturi. Prikazane su mikrografije netretiranih ćelija NCI-H460, NCI-H460/R (A), U87 i U87-TxR (B) i ćelija izloženih dejstvu 10 μM SF-a 72 h.

4.3. SF IZAZIVA APOPTOZU ZAVISNU OD KASPAZA U MDR ĆELIJSKIM LINIJAMA (NCI-H460/R I U87-TxR)

Da indukcija apoptoze doprinosi antitumorskom efektu SF-a kod MDR ćelijskih linija, pokazali smo dvostrukim bojenjem aneksin/propidijum jodidom. Ćelije NCI-H460/R i

U87-TxR su zasejavane u mikrotitar ploče sa 6 bunarića u odgovarajućoj gustini tako da kontrole (netretirane ćelije) na kraju inkubacionog perioda od 72 h i 144 h (tretman praćen oporavkom) ne postignu konfluenciju. Ćelije su tretirane SF-om u koncentraciji od 5 μ M. Po završetku tretmana i oporavka, ćelije su bojene fluorescentno obeleženim aneksinom (AV) i propidijum jodidom (PI), a očitani rezultati su prikazani na tabeli 3.

Rezultati su potvrdili da SF nakon 72 h dovodi do statistički značajnog povećanja broja ćelija u apoptozi (AV+/PI-) u obe MDR ćelijske linije u odnosu na netretiranu kontrolu ($p < 0,01$) (Tabela 3). Međutim, citotoksičan efekat SF-a postaje izraženiji nakon oporavka, jer smo uočili statistički značajno povećanje broja ćelija u kasnoj apoptozi (AV+/PI+) kod U87-TxR ćelija i nekrozi (AV-/PI+) kod obe ispitivane ćelijske linije, što ukazuje na ireverzibilno dejstvo SF-a.

Tabela 3. SF dovodi do indukcije apoptoze kod MDR ćelijskih linija

	Rana apoptoza (%) AV+/PI-	Apoptoza i nekroza (%) AV+/PI+	Mrtve ćelije (%) AV-/PI+
NCI-H460/R			
kontrola	3,80 ^a → 1,15 ^b	1,60 → 0,12	0,91 → 5,94
5 μ M SF	20,14** → 28,72**	22,41** → 23,50**	1,91 → 26,04**
U87-TxR			
kontrola	1,43 → 4,47	0,12 → 0,71	4,09 → 1,33
5 μ M SF	21,28** → 16,94**	1,36 → 8,99*	3,41 → 10,85*

^aEfekat SF-a analiziran nakon 72 h.

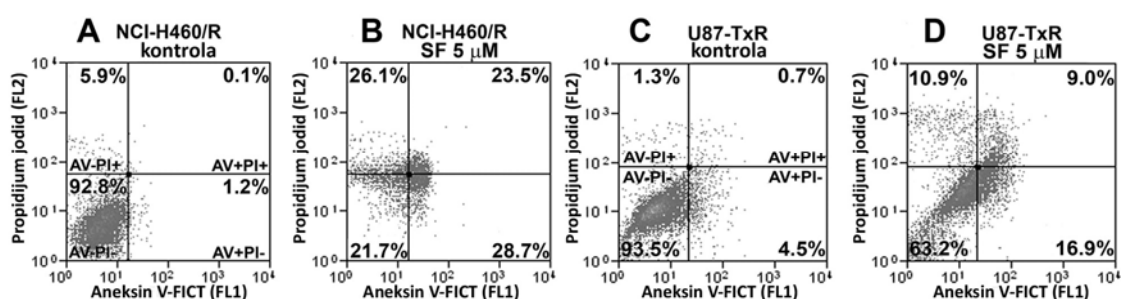
^b Efekat SF-a analiziran nakon 144 h (72 h inkubacije sa SF, praćeno oporavkom ćelija naredna 72 h)

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Na slici 13 se vidi da 5 μ M SF-a dovodi do značajnog povećanja zastupljenosti apoptotičnih ćelija u obe MDR ćelijske linije, (AV+/PI- ćelije u ranoj apoptozi, koje vezuju samo aneksin) i to 28,7% kod NCI-H460/R odnosno 16,9% kod U87-TxR (Slika 13B, D) u

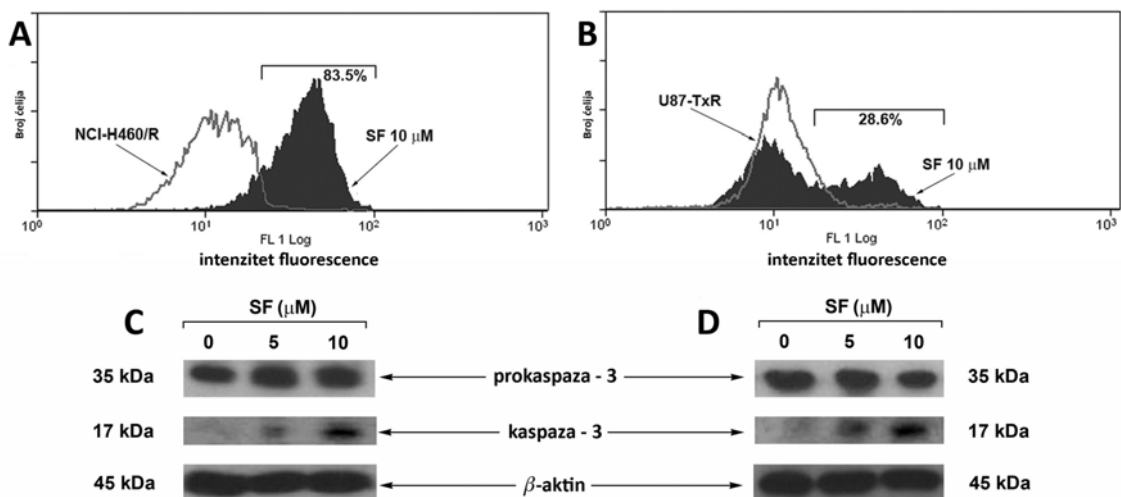
odnosu na netretirane kontrole kod kojih je taj procenat 1,2% odnosno 4,5% (Slika 13A, C). Procenat živih ćelija, koje su dvostruko negativne (AV-/PI-) se značajno smanjuje i iznosi 21,7% za NCI-H460/R i 63,2% za U87-TxR (Slika 13B, D). Nakon tretmana SF-om, povećava se i procenat ćelija u kasnoj apoptozi (dvostruko pozitivne: AV+/PI+), kao i sekundarno nekrotičnih ćelija, tj. onih koje su već mrtve i pozitivne samo na PI bojenje. Ovo povećanje je naročito izraženo kod NCI-H460/R ćelijske linije (Slika 13B).



Slika 13. Efekat SF-a na indukciju apoptoze kod NCI-H460/R (A, B) i U87-TxR (C, D) ćelija. Ćelije su tretirane sa 5 μ M SF-a 72 h i ostavljene da se oporave od tretmana u čistom medijumu naredna 72 h. Zatim su bojene aneksin/propidijum jodidom, a rezultat je očit na protočnom citometru. Na slici su prikazani reprezentativni tačkasti dijagrami i navedena procentualna vrednost zastupljenosti ćelija u četiri grupe: AV-/PI- (žive ćelije), AV+/PI- (ćelije u ranoj apoptozi), AV+/PI+ (ćelije u kasnoj apoptozi) i AV-/PI+ (nekrotične ćelije).

Kako bi pokazali da je indukcija apoptoze pod dejstvom SF-a zavisna od aktivacije kaspaza, MDR ćelije su inkubirane sa ApoStat-om, fluorescentno obeleženim nespecifičnim pankaspaznim inhibitorom (Slika 14). Kod SF-om tretiranih NCI-H460/R ćelija, % ćelija u kojima je došlo do vezivanja ApoStat-a koje ukazuje na prisustvo aktivnih kaspaza, je za 83,5% (Slika 14A), a kod U87-TxR ćelija za 28,6% veće u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 14B).

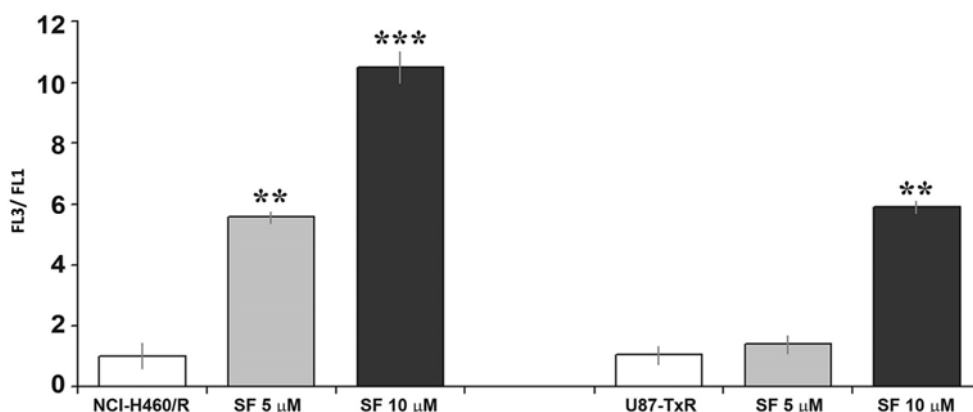
Pored toga, primenom imunoblot tehnike je pokazano da kod rezistentnih ćelija pod dejstvom SF-a dolazi do povećanja ekspresije aktivirane kaspaze 3 (17 kDa) u odnosu na njenu neaktivnu formu prokaspazu 3 (35kDa) (Slika 14C, D).



Slika 14. Efekat SF-a dovodi do aktivacije kaspaza kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija. Pankaspazna aktivnost određena metodom protočne citometrije (A, B); Ekspresija prokaspaze 3 i kaspaze 3 dobijena imunoblot tehnikom (C, D). Reprezentativni histogrami ilustruju povećano vezivanje ApoStat-a pri tretmanu sa 10 μM SF-a kod NCI-H460/R (A) i U87-TxR ćelija (B). Ekspresija prokaspaze 3 i kaspaze 3 je prikazana u odnosu na internu kontrolu β-aktin nakon dejstva 5 i 10 μM SF-a kod NCI-H460/R ćelija (C) i U87-TxR ćelija (D).

4.4. SF DOVODI DO INDUKCIJE AUTOFAGIJE U MDR ČELIJSKIM LINIJAMA (NCI-H460/R I U87-TxR)

Efekat SF-a na indukciju autofagije ispitan je kod MDR ćelija u tretmanu sa oporavkom, jer smo već ranije pokazali da SF tada ima najpotentniji citotoksični efekat na indukciju apoptoze i nekroze. Nakon oporavka u trajanju od 72 h ćelije su bojene akridin oranž bojom, a dobijeni efekat analiziran na protočnom citometru. Na slici 15 se uočava veoma snažna indukcija autofagije. SF u koncentraciji od 10 μM kod NCI-H460/R ćelija povećava zastupljenost kiselih vezikula 10,5 puta ($p < 0,001$), a u koncentraciji od 5 μM 5,5 puta ($p < 0,01$) u odnosu na netretiranu kontrolu. Kod U87-TxR, SF u koncentraciji od 10 μM povećava zastupljenost kiselih vezikula 5,8 puta ($p < 0,01$) u odnosu na netretiranu kontrolu, dok 5 μM SF-a na ovim ćelijama ne ispoljava značajan efekat.



Slika 15. Efekat SF-a na zastupljenost kiselih citoplazmatskih vezikula u NCI-H460/R i U87-TxR ćelijama. Kvantitativni sadržaj kiselih citoplazmatskih vezikula u ćelijama tretiranim SF-om u koncentraciji 5 i 10 μM meren je protočnom citometrijom. Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane kontrole je prikazana kao $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***).

4.5. SF MODULIRA DETOKSIFIKACIONI KAPACITET MDR ĆELIJSKIH LINIJA (NCI-H460/R I U87-TxR)

Da bi utvrdili potentnost SF-a da modulira detoksifikacioni kapacitet ispitivanih MDR ćelijskih linija, ispitali smo njegov efekat na glutationski detoksifikacioni sistem tj. efekat na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), koncentraciju glutaciona (GSH), kao i na nivo ekspresije *gst-π* iRNK i γ GCS enzima u NCI-H460/R i U87-TxR ćelijama.

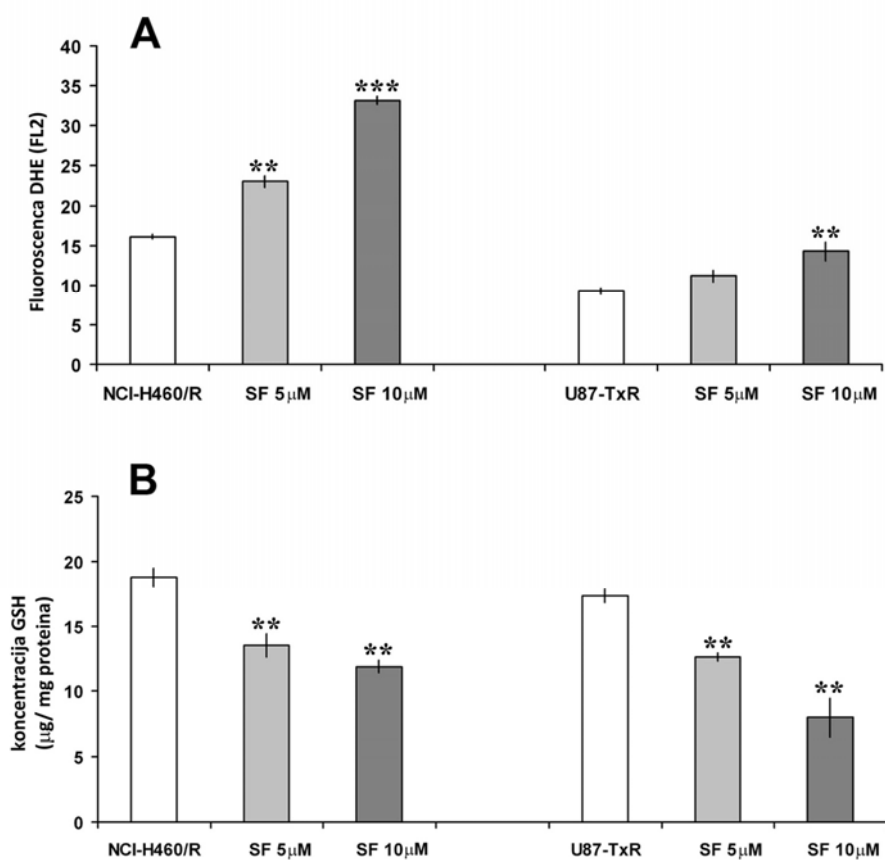
4.5.1. SF povećava produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta u MDR ćelijama

SF-om tretirane rezistentne ćelijske linije su bojene DHE bojom, koja u prisustvu superoksid anjona fluorescira crveno i dobijeni efekat je očitavan na protočnom citometru.

Dobijeni rezultati govore u prilog pozitivnog efekta SF-a na povećanje produkcije superoksid anjona, jedne od reaktivnih kiseoničnih vrsta (Slika 16A). Obe koncentracije SF-a 5 i 10 μ M u NCI-H460/R ćelijama dovode do značajnog povećanja produkcije superoksid anjona i to 1,43 puta ($p < 0,001$) odnosno 2,06 puta ($p < 0,01$) u odnosu na netretiranu kontrolu. Za razliku od NSCLC ćelija na U87-TxR efekat povećanja ROS-a izaziva samo koncentracija SF-a od 10 μ M i to 1,52 puta ($p < 0,01$) u odnosu na netretiranu kontrolu.

4.5.2. SF utiče na koncentraciju glutaciona u MDR ćelijama

Efekat SF-a na koncentraciju glutaciona (GSH) u ćelijama je ispitan merenjem koncentracije redukovanog glutaciona kolorimetrijskom metodom. Na slici 16B se vidi da SF dovodi do izraženog i značajnog smanjenja koncentracije GSH u obe ćelijske linije u odnosu na odgovarajuću netretiranu kontrolu. SF pri 10 μ M smanjuje koncentraciju GSH sa 19 na 12 μ g GSH/ml proteina u NCI-H460/R i sa 17 na 7 μ g GSH/ml proteina u U87-TxR ćelijama ($p < 0,01$). 5 μ M SF-a takođe značajno smanjuje koncentraciju GSH u obe MDR ćelijske linije i te vrednosti iznose 13,53 μ g GSH/ml proteina za NCI-H460/R i 12,63 μ g GSH/ml proteina za U87-TxR ($p < 0,01$) (Slika 16B).



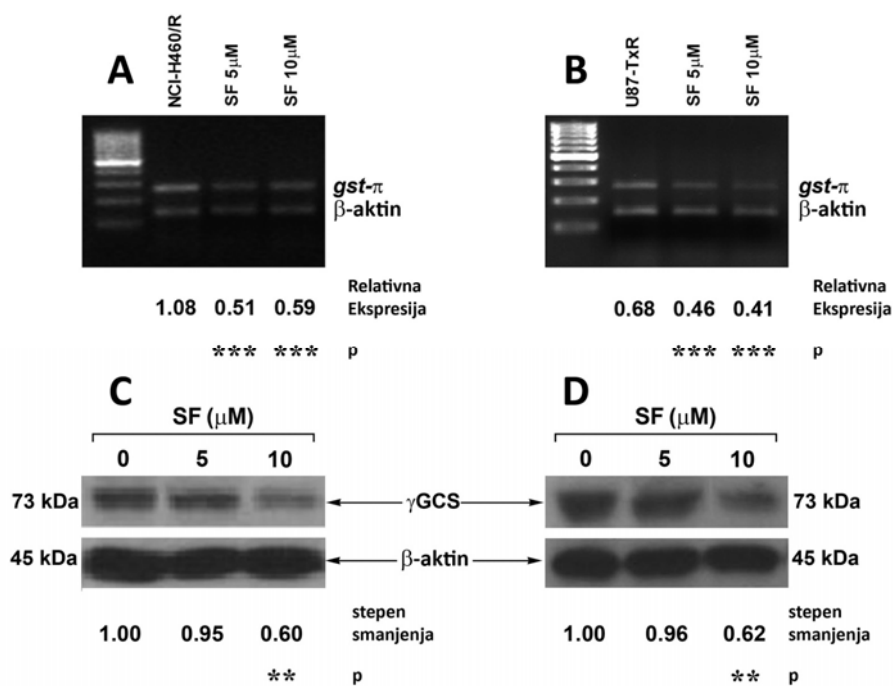
Slika 16. Efekat SF-a na produkciju superoksid anjona (A) i koncentraciju glutationa (B) u MDR ćelijama (NCI-H460/R i U87-TxR). Ćelije su tretirane SF-om 5 i 10 μM 72 h i intenzitet DHE fluorescence tj. sadžaj superoksid anjona je određen na protočnom citometru (A). Koncentracija redukovano GSH je određena primenom glutationskog kolorimetrijskog testa nakon tretmana rezistentnih ćelija SF-om (B). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane kontrole je prikazana kao $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***).

4.5.3. SF utiče na nivo ekspresije *gst- π* iRNK u MDR ćelijama

Efekat SF-a na nivo ekspresije glutation-S-transferaze- π (*gst- π*) iRNK, komponente GSH sistema ključne za detoksifikaciju, smo pokazali primenom RT-PCR tehnike. SF u obe koncentracije 5 i 10 μ M, indukuje značajno smanjenje ekspresije iRNK *gst- π* kod NCI-H460/R i U87-TxR (Slika 17A, B) u odnosu na netretiranu kontrolu. Relativna ekspresija *gst- π* je određena u odnosu na internu kontrolu *β -aktin*. Pod dejstvom obe koncentracije SF-a kod NCI-H460/R dolazi do značajnog smanjenja ekspresije u odnosu na netretiranu kontrolu ($p < 0,001$), kao i kod U87-TxR ($p < 0,01$).

4.5.4. SF utiče na nivo ekspresije γ GCS kod MDR ćelija

Efekat SF-a na ekspresiju gama-glutamil-cistein-sintetaze (γ GCS), enzima kritičnog za sintezu GSH, je određen imunoblot tehnikom. Relativna ekspresija γ GCS je određena u odnosu na internu kontrolu *β -aktin*. Primena SF u koncentraciji od 10 μ M dovodi do značajnog smanjenja ekspresije γ GCS u obe MDR ćelijske linije za oko 40%, $p < 0,01$ (Slika 17C, D).



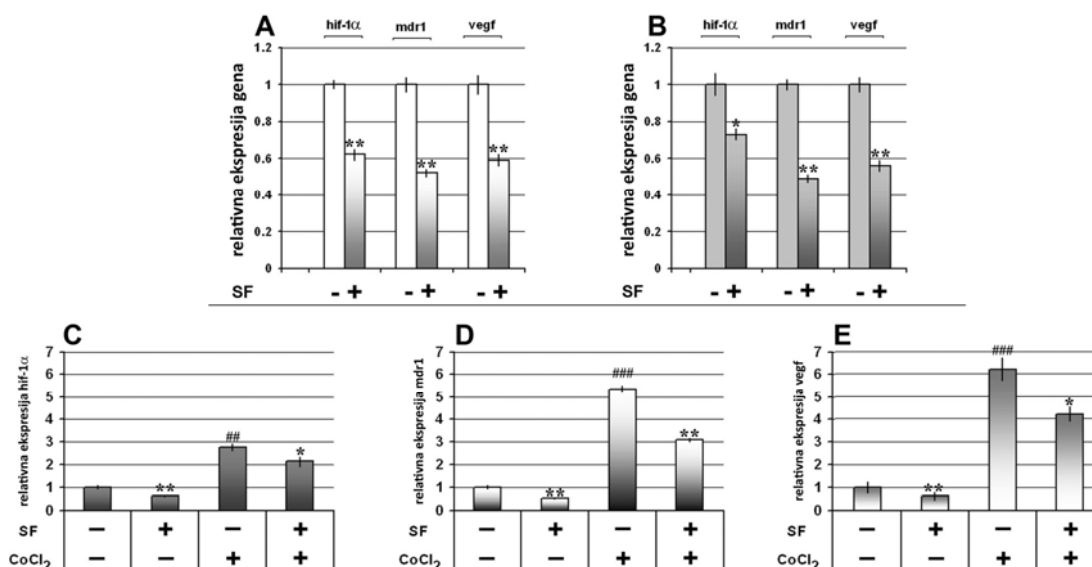
Slika 17. Efekat SF-a na nivo ekspresije iRNK *gst-π* (A, B) i nivo ekspresije γ GCS (C, D) kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija. Nivo ekspresije *gst-π* iRNK je određen RT-PCR tehnikom u uzorcima rezistentnih ćelija NCI-H460/R (A) i U87-TxR (B). Nivo ekspresije γ GCS je određen imunoblot tehnikom u uzorcima rezistentnih ćelija NCI-H460/R (C) i U87-TxR (D). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane kontrole je prikazana kao $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***).

4.6. SF DOVODI DO SMANJENJA EKSPRESIJE *hif-1 α* , *mdr1* i *vegf* iRNK U MDR ĆELIJAMA (NCI-H460/R I U87-TxR)

Efekat SF-a na ekspresiju baterije gena koji učestvuju u progresiji tumora, posebno u hipoksičnim uslovima je pokazan na obe MDR ćelijske linije pomoću RT-PCR tehnike. Relativna ekspresija ovih gena je izražena u odnosu na ekspresiju internih kontrola - *gapdh* i *β -aktin*. Ćelije su tretirane sa 10 μ M SF-a tokom 72 h.

SF kod NCI-H460/R dovodi do značajnog smanjenja ekspresije *hif-1 α* , *mdr1* i *vegf* iRNK u odnosu na netretiranu kontrolu ($p < 0,01$) (Slika 18A). Kod U87-TxR SF dovodi do smanjenja ekspresije *mdr1* i *vegf* iRNK ($p < 0,01$) u odnosu na netretiranu kontrolu, a ekspresija *hif-1 α* je takođe značajno smanjena ($p < 0,05$) (Slika 18B).

Potencijal SF-a da utiče na regulaciju ekspresije *hif-1 α* koja je indukovana hipoksijom je ispitivan na NCI-H460/R i U87-TxR ćelijama koje su tretirane kobalt hloridom (CoCl_2). CoCl_2 , kao u slučaju pravih hipoksičnih uslova, stabilizuje *hif-1 α* ekspresiju i indukuje HIF-1 transkripciono regulisane gene. Rezultati pokazuju da 10 μ M SF-a zadržava potencijal da dovede do inhibicije ekspresije gena koji učestvuju u tumorskoj progresiji (*hif-1 α* , *mdr1* i *vegf* iRNK) kod NCI-H460/R ćelija i u hipoksičnim uslovima (Slika 18C, D i E). SF dovodi do smanjenja 1,66 puta relativnu ekspresiju *hif-1 α* u odnosu na netretiranu kontrolu iako se relativna ekspresija *hif-1 α* pod dejstvom CoCl_2 povećava 5,25 puta ($p < 0,05$) (Slika 18C). Pored toga, SF dovodi do smanjenja 1,39 puta relativnu ekspresiju *mdr1* u odnosu na netretiranu kontrolu, iako se relativna ekspresija *mdr1* u hipoksičnim uslovima povećava približno 5 puta ($p < 0,01$) (Slika 18D). SF zadržava potencijal da dovede do smanjenja relativnu ekspresiju *vegf* i to 1,5 puta u hipoksičnim uslovima, kada je relativna ekspresija *vegf* najviše izmenjena tj. povećana 6,22 puta ($p < 0,05$) (Slika 18E).



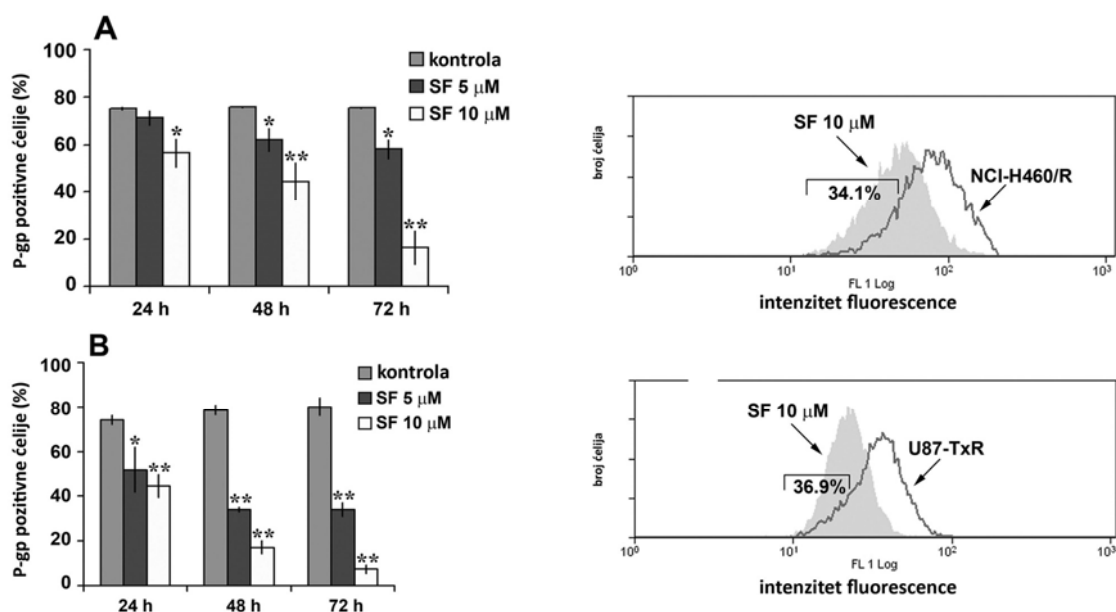
Slika 18. Kvantitativni prikaz promene relativne ekspresije iRNK gena uključenih u progresiju tumora pod dejstvom SF-a kod NCI-H460/R i U-87-TxR. SF u koncentraciji od 10 μM smanjuje relativnu ekspresiju *hif-1α*, *mdr1* i *vegf* kod NCI-H460/R (A) i U87-TxR (B) u normoksičnim uslovima. SF u koncentraciji od 10 μM u hipoksičnim uslovima (pod dejstvom CoCl₂) smanjuje relativnu ekspresiju *hif-1α* (C), *mdr1* (D) i *vegf* (E) kod NCI-H460/R ćelija. Ekspresija iRNK je analizirana RT-PCR tehnikom. *Gapdh* je korišćen za normalizaciju ekspresije *mdr1* i *hif-1α*, dok je *β-aktin* korišćen za normalizaciju ekspresije *vegf*. Statistički značajna razlika dejstva SF-a u odnosu na netretirane kontrole je prikazana kao p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***)). Statistički značajna razlika dejstva CoCl₂ u odnosu na netretirane kontrole je prikazana kao p<0,01 (##) i p<0,001 (###).

4.7. SF INHIBIRA EKSPRESIJU I AKTIVNOST P-gp PUMPE U MDR ĆELIJAMA (NCI-H460/R I U87-TxR)

Obe ispitivane MDR ćelijske linije NCI-H460/R i U87-TxR se odlikuju prekomernom ekspresijom i povišenom aktivnošću P-gp pumpe. Da bi pokazali da li je SF sposoban da vrši modulaciju MDR ispitali smo njegov uticaj na ekspresiju i aktivnost ove transportne pumpe.

4.7.1. Efekat SF-a na ekspresiju P-gp-a

NCI-H460/R i U87-TxR ćelije su tretirane SF-om u koncentraciji od 5 i 10 μ M tokom 24, 48 i 72 h, a zatim obeležene fluorescentnim antitelom na P-gp. Ekspresija P-gp-a je određena protočnom citometrijom. Populacija ćelija koje ekspimiraju P-gp u svakom uzorku je izračunata nakon korekcije za izotipsku kontrolu (ćelije obeležene izotipskim kontrolnim antitelom) (Slika 19). Uočava se da je efekat sulfinozina na P-gp ekspresiju dozno i vremenski zavisna (Slika 19A, B). Odgovarajući histogrami ilustruju dejstvo 10 μ M SF-a nakon 72 h, kada SF postiže najsnažniji efekat na ekspresiju P-gp-a kod NCI-H460/R i U87-TxR. Intenzitet fluorescence P-gp antitela u uzorcima ćelija tretiranih SF-om se smanjuje u odnosu na netretirane ćelije za 34,1% kod NCI-H460/R i 36,9% kod U87-TxR ($p < 0,01$).

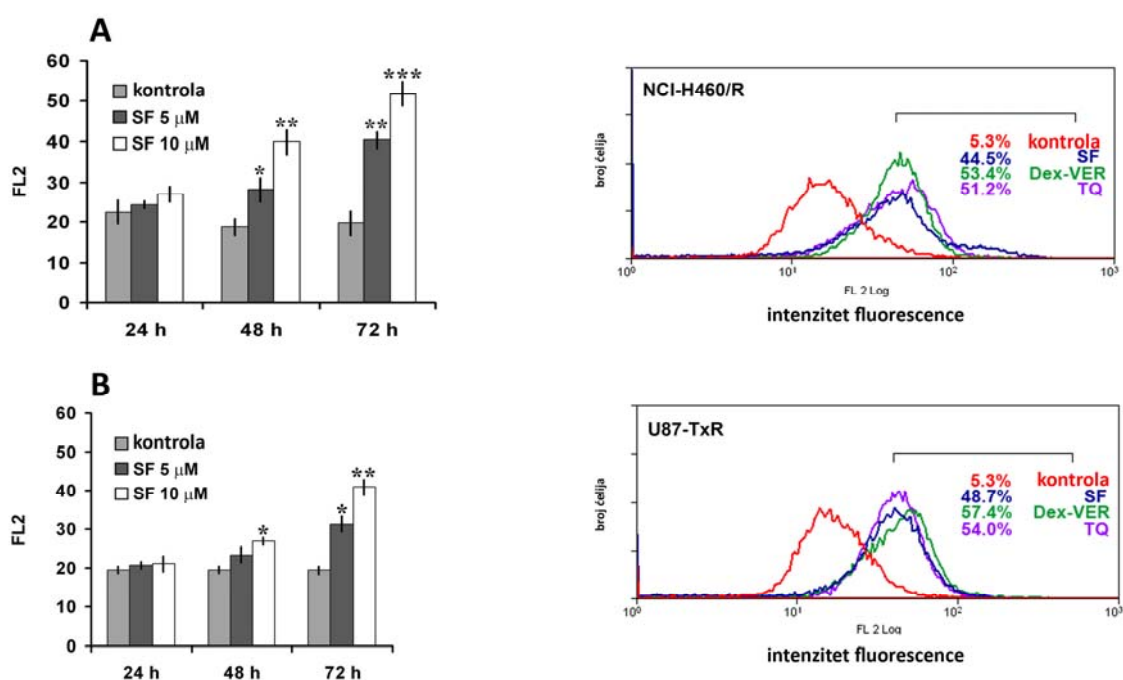


Slika 19. Efekat SF-a na ekspresiju P-gp-a u MDR ćelijama. Procenat P-gp pozitivnih ćelija normalizovan u odnosu na izotipsku kontrolu prikazan je kod NCI-H460/R (A) i U87-TxR (B) ćelija. Vrednosti su određene primenom protočne citometrije očitavanjem fluorescence FICT-obeležnog antitela na P-gp. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ($\bar{X} \pm SD$). Desno su prikazani reprezentativni histogrami koji ilustruju efekat SF-a na pad fluorescence P-gp-a kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija nakon 72 h tretmana. Statistički značajna razlika dejstva SF-a u odnosu na netretirane kontrole je prikazana kao $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**).

4.7.2. Efekat SF-a na aktivnost P-gp-a

Na osnovu unutarćelijske akumulacije DOX-a primenom metode protočne citometrije ispitan je efekat SF-a na aktivnost P-gp pumpe u kulturi NCI-H460/R i U87-TxR ćelija. Pored toga što je supstrat za P-gp, DOX ima sposobnost emitovanja fluorescence. NCI-H460/R i U87-TxR ćelije su tretirane SF-om u koncentraciji od 5 i 10 μM tokom 24, 48 i 72 h. Po završetku tretmana ćelije su izložene dejstvu 20 μM DOX-a tokom 120 min. Efekat SF-a na akumulaciju DOX-a je upoređen sa efektom tarikvidara (TQ) koji je nekompetitivni P-gp inhibitor i Dex-verapamila (Dex-VER) koji je kompetitivni P-gp inhibitor.

Upadljiv porast akumulacije DOX-a je zabeležen kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija tretiranih SF-om 48 i 72 h (Slika 20A, B). 10 μ M SF-a najefikasnije modulira aktivnost P-gp-a nakon 72 hh u obe MDR ćelijske linije, što je predstavljeno na reprezentativnim profilima sa protočnog citometra. Pod ovim uslovima SF povećava akumulaciju DOX-a kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija za 44,5 odnosno 48,7% što je uporedivo sa efektom koji ispoljavaju TQ i Dex-VER.



Slika 20. Efekat SF-a na akumulaciju DOX-a kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija. Prikazani su efekti SF-a nakon 24, 48 i 72 h na akumulaciju DOX-a kod NCI-H460/R (A) i U87-TxR (B) ćelija. Desno su prikazani reprezentativni histogrami koji ilustruju akumulaciju DOX-a u ćelijama prethodno tretiranim sa 10 μ M SF, 50 nM TQ i 10 μ M Dex-VER 72 h. Statistički značajna razlika dejstva SF-a u odnosu na netretirane kontrole je prikazana kao $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***)

4.8. SF DOVODI DO SENZITIZACIJE MDR ĆELIJA (NCI-H460/R I U87-TxR)

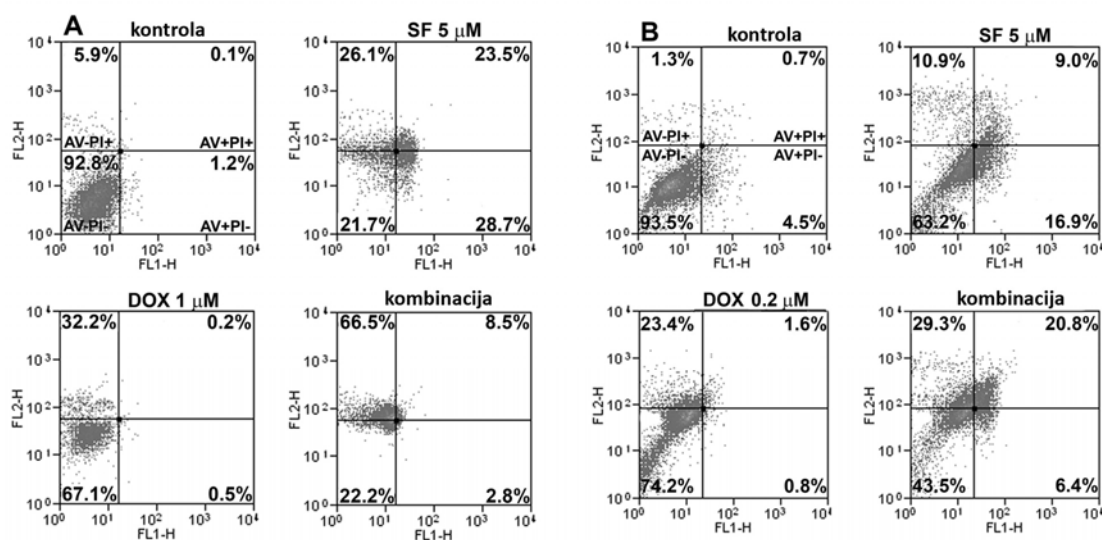
Sposobnost SF-a da vrši modulaciju efekta klasičnih citotoksičnih agenasa kao što je DOX je ispitana primenom MTT testa. Kod obe rezistentne ćelijske linije NCI-H460/R i U87-TxR smo ispitali efekat SF-a i DOX-a u istovremenom i naizmeničnom tretmanu (Tabela 4). Pri istovremenom tretmanu ne dolazi do značajnog smanjenja vrednosti IC₅₀ za DOX u obe rezistentne ćelijske linije. Međutim, u naizmeničnom tretmanu SF dovodi do značajnog pojačanja osetljivosti NCI-H460/R ćelija na DOX i to 7,26 puta, pa se tako IC₅₀ za DOX smanjuje sa 7,083 na 0,976 µM. Kod U87-TxR ćelija SF takođe postiže značajan senzitivijući efekat u naizmeničnom tretmanu, i dovodi do pojačanja osetljivosti rezistentnih glioma na DOX čak 17 puta, tj. IC₅₀ za DOX se smanjuje sa 4,100 na 0,241 µM.

Tabela 4. Relativna reverzija rezistencije na DOX u istovremenom i naizmeničnom tretmanu sa SF-om kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija

Ćelijske linije	Supstance	IC ₅₀	Relativna reverzija
NCI-H460/R	DOX	3,250 ± 0,260	
	SF 5 µM+DOX istovremeno	3,036 ± 0,091	1,07
	DOX	7,083 ± 0,212	
	SF 5 µM + DOX naizmenično	0,976 ± 0,010	7,26
U87-TxR	DOX	0,224 ± 0,027	
	SF 5 µM+DOX istovremeno	0,098 ± 0,025	2,28
	DOX	4,100 ± 0,079	
	SF 5 µM + DOX naizmenično	0,241 ± 0,019	17,01

Senzitivijući efekat SF-a je potvrđen i analizom ćelijske smrti u uzorcima pojedinačno i naizmenično tretiranim SF-om i DOX-om primenom metode protočne

citometrije tj. dvostrukim bojenjem ćelija aneksin/propidijum jodidom (Slika 21). Kao uzorci za upoređivanje u naizmeničnom kombinovanom tretmanu korišćene su ćelije pretretirane SF-om 72 h, a zatim oporavljene u čistom medijumu 72 h, kao i ćelije koje su slobodno rasle 72 h u čistom medijumu, a zatim 72 h tretirane DOX-om. NCI-H460/R ćelije su prvo tretirane sa 5 μM SF-a tokom 72 h. Zatim je medijum zamenjen i ćelije su naredna 72 h inkubirane sa 1 μM DOX-a, dok su U87-TxR ćelije u naredna 72 h tretirane sa 0,2 μM DOX-a. Procenat sekundarno nekrotičnih NCI-H460/R ćelija u uzorcima tretiranim samo DOX-om iznosi 32,2 % i taj procenat se u naizmeničnom tretmanu sa SF-om povećava na 65,5 % (Slika 21A). Kod U87-TxR procenat ćelija u kasnoj apoptozi (AV+/PI+) raste sa 1,6% u pojedinačnom tretmanu sa DOX-om na 20,8 % u naizmeničnom tretmanu sa SF-om (Slika 21B).



Slika 21. Efekat naizmenične kombinacije SF-a i DOX-a na indukciju ćelijske smrti kod NCI-H460/R (A) i U87-TxR (B) ćelija. Na slici su prikazani reprezentativni tačkasti dijagrami i navedene srednje vrednosti procentualne zastupljenosti ćelija u kontrolama i tretmanima. Na FL2 kanalu se očitavaju ćelije pozitivne na propidijum jodid, a na FL1 kanalu ćelije koje su pozitivne na Aneksin V-FICT. Razlikujemo četiri populacije ćelija: AV-/PI- (žive ćelije), AV+/PI- (ćelije u ranoj apoptozi), AV+/PI+ (ćelije u kasnoj apoptozi) i AV-/PI+ (nekrotične ćelije).

4.9. SF MODULIRA UNUTARĆELIJSKI PUL VEGF₁₆₅ U MDR ĆELIJAMA (NCI-H460/R I U87-TXR)

4.9.1. SF utiče na ekspresiju vegf₁₆₅ iRNK kod MDR ćelija

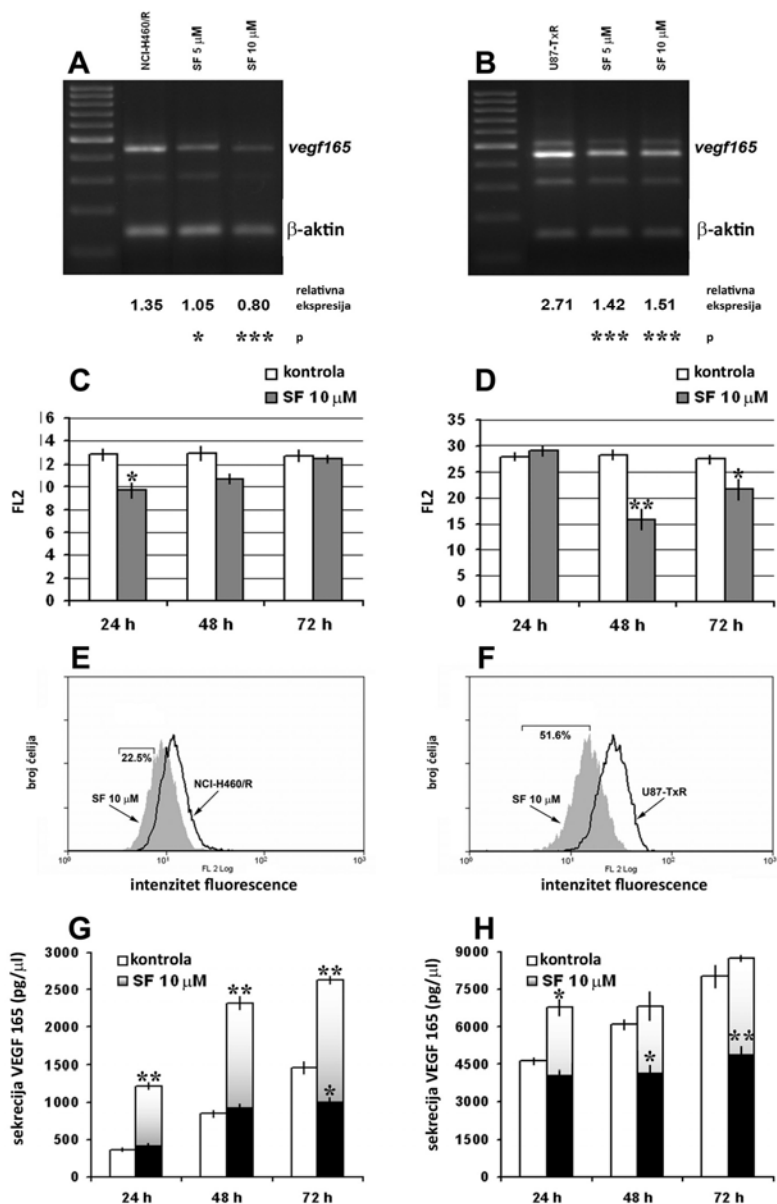
Nivo ekspresije *vegf₁₆₅* iRNK kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija je ispitan nakon tretmana SF-om. Smanjenje ekspresije *vegf₁₆₅* iRNK kod NCI-H460/R i U87-TxR ćelija je statistički značajno nakon dejstva obe koncentracije SF-a 5 i 10 μ M (Slika 22A, B). Amplifikovani uzorci su vizuelizovani etidijum bromidom na agaroznom gelu pored DNK lestvice (100bp). Relativna ekspresija *vegf* je izražena u odnosu na ekspresiju β -aktina.

Analiza ekspresije VEGF-a je izvršena na ćelijama prethodno tretiranim SF-om, koje su obeležene fluorescentnim antitelom na VEGF. Vrednosti su očitane na protočnom citometru. Srednje vrednosti su dobijene nakon uklanjanja signala za izotipsko antitelo. Efekat 10 μ M SF-a na ekspresiju VEGF-a u obe MDR ćelijske linije je određen nakon 24, 48 i 72 h (Slika 22C, D). Prikazani su histogrami koji ilustruju efekat 10 μ M SF-a nakon 24 h kod NCI-H460/R (Slika 22E) i nakon 48 h kod U87-TxR (Slika 22F). Rezultati pokazuju da SF dovodi do smanjenja ekspresije VEGF-a za 22,5% kod NCI-H460/R i za 51,5% kod U87-TxR.

4.9.2. SF utiče na sekreciju VEGF u MDR ćelijskim linijama

Koncentracije sekretovanog VEGF-a u medijumu tretiranih MDR ćelija su određene primenom VEGF imunoeseja. Ćelije su tretirane SF-om 24, 48 i 72 h. Rezultati su prikazani na slici 22. Koncentracije sekretovanog VEGF₁₆₅ kod netretiranih NCI-H460/R ćelija su iznosile 359, 845 i 1459 pg/ μ l za 24, 48 odnosno 72 h (Slika 22G). Ove vrednosti su bile znatno niže od vrednosti koncentracija sekretovanog VEGF₁₆₅ u medijumu netretiranih U87-TxR ćelija: 4620 pg/ μ l posle 24 h, 6070 pg/ μ l posle 48 h i 8020 pg/ μ l posle 72 h (Slika 22H). Kada se sekrecija VEGF-a normalizuje prema broju ćelija prisutnih u kulturi deluje da SF snažno stimuliše sekreciju VEGF₁₆₅ kod NCI-H460/R, pa tako dobijene vrednosti iznose 1220 pg/ μ l nakon 24 h, 2323 pg/ μ l nakon 48 h i 2629 pg/ μ l nakon 72 h (Slika 22G). Ovako obrađeni rezultati kod U87-TxR ćelija takođe ukazuju na povećanje sekrecije VEGF₁₆₅ izazvano SF-om, ali samo posle 24 h (Slika 22H). Međutim, kada se posmatra apsolutna koncentracija VEGF-a u medijumu nakon dejstva SF-a tj. bez normalizacije u odnosu na

broj ćelija, SF statistički značajno smanjuje sekreciju VEGF-a i to najviše nakon 72 h tretmana, $p < 0,05$ za NCI-H460 (Slika 22G) i $p < 0,01$ za U87-TxR (Slika 22H).



Slika 22. Sulfinozin utiče na nivo ekspresije iRNK *vegf165* i sekreciju VEGF-a u NCI-H460/R (A, C, E) i U87-TxR ćelijama (B, D, F). Nivo ekspresije iRNK *vegf165* je određen RT-PCR tehnikom nakon tretmana ćelija SF-om 5 i 10 μ M tokom 72 h (A, B). VEGF ekspresija je određena nakon 24, 48 i 72 h (C, D) kod ćelija tretiranih SF-om 10 μ M i netretiranih kontrola. Odgovarajući reprezentativni histogrami (E, F) ilustruju efekat 10 μ M SF-a nakon 24 h. Koncentracija sekretovanog VEGF-a u medijumu je određena nakon tretmana SF-om 10 μ M 24, 48 i 72 h (G, H). Statistički značajna razlika dejstva SF-a u odnosu na netretirane kontrole je prikazana kao $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***).

5. DISKUSIJA

Veliki broj istraživanja malignih bolesti je danas usmeren ka pronalaženju efikasne ciljane terapije čijom primenom bi mogao da se prevaziđe problem višestruke rezistencije (MDR) na hemioterapeutike. Potraga za efikasnijom antitumorskom terapijom kreće se u dva pravca: dizajniranje novih agenasa koji specifično inhibiraju ciljni molekul najčešće uključen u kaskadni prenos signala, i proučavanje interakcija sa transportnim membranskim proteinima kako bi se pronašli agensi sa najvećim hemiosenzitivivšućim potencijalom.

Izlečenje karcinoma pluća se postiže u veoma malom procentu slučajeva, posebno kada se bolest otkrije u kasnijim stadijumima (Grideli i sar., 2003), dok u terapiji glioma poseban izazov predstavljaju nemogućnost leka da prodre u CNS i dopre do tumora, kao i postojanje velike ćelijske heterogenosti koja dovodi do brzih i agresivnih recidiva (Furnari i sar., 2007). Kod pacijenata sa glioblastomima hemioterapija ispoljava skroman efekat na poboljšanje bolesti prevashodno zbog zaštitnog i selektivnog delovanja krvno-moždane barijere (Nies, 2007). Razumevanje genetičke i biološke osnove tumora pluća i mozga dramatično se povećalo poslednjih godina. Uprkos izvesnom napretku u razvoju novih terapija opšti utisak je da nije postignut maksimum u efikasnosti hemioterapijskog lečenja ova dva maligniteta. Ovome pre svega doprinosi stečena rezistencija, čija je molekularna promiskuitetna osnova prepoznavanja supstrata od strane MDR pumpi, pre svega P-glikoproteina, i dalje nerasvetljena (Seeger i van Veen, 2009).

Zbog svega navedenog postoji potreba za razvojem novih strategija lečenja i alternativnim oblicima terapije.

Rezistentne ćelijske linije koje su korišćene u ovom istraživanju imaju uspostavljen stabilni MDR fenotip za koji je predominantno odgovorna povišena ekspresija i aktivnost P-gp pumpe koja vrši jednosmerni transport lekova iz ćelija (Sarkadi i sar., 2006).

Antitumorski efekat sulfinozina je pokazan kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* ispitivanjima (Pešić i sar., 2009; Andjelković i sar., 2008; Pešić i sar., 2010; Fujitaki i sar.,

1989). Takođe je utvrđeno da sulfinozin ne dovodi do razvoja MDR i da može prodrati u CNS (Avery i sar., 1990). Posebno se pokazao korisnim u tretmanu tumorskih ćelija koje su razvile rezistenciju na druge tiopurine. Nedavno sprovedene kliničke studije sa 6-tioguaninom (jedinjenje po hemijskoj strukturi srodno sulfinozinu) su pokazale da njegovo kombinovanje sa drugim hemioterapeuticima daje dobre rezultate kod pacijenata sa rekurentnim gliomima visokog gradusa (Walbert i sar., 2011).

Kroz definisanje mehanizma dejstva u tumorskim ćelijskim linijama sa MDR fenotipom, ova studija nastoji da kvalifikuje sulfinozin kao hemosenzitivišući agens, koristan u kombinaciji sa drugim hemioterapeuticima. Dobijeni rezultati mogli bi da posluže kao polazna osnova za buduće prekliničke studije na animalnim ortotopnim modelima solidnih maligniteta.

5.1. SULFINOZIN INHIBIRA RAST TUMORSKIH ĆELIJA

Sulfinozin dozno zavisno u mikromolarnom opsegu smanjuje vijabilitet senzitivnih i rezistentnih ćelijskih linija NSCLC i glioblastoma, što ukazuje na to da prisustvo MDR fenotipa ne umanjuje njegov antitumorski efekat. Kod normalnih humanih keratinocita sulfinozin ne dovodi do značajnog smanjenja broja ćelija u odnosu na kontrolu čak i pod dejstvom najveće koncentracije od 100 μ M. Uzimajući u obzir da sulfinozin nije citotoksičan za normalne humane keratinocite, može se reći da poseduje selektivnost ka maligno izmenjenim ćelijama.

Uočili smo da je antitumorski efekat sulfinozina delom posledica njegovog antiproliferativnog dejstva, jer se pod njegovim uticajem broj nepodeljenih ćelija i u senzitivnim i u rezistentnim linijama značajno povećava u odnosu na netretirane kontrole. Antiproliferativni efekat sulfinozina utvrđen je specifičnim bojenjem ćelijskih proteina fluorescentnom bojom CFSE, čiji se intenzitet proporcionalno smanjuje u podeljenim ćelijama.

U tretmanu praćenom oporavkom ćelija u čistom medijumu, poboljšava se efekat sulfinozina na inhibiciju ćelijskog rasta i kod senzitivnih, i kod rezistentnih ćelija (Pešić i sar., 2009). Izgleda da su procesi, koje pokreće sulfinozin unutar ćelije, nepovratni i da

postaju očigledniji nakon dužeg perioda izlaganja. Pored toga, pokazano je da se odgovor ćelije na dejstvo tioguanina odlaže. DNK polimeraza neometano ugrađuje deoksitioGTP u DNK u toku replikacije. Prisustvo tioG u DNK remeti aktivnost RNaze H, topoizomeraze II i DNK ligaze, pa se zaustavljanje ćelijskog ciklusa očekuje tek u drugom krugu replikacije DNK (Somerville i sar., 2003).

Odloženo ireverzibilno dejstvo sulfinozina smo dodatno potvrdili analizom ćelijske smrti, kojom je utvrđen veći broj ćelija u apoptozi kada se posle tretmana sulfinozinom tumorske ćelije ostave da slobodno rastu još 72 h u čistom medijumu.

Ispitivanja sprovedena u trodimenzionalnoj kulturi su pokazala da sulfinozin menja adhezivne karakteristike obe rezistentne ćelijske linije, posebno glioblastoma. Ovakav efekat sulfinozina može biti izuzetno povoljan u smislu sprečavanja migracije tumorskih ćelija, invazije i pojave metastaza.

5.2. SULFINOZIN DOVODI DO INDUKCIJE APOPTOZE ZAVISNE OD KASPAZA

Sulfinozin indukuje apoptozu u obe rezistentne ćelijske linije. U uzorcima ćelija tretiranih sulfinozinom u koncentraciji od svega 5 μ M dolazi do značajnog povećanja broja ćelija u kasnoj apoptozi, što ukazuje da je apoptoza jedan od mehanizama koji doprinosi citotoksičnom efektu sulfinozina.

Primenom fluorohromom obeleženog pankaspaznog inhibitora ApoStat pokazali smo da sulfinozin dovodi do indukcije aktivacije kaspaza. Inicijatorske kaspaze, uključujući kaspazu-2, -8, -9 i -10 aktiviraju kaspaznu kaskadu uklanjanjem inaktivnog prodomena efektorskih kaspaza. Jednom aktivirane efektorske kaspaze, uključujući kaspazu-3, -6 i -7 isecaju ostale ključne supstrate unutar ćelija kako bi se do kraja izveo proces apoptoze (Taylor i sar., 2008). Značajno povećanje procenta ćelija sa vezanom apoptat bojom potvrđuje prisustvo procesa apoptoze kod uzoraka tretiranih sulfinozinom. Iako je indukcija apoptoze u obe rezistentne ćelijske linije zavisna od kaspaza, ova aktivacija kaspaza je mnogo izraženija kod rezistentnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća.

Posebno smo pokazali aktivaciju kaspaze 3 nakon tretmana sulfinozinom primenom citotoksično-efikasnih koncentracija u obe MDR ćelijske linije.

U prethodnim istraživanjima je potvrđeno da tokom razvoja rezistencije kod NSCLC ćelija dolazi do mutacija u *p53* genu (Andjelkovic i sar., 2008). Mutacije *p53* se dovode u vezu sa pojačanom rezistencijom na hemioterapiju (Avery-Kiejda, 2008). Međutim, mi smo pokazali da antitumorsko dejstvo sulfinozina kod rezistentnih NSCLC ćelija ipak uključuje indukciju apoptoze. Poznato je da sulfinozin formira adukte sa sulfhidrilnim jedinjenjima glutationom i cisteinom (Fujitaki i sar., 1989; Riley i sar., 1989), a pražnjenje glutationskog pula u ćelijama može dovesti do nishodne regulacije Bcl-2 (Rudin, 2003), oslobađanja citohroma c iz mitohondrija i aktivacije kaspaza (Ghibelli i sar., 1999). Obzirom da sulfinozin u ovoj ćelijskoj liniji indukuje apoptozu zavisnu od kaspaza, nameće se zaključak da njegovo dejstvo kod rezistentnih NSCLC ćelija nije *p53*-zavisno, odnosno da mutacije u *p53* ne utiču na senzitivnost ovih ćelija na sulfinozin.

Kako kod senzitivnih ćelija glioblastoma postoji nekoliko anti-apoptotskih mehanizama, kao što su prekomerna ekspresija PKA, HSP70, Bcl-2 i nedostatak PTEN-a (Chang i sar., 2011; Li i sar., 2011; Eimer i sar., 2011; Voss i sar., 2010), pretpostavili smo da su isti mehanizmi očuvani i kod od njih izvedenih rezistentnih ćelija. Pošto sulfinozin izaziva apoptozu i kod rezistentnih glioblastoma očigledno je da njegovo dejstvo prevazilazi uticaj anti-apoptotskih mehanizma.

Autofagija je katabolički proces koji je odgovoran za uklanjanje dugoživećih proteina i oštećenih organela putem lizozomske mašinerije. Pod određenim okolnostima, autofagija predstavlja vid stres-adaptacije u cilju izbegavanja ćelijske smrti i na taj način potiskuje apoptozu (Maiuri i sar., 2007). Međutim, autofagija može biti indukovana istim ushodnim signalima kao apoptoza. I zaista, povećanje zastupljenosti kiselih vezikula pokazatelja autofagije u rezistentnim ćelijama tretiranim sulfinozinom ukazuje na povezanost apoptoze i autofagije i njihovu zajedničku aktivaciju sulfinozinom.

5.3. SULFINOZIN MODULIŠE ĆELIJSKI DETOKSIFIKACIONI KAPACITET

Oksidoredukcioni status ćelije zavisi od delikatne ravnoteže između nivoa slobodnih radikala (ROS, npr. super oksid i hidrogen peroksid) i antioksidativnog sistema koji ih uklanja (glutation (GSH)/GSH peroksidazni put i tireodoksin/peroksiredoksin put) iz

ćelija (Menon i Goswami, 2007). Najveći broj antitumorskih lekova (antifolati, vinka alkaloidi, taksani, etoposid, kamptotecin) imaju jasno uspostavljen mehanizam dejstva koji ne uključuje stvaranje slobodnih radikala ili njihovih intermedijera (Manda i sar., 2009). U međuvremenu je opšte prihvaćeno da antraciklini, većina alkilirajućih agenasa, i platinski kompleksi barem delom svoj antitumorski ili toksični efekat ispoljavaju zbog generisanja oksidativnog stresa (Conklin, 2004). Utvrdili smo da sulfinozin povećava produkciju ROS u obe rezistentne ćelijske linije, kao i da dovodi do značajnog smanjenja koncentracije GSH. ROS je tzv. „mač sa dve oštrice“ koji ne samo da učestvuje u razvoju maligniteta, već se može koristiti i kao terapijsko oružje u lečenju ovih bolesti. Dejstvom na glavni antioksidativni detoksifikacioni put u ćelijama tj. GSH sistem, koji uklanja ROS, sulfinozin može izazvati unutarćelijska oštećenja kao što su lipidna peroksidacija, oštećenja DNK i oksidacija proteina (Townsend, 2003). Pored toga, sulfinozin smanjuje ekspresiju glutation-S-transferaze- π (gst- π), važne komponente GSH sistema, koja je poznata kao marker rezistencije na lekove. Sulfinozin takođe dovodi i do značajnog pada nivoa ekspresije γ -glutamil-citein-sintetaze (γ GCS) kritičnog enzima za sintezu GSH.

Osujećući sintezu i smanjujući nivo unutarćelijskog GSH, sulfinozin povećava produkciju ROS i izaziva oštećenja tumorskih ćelija, što za posledicu ima značajnu citotoksičnost. Uloga GSH i srodnih enzima u rezistenciji ćelija na ksenobiotike, uključujući antitumorske lekove je dobro poznata. Obzirom da sulfinozin modulira GSH sistem, ova njegova osobina može biti korisna kada se sulfinozin primeni u kombinaciji sa nekim drugim hemioterapeutikom. Međutim, antitumorske terapije koje deluju na antioksidativni sistem predstavljaju veliki rizik za održavanje normalne homeostaze u organizmu. Svi budući terapijski pristupi koji ciljaju ćelijski oksidoredukcioni status moraju da uzmu u obzir kompleksnu mrežu fizioloških i patoloških puteva koji su strogo regulisani oksidoredukcionom ravnotežom (Manda i sar., 2009).

5.4. SULFINOZIN DOVODI DO SMANJENJA EKSPRESIJE *hif-1 α* i RNK

Obzirom da sulfinozin modifikuje oksidoredukcioni status u tumorskim ćelijama sa MDR fenotipom ispitali smo njegov efekat na nivo ekspresije HIF-1 α koji vrši regulaciju

ćelijskih procesa u zavisnosti od dostupnosti kiseonika. Pored toga, HIF-1 α aktivira transkripciju *mdr1* i *vegf* gena odgovornih za rezistentni i invazivni fenotip tumora (Xia i sar., 2012). Naši rezultati pokazuju da sulfinozin dovodi do značajnog smanjenja ekspresije *hif-1 α* , *mdr1* i *vegf* iRNK u obe rezistentne ćelijske linije. Tako, povišena koncentracija ROS u ćeliji nakon izlaganja sulfinozinu može smanjiti ekspresiju HIF-1 α , koji dalje reguliše ekspresiju P-glikoproteina i VEGF-a. Kod NSCLC rezistentnih ćelija, nakon tretmana kobalt hloridom, koji kao u hipoksičnim uslovima stabilizuje ekspresiju HIF-1 α , sulfinozin je zadržao potencijal da dovede do inhibicije ekspresije gena tumorske progresije *hif-1 α* , *mdr1* i *vegf* iRNK.

5.5. SULFINOZIN DOVODI DO INHIBICIJE EKSPRESIJE I AKTIVNOSTI P-glikoproteina

Pored uticaja na smanjenje ekspresije *mdr1* iRNK, pokazali smo da sulfinozin dovodi do smanjenja ekspresije i odgovarajućeg proteina P-glikoprotein transportne pumpe. Uticaj na P-glikoprotein ekspresiju je dozno i vremenski zavisna kod obe rezistentne linije, a najbolji efekat se postiže nakon 72 h.

MDR fenotip kod ispitivanih rezistentnih ćelija karcinoma pluća i glioblastoma je u korelaciji sa povišenom ekspresijom P-glikoproteina, pa je niska akumulacija DOX-a i rodamina 123 u ovim ćelijama posledica visoke efluksne aktivnosti P-glikoprotein pumpe (Pescic i sar., 2006; Podolski-Renic i sar., 2011). Efekat sulfinozina na aktivnost P-glikoproteina, koji je utvrđen na osnovu akumulacije doksorubicina, je takođe dozno i vremenski zavisna kod obe rezistentne linije i poklapa se sa efektom sulfinozina na ekspresiju P-glikoproteina. Nakon 72 h tretmana, sulfinozin inhibira aktivnost P-glikoproteina dovoljno dobro kao i tarikvidar (poznati nekompetitivni modulator P-glikoproteina) i deksverapamil (poznati kompetitivni modulator P-glikoproteina).

5.6. HEMIOSENZITIVIZACIJA SULFINOZINOM

Pošto sulfinozin smanjuje ekspresiju i aktivnost P-glikoprotein pumpe, ispitali smo da li sulfinozin može dovesti do senzitivizacije MDR ćelija, odnosno poboljšati efekat doksorubicina, koji je supstrat za P-glikoprotein i na čije su dejstvo obe ispitivane ćelijske linije rezistentne. Senzitivizujući efekat na doksorubicin je ispitan u simultanom i naizmeničnom kombinovanom tretmanu sa sulfinozinom. Primena 5 μ M sulfinozina u naizmeničnom tretmanu dovodi do reverzije rezistencije na doksorubicin i to za 7 puta kod NSCLC ćelija, a za 17 puta kod ćelija glioblastoma.

Naizmenični tretman, u kojem je izvršen pretretman sulfinozinom tokom 72 h i time obezbeđena maksimalna inhibicija ekspresije P-glikoproteina doveo je do značajnog smanjenja efektivnih koncentracija doksorubicina koje su iz mikromolarnog opsega pale u nanomolarni opseg kod obe rezistentne ćelijske linije. Hemiosenzitivizujući efekat sulfinozina u simultanom tretmanu sa doksorubicinom je bio zanemarljiv, što uklanja sumnju da sulfinozin poboljšava efekat doksorubicina pukim združivanjem dejstava ove dve supstance.

Ranije je pokazano da sulfinozin dovodi do smanjenja ekspresije topo II α , koji je glavni ciljni molekul za doksorubicin (Pesic i sar., 2009) i logično se nameće zaključak da će istovremena primena sulfinozina i doksorubicina dovesti do antagonističkog efekta. Obzirom da u naizmeničnom tretmanu ova dva agensa deluju sinergistički to se jedino može objasniti povećanom akumulacijom doksorubicina. Definitivno, hemiosenzitivizujući efekat koji izaziva sulfinozin nije posledica njegove unutarćelijske interakcije sa doksorubicinom. Pojačana citotoksičnost doksorubicina u kombinaciji sa sulfinozinom u ćelijskim linijama sa MDR fenotipom je posledica inhibicije ekspresije i aktivnosti P-glikoproteina. U prilog ovom mehanizmu sulfinozina ide i nalaz da purinski analozi utiču na sintezu membranskih glikoproteina (Sokoloski i Sartorelli, 1987).

5.7. SULFINOZIN MODULIRA UNUTARĆELIJSKI SADRŽAJ VEGF₁₆₅

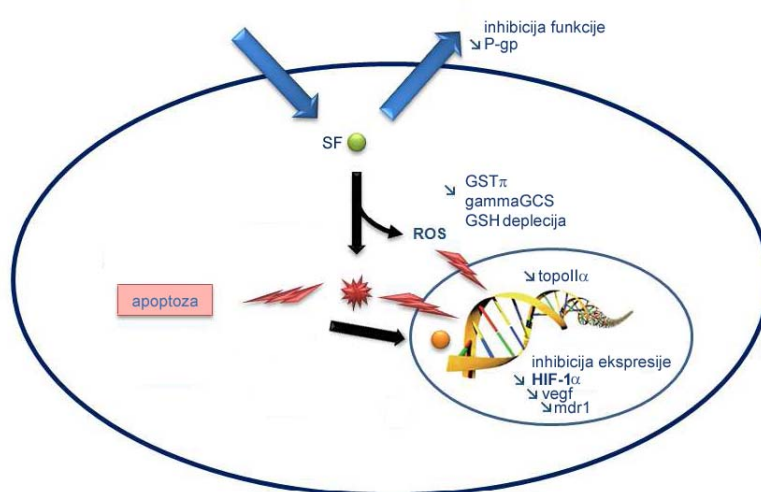
VEGF je jedan od najvažnijih angiogenih faktora. Ekspresija VEGF-a je u direktnoj korelaciji sa procesom formiranja novih krvnih sudova i tumorskom progresijom kod pacijenata sa NSCLC (Fontanini i sar., 1995), a za glioblastome je poznato da su najbolje prokrvljeni tumori kod ljudi (Jansen i sar., 2004). Veliki broj novih ciljanih terapija se upravo razvija u pravcu blokiranja neoangiogeneze kod ove dve maligne forme (Horn i Sandler, 2009; Underiner i sar., 2004). Ranije je pokazano da 6-tioguanin, koji je srodan molekul sulfinozinu ispoljava antiangiogeni potencijal (Presta i sar., 2002).

Pored toga, ekspresiju VEGF-a i P-glikoproteina reguliše isti transkripcioni faktor HIF-1 α (Jin i sar., 2011), pa smo pretpostavili da sulfinozin može imati pored MDR modulišućeg i anti-angiogeni efekat. Visoka koncentracija VEGF-a može smanjiti ekspresiju P-glikoproteina (Dunne i sar., 2011; Hawkins i sar., 2010). Smanjenje ekspresije *vegf165* iRNK pod dejstvom 10 μ M sulfinozina u obe MDR ćelijske linije dostiže skoro 50% nakon 72 h, dok je nivo proteinske ekspresije VEGF₁₆₅ značajno smanjen nakon 24 h kod NSCLC, a nakon 48 h kod glioblastoma i prolaznog je karaktera. Količina sekretovanog VEGF₁₆₅ u medijumu u kojem su kultivisane ćelije značajno pada nakon 72 h kod rezistentnih NSCLC ćelija, dok je kod glioblastoma zabeleženo značajno smanjenje sekretovanog proteina posle 48 i 72 h. Ovo smanjenje sekrecije VEGF₁₆₅ može biti posledica smanjenja broja ćelija pod dejstvom sulfinozina, ali i smanjene VEGF₁₆₅ ekspresije na proteinskom i iRNK nivou.

Anti-angiogeni potencijal sulfinozina se može objasniti pražnjenjem unutarćelijskog sadržaja VEGF₁₆₅ i sprečavanjem obnavljanja sinteze VEGF-a. Izvesna prisutna količina sekretovanog VEGF₁₆₅ u medijumu nakon tretmana sulfinozinom može biti posledica njegovog curenja iz umirućih ćelija. Potrebno je sprovesti dodatna istraživanja u kokulturi MDR i endotelijalnih ćelija kako bi se u potvrdio kapacitet sulfinozina za inhibiciju angiogeneze.

5.8. PREDLOŽENI MEHANIZAM DEJSTVA SULFINOZINA

Na osnovu prethodno objavljenih rezultata i rezultata dobijenih u našem istraživanju sprovedenom na dve tumorske ćelijske linije sa MDR fenotipom, predlažemo sledeći mehanizam dejstva sulfinozina (Slika 23): Sulfinozin dovodi do povećanja produkcije ROS zbog smanjenja koncentracije GSH, a koja je posledica inhibicije ključnog enzima za sintezu GSH gama-glutamil-cistein-sintetaze (γ GCS). Pored toga, sulfinozin dovodi do smanjenja ekspresije glutation-S-transferaze- π (GST- π) koja direktno učestvuje u procesu detoksifikacije. Sulfinozin, takođe, dovodi do indukcije apoptoze koja je posredovana kaspazama, dovodi do smanjenja ekspresije topoizomeraze II α (topoII α) kao i ekspresije HIF-1 α i VEGF i na taj način utiče na tumorsku angiogenezu i progresiju. Na kraju, sulfinozin inhibira P-glikoprotein koji je odgovoran kako za farmakokinetiku lekova tako i za MDR.



Slika 23. Predloženi mehanizam dejstva sulfinozina u ćelijama sa MDR fenotipom

6. ZAKLJUČCI

1. Sulfinozin je ispoljio citotoksični efekat prema senzitivnim (NCI-H460 i U87) i rezistentnim (NCI-H460/R i U87-TxR) ćelijskim linjama, dok ovaj efekat izostao kod normalnih ćelija (HaCaT ćelijska linija) čak i pri visokim dozama sulfinozina (100 μ M).
2. Sulfinozin kod rezistentnih ćelija dovodi do indukcije apoptoze, što je potvrđeno i aktivacijom efektorske kaspaze 3. Apoptoza zavisna od kaspaza je praćena pojavom autofagije.
3. Sulfinozin kod rezistentnih ćelija inhibira glutationski detoksifikacioni sistem na nivou sinteze glutaciona dovodeći do smanjenja ekspresije gama-glutamyl-cistein-sintetaze, kao i na funkcionalnom nivou dovodeći do smanjenja ekspresije glutathion-S-transferaze π , što za ishod ima povećanje unutarćelijskog sadržaja kiseoničnih reaktivnih vrsta.
4. Sulfinozin kod obe rezistentne tumorske ćelijske linije dovodi do inhibicije ekspresije iRNK *hif-1 α* što za posledicu ima značajno smanjenje ekspresije iRNK *mdr1* i *vegf* gena.
5. Sulfinozin kod rezistentnih tumorskih ćelijskih linija na dozno i vremenski zavisna način dovodi do inhibicije ekspresije P-glikoproteina.
6. Sulfinozin, takođe, na dozno i vremenski zavisna način inhibira funkciju P-glikoproteina, što je praćeno porastom akumulacije doksorubicina u rezistentnim ćelijama.
7. Sulfinozin pokazuje potencijal za pražnjenje unutarćelijskog sadržaja VEGF-a delujući na smanjenje njegove ekspresije i povećanje sekrecije na nivou jedne ćelije (relativna sekrecija). Istovremeno dolazi do smanjenja ukupnog nivoa sekrecije VEGF-a (apsolutna sekrecija).
8. Sulfinozin dovodi do značajnog povećanja senzitivnosti rezistentnih ćelija (NCI-H460/R i U87-TxR) na dejstvo doksorubicina u naizmeničnom tretmanu, dok je efekat u istovremenom tretmanu zanemarljiv.

Opšti zaključak

Sulfinozin u obe ćelijske linije sa MDR fenotipom (NCI-H460/R i U87-TxR) dovodi do deplecije glutationa, reverzije MDR-a putem inhibicije ekspresije i aktivnosti P-glikoproteina i modulacije unutarćelijskog pula VEGF-a. Sposobnost Sulfinozna da modifikuje oksidoredukциони status ćelija sa MDR fenotipom i utiče na regulaciju HIF-1 α leži u osnovi mehanizma kojim on moduliše MDR i senzitivise ćelije. Obzirom da sulfinozin utiče na različite mehanizme uključene u progresiju tumora, njegova samostalna primena ili primena u kombinaciji sa klasičnim hemioterapeuticima može biti osnova za novu terapijsku strategiju posebno kod solidnih tumora sa hipoksičnim regijama ili tumora sa visokim angiogenim potencijalom.

7. LITERATURA

Abdalla Maher Y. Glutathione as Potential Target for Cancer Therapy; More or Less is Good? *Jordan Journal of Biological Sciences* 2011; 4(3):119-124.

Abolhoda A, Wilson AE, Ross H et al. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3352–3356.

Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-1326.

Aguilera A, Gómez-González B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 2008; 9(3):204-217.

Altenberg GA, Deitmer JW, Glass DC. P-glycoprotein associated Cl⁻ currents are activated by cell swelling but do not contribute to cell volume regulation. *Cancer Research* 1994; 54:618-622.

Andjelkovic T, Pesic M, Bankovic J, Tanic N, Markovic ID, Ruzdijic S. Synergistic effects of the purine analog sulfinosine and curcumin on the multidrug resistant human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R). *Cancer Biol Ther* 2008; 7(7):1024-1032.

Avery-Kiejda A Kelly, Zhang Dong Xu, Adams J Luke et al. Small Molecular Weight Variants of p53 Are Expressed in Human Melanoma Cells and Are Induced by the DNA-Damaging Agent Cisplatin. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1659-1668.

Awasthi VD, Garcia D, Goins BA, Phillips WT. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 253(1–2):121–132.

Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoSOne* 2011; 6(10):e26012. Epub 2011 Oct 10.

Beck WT, Morgan SE, Mo YY, Bhat UG. Tumor cell resistance to DNA topoisomerase II inhibitors: new developments. *Drug Resist Updat* 1999; 2:382-389.

Berger W, Setinek U, Hollaus P, Zidek T, Steiner E, Elbling L, Cantonati H, Attems J, Gsur A and Micksche M. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131:355-363.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11:127-152.

Bhushan A, Abramson R, Chiu JF, Tritton TR. Expression of c-fos in human and murine multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol* 1992; 42:69-74.

Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; 6:611–622.

Blagosklonny MV. Targeting cancer cells by exploiting their resistance. *Trends Mol Med* 2003; 9:307–312.

Borowski E, Bontemps-Gracz MM and Piwkowska A. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol* 2005; 52:609-627.

Bosch I, Croop J. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288:F37-F54.

Bosch S, Siavoshian S, Jacquot C, Tomasoni C, Dabouis G et al. Correlation between multidrug resistance and the degree of differentiation of non-small-cell bronchopulmonary carcinoma (NSCLC) in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 1997; 17:4595–4598.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106(3):761-71.

Bralten Linda BC and Pim J French. Genetic Alterations in Glioma. *Cancers* 2011; 3:1129-1140.

Brambilla E and Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *European Respiratory Journal* 2009; 33(6):1485–1497.

Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Negoescu A, Brambilla C. P53 mutant immunophenotype and degranulation of p53 transcription pathway (Bcl2, bax and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1609-1618.

Bréchet JM, Hurbain I, Fajac A, Daty N, Bernaudin JF. Different pattern of MRP localization in ciliated and basal cells from human bronchial epithelium. *J Histochem Cytochem* 1998; 46(4):513-7.

Brito DA, Yang Z and Rieder CL. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *J Cell Biol* 2008; 182:623-629.

Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, Prados M, Scott J, Forsyth P, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res* 2002; 62:6205–6210.

Chang CY, Shen CC, Su HL, Chen CJ. Gefitinib induces apoptosis in human glioma cells by targeting Bad phosphorylation. *J Neurooncol* 2011; 105(3):507-522.

Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer* 2011; 71:3-10.

Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991; 66(1):85-94.

Chaudiere, J. and Tappel, A.L. Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Arch Biochem Biophys* 1983; 226: 448-457.

Chen Q, William JI, Anderson M, Kinney WK, Zasloff M. The angiostatic sterol squalamine is a calmodulin chaperone. *Clin Cancer Res* 1999; 5:3768s.

Chhikara BS, Misra SK, Battarcharya S. CNT loading into cationic cholesterol suspensions show improved DNA binding and serum stability and ability to internalize into cancer cells. *Nanotechnology* 2012; 23(6):065101.

Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(2): 192–208.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81:505-512.

Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* 2005; 5:30.

Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:910-917.

Cnubben NH et al. Metabolism of ATP-Binding Cassette Drug Transporter Inhibitors: Complicating Factor for Multidrug Resistance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005; 1:219–232.

Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *EXS* 2006; 96:321-49.

Crabtree GW, Finch RA, Vasquez KM. Cysteine and glutathione competition for adduct formation with 2-amino-9-(β -D-ribofuranosyl)purine-6-sulfonamide (sulfinosine, fin) modulates therapeutic efficacy. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1989; 30:597.

Cripe LD, Li X, Litzow M, Paietta E, Rowe JM, Luger S & Tallman M. A randomized placebo-controlled, double blind trial of the MDR modulator, zosuquidar, during conventional induction and post-remission therapy for pts >60 years of age with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (HR-MDS): ECOG 3999. *Blood* 2006; 108:423a.

Dačević M, Isaković A, Podolski-Renić A, Isaković AM, Stanković T, Milošević Z, Rakić L, Ruždijić S, Pešić M. Purine nucleoside analog--sulfinosine modulates diverse mechanisms of cancer progression in multi-drug resistant cancer cell lines. *PLoSOne* 2013; 8(1):e54044.

Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116(2):205-129.

David G Breckenridge, Marc Germain, Jaigi P Mathai, Mai Nguyen and Gordon C Shore. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003; 22:8608–8618.

Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, Brambilla E. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999; 188:369-377.

Dewson G, Kratina T, Sim HW, Puthalakath H, Adams JM et al. To trigger apoptosis Bak exposes its BH3 domain and homo-dimerizes via BH3: groove interactions. *Mol Cell* 2008; 30:369–380.

Dunne G, Breen L, Collins DM, Roche S, Clynes M et al. Modulation of P-gp expression by lapatinib. *Invest New Drugs* 2011; 29:1284–1293.

Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16(6):663-669.

Efferth T. The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr Mol Med* 2001; 1:45-65

Eimer S, Belaud-Rotureau MA, Airiau K, Jeanneteau M, Laharanne E et al. Autophagy inhibition cooperates with erlotinib to induce glioblastoma cell death. *Cancer Biol Ther* 2011; 11:1017–1027.

Elfarra AA, Hwang IY, Ander MW. Drug latentiation by cysteine conjugate β -lyase. Formation of 6-mercaptapurine by the renal metabolism of S-(6-puriny)-L-cysteine. *FASEB J* 1988; 2:4922.

- Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Human Mutation* 2003; 22(3):183–198.
- Ernest S, Bello-Reuss E. Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2306-2313.
- Ernst R, Kueppers P, Stindt J, Kuchler K and Schmitt L. Multidrug efflux pumps: substrate selection in ATPbinding cassette multidrug efflux pumps – first come, first served? *FEBS J* 2010; 277:540–549.
- Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, Distefano M, Filippetti F, Martinelli E, Ferrandina G, Gallo D, Ranelletti FO, Scambia G. Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. *Mol Pharmacol* 2003; 64:51–58.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25(4):581–611.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239–247.
- Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:147-156.
- Forbes SA, Bhamra G, Bamford S et al. The catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC). *Current Protocols in Human Genetics* 2008; 57:10.11.1–10.11.26.
- Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM and Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 2004; 5(4):317–328.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323(6089):643-646.
- Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, Basolo F, Bevilacqua G. Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1995; 71:1003-1007.
- Fujitaki JM, Nord LD, Willis RC. Cellular metabolism of the antitumor nucleoside, sulfinosine, 2-amino-9-(β -D-ribofuranosyl)purine-6-sulfonamide. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1989; 30:596.
- Furnari B Frank, Fenton Tim, Bachoo M. Robert et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; 21:2683-2710.
- Galmarini CM. Sagopilone, a microtubule stabilizer for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Invest Drugs* 2009; 10:1359-1371.

Ganesaratnam K, Balendiran, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Function* 2004; 22(6):343-352.

Gazdar AF and Minna JD. Deregulated EGFR signaling during lung cancer progression: mutations, amplicons, and autocrine loops. *Cancer Prevention Research* 2008; 1(3):156–160.

Gealy R, Zhang L, Siegfried JM, Luketich JD and Keohavong P. Comparison of mutations in the p53 and K-ras genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1999; 8(4):297–302.

Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, Civitareale P, Ciriolo MR. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 1998; 12(6):479-486.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(3):178-94.

Giannini C, Burger PC, Berkey BA, Cairncross JG, Jenkins RB, Mehta M, Curran WJ, Aldape K. Anaplastic oligodendroglial tumors: Refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in intergroup radiation therapy oncology group trial 9402. *Brain Pathol* 2008; 18:360-369.

Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81(2):116-124.

Goldstein LJ. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* 1996; 32A(6):1039-1050.

Gong J, Jaiswal R, Mathys JM, Combes V, Grau GER, Bebawy M. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. *Cancer Treatment Reviews* 2012; 38(3):226–234.

Goodman & Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics* 2007, 12th edition, McGraw-Hill.

Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 2006; 25(38):5233-5243.

Goolsby C, Paniagua M, Tallman M, Gartenhaus RB. Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukaemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 63(1):36-46.

Gottesman M, Fojo T, Bates S et al. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2:48-58.

- Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002; 53:615-627.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrugresistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:385–427.
- Gridelli C, Rossi A, Maione P. Treatment of non-small-cell lung cancer: state of the art and development of new biologic agents. *Oncogene* 2003b; 22:6629-6638.
- Gridelli C, Perrone F, Gallo C, Cigolari S, Rossi A, Piantedosi F, Barbera S, Ferrà F, Piazza E, Rosetti F, Clerici M, Bertetto O, Robbiati SF, Frontini L, Sacco C, Castiglione F, Favaretto A, Novello S, Migliorino MR, Gasparini G, Galetta D, Iaffaioli RV, Gebbia V; MILES Investigators. Chemotherapy for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: the Multicenter Italian Lung Cancer in the Elderly Study (MILES) phase III randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2003a; 95:362-372.
- Grivennikov SI, Greten FR and Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140:883–889.
- Gros P, Rajmond M, Bell J, Housman D. Cloning and characterisation of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol Cell Biol* 1988; 8(7):2770-2778.
- Gross ME, Amato RJ, Mushtaq M, Wilding G, Bublely G, Trudeau C, Rivera VM, Bedrosian C L & Agus DB. A phase 2 trial of AP23573, an mTOR inhibitor, in patients (pts) with taxane-resistant androgen-independent prostate cancer (AIPC). *EJC* 2006; 4:362.
- Hall MD et al. Synthesis, Activity and Pharmacophore Development for Isatin-B-Thiosemicarbazones with Mdr1-Selective Activity. *J Med Chem* 2009; 52:3191–3204.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-674.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
- Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353–364.
- Harada H, Nakagawa K, Iwata S, Saito M, Kumon Y et al. Restoration of wild-type p16 down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human gliomas. *Cancer Res* 1999; 59:3783–3789.
- Harrington EA, Bruce JL, Harlow E, Dyson N. pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(20):11945-11950.

Hawkins BT, Sykes DB, Miller DS. Rapid, reversible modulation of blood-brain barrier P-glycoprotein transport activity by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci* 2010; 30: 1417–1425.

Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacol Toxicol* 2005; 45(1):51.

Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 2008; 27(50):6419-33.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. Mgmt gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352:997-1003.

Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:288–293.

Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* 2000; 104:325-328.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):770-776.

Herrera RE, Makela TP, Weinberg RA. TGF β -induced growth inhibition in primary fibroblasts requires the retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell* 1996; 7:1335-1342.

Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 1992; 17(1):18–21.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn Jr. PA et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(20):3798–3807.

Horn L and Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(26):4232–4235.

Horn L, Sandler AB. Emerging data with antiangiogenic therapies in early and advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009; 10:S7–16.

Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 1997; 54S:1–7.

Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307:720–728.

Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci.* 1992 Nov; 17(11):463-468.

Ismael Halabi-Cabezon, Johannes Huelsenbeck, Martin May, Markus Ladwein et al. Prevention of the cytopathic effect induced by *Clostridium difficile* Toxin B by active Rac1. *FEBS Letters* 2008; 582(27):3751-3756.

James MF, Edward PB, Ira P, Michael MG and Hait WN. Cellular and Biochemical Characterization of Thioxanthenes for Reversal of Multidrug Resistance in Human and Murine Cell Lines. *Cancer Research* 1990; 50:1748-1756.

Jansen M, de Witt Hamer PC, Witmer AN, Troost D, van Noorden CJ. Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas. *Brain Res Rev* 2004; 45:143–163.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 1996; 56:988-994.

Jin WS, Kong ZL, Shen ZF, Jin YZ, Zhang WK et al. Regulation of hypoxia inducible factor-1 α expression by the alteration of redox status in HepG2 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 61.

Johnson G, Vaillancourt RR. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6:230-238.

Johnson JL, Pillai S, Chellappan SP. Genetic and biochemical alterations in non-small cell lung cancer. *Biochem Res Int* 2012; 2012:940405.

Kang C, Avery L. To be or not to be, the level of autophagy is the question: dual roles of autophagy in the survival response to starvation. *Autophagy* 2008; 4(1):82-84.

Kang J-G, Yun J, Kim D-H, Chung K-S, Fujioka S, Kim J-I, Dae H-W, Yoshida S, Takatsuto S, Song P-S et al. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell* 2001; 105: 625–636.

Kapitanović S, Radošević S, Slade N, Kapitanović M, Anđelinović Š, Ferenčić Ž, Tavassoli M, Spaventi Š, Pavelić K, Spaventi R. Expression of erbB-3 protein in colorectal adenocarcinoma: correlation with poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126:205-211.

Karp, Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 6th Edition.

Katayama R, Khan TM, Benes C et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2011; 108(18):7535–7540.

Keele Jr BB, McCord JM, Fridovich I. Further characterization of bovine superoxide dismutase and its isolation from bovine heart. Biol Chem. 1971; 246(9):2875-2880.

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26:239–257.

King M, Su W, Chang A, Zuckerman A, Pasternak GW. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. Nat Neurosci 2001; 4:268-274.

Köhler C, Sten O, Boris Z. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. J Immunol Methods 2002; 265:97-111.

Koivunen JP, Mermel K Zejnnullahu C et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. Clinical Cancer Research 2008; 14(13):4275–4283.

Koomagi R, Volm M. Expression of fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance. Int J Cancer 1999; 84:239-243.

Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. Eur J Pharm Sci 2000; 11(4):265-283.

Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. J Biol Chem 2004; 279:24218-24225.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ 2005; 12(2):1463-1467.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev 2007; 87(1):99-163.

Kumar M, Pathak D, Kriplani A, Ammini AC, Talwar P, Dada R. Nucleotide variations in mitochondrial DNA and supra-physiological ROS levels in cytogenetically normal cases of premature ovarian insufficiency. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 282(6):695-705.

LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008; 27(48):6252-6275.

LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17(25):3247-3259.

Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, Reiner PB. β -Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* 2001; 76:1121-1128.

Lantuejoul S, Brambilla E. Prognostic biomarkers in non-small-cell lung carcinoma. *Curr Diagn Pathol* 2006; 12:418-428.

Lay JD, Hong CC, Huang JS, Yang YY, Pao CY, Liu CH, Lai YP, Lai GM, Cheng AL, Su IJ, Chuang SE. Sulfasalazine suppresses drug resistance and invasiveness of lung adenocarcinoma cells expressing AXL. *Cancer Res* 2007; 67:3878-3887.

Lazo JS, Reese CE, Vogt A, Vollmer LL, Kitchens CA, Gunther E et al. Identifying a Resistance Determinant for the Antimitotic Natural Products Disorazole C1 and A1. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 906-911.

Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD et al. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Research* 2005; 65(12):5076–5083.

Lee CH. Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters. *Methods Mol Biol* 2010; 596:325–340.

Lepper ER, Baker SD, Permenter M, Ries N, van Schaik RH, Schenk PW, Price DK, Ahn D, Smith NF, Cusatis G et al. Effect of common CYP3A4 and CYP3A5 variants on the pharmacokinetics of the cytochrome P450 3A phenotyping probe midazolam in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7398–7404.

Levin VA, Leibel SA, Gutin PH. Neoplasms of the central nervous system. U: *Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 2100-2160.

Levine B and Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132:27–42.

Li L, Borodyansky L, Yang Y. Genomic instability en route to and from cancer stem cells. *Cell Cycle* 2009; 8(7):1000-2.

Li L and Ross AH. Why is PTEN an important tumor suppressor? *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; 102(6):1368–1374.

Li G, Xu Y, Guan D, Liu Z, Liu DX. HSP70 protein promotes survival of C6 and U87 glioma cells by inhibition of ATF5 degradation. *J Biol Chem* 2011; 286:20251–20259.

Lind DS, Kontaridis MI, Edwards PD, Josephs MD, Moldawer LL & Copeland EM. Nitric oxide contributes to adriamycin's antitumour effects. *J Surg Res* 1997; 69:283–287.

Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 1999; 18(55):7873-7882.

Liu W, Zhou Y, Reske SN and Shen C. PTEN mutation: many birds with one stone in tumorigenesis. *Anticancer Research* 2008; 28(6):3613–3619.

Liu XD, Liu GQ. P glycoprotein regulated transport of glutamate at blood brain barrier. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22:111-116.

Liu Y, Huang L, Hoffman T, Gosland M, Vore M. MDR1 substrates/modulators protect against beta-estradiol-17beta-D-glucuronide cholestasis in rat liver. *Cancer Res* 1996; 56:4992-4997.

L'homme RF, Dijkema T, Ven AJ, Burger DM. Brief report: enzyme inducers reduce elimination half-life after a single dose of nevirapine in healthy women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 43:193–196.

Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer* 1996; 32A(6):945-957.

Loe DW, Stewart RK, Massey TE, Deeley RG, Cole SP. ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Mol Pharmacol* 1997; 51:1034-1041.

Lopes RB, Gangeswaran R, McNeish IA, Wang Y, Lemoine NR. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer* 2007; 120:2344–2352.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. World Health Organization Classification of tumours of the central nervous system. Lyon, France: IARC Press, 2007.

Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 2006; 24(2):185-187.

Main AE Penelope, Angley T Many, O'Doherty E Catherine, Thomas Philip and Fenech Michael. The potential role of the antioxidant and detoxification properties of glutathione in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition & Metabolism* 2012; 9:35.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:741–752.

Mao L. Molecular abnormalities in lung carcinogenesis and their potential clinical implications. *Lung Cancer* 2001; 34(2):S27–S34.

Marchetti A, Martella C, Felicioni L et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(4):857–865.

Marie JP, Zhou DC, Gurbuxani S, Legrand O, Zittoun R. MDR1/P-glycoprotein in haematological neoplasms. *Eur J Cancer* 1996; 32A(6):1034-1038.

Marsit CJ, Zheng S, Aldape K et al. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human Pathology* 2005; 36(7):768–776.

Mathew R, Karantza-Wadsworth V and White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:961–967.

Mayer R, Kartenbeck J, Büchler M, Jedlitschky G, Leier I, Keppler D. Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol* 1995; 131(1):137-150.

Mayur YC, Peters GC, Prasad W, Lemo C, Sathish NK. Design of new drug molecules to be used in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9:298-306.

Mazzone M and Comoglio PM. The Met pathway: master switch and drug target in cancer progression. *FASEB Journal* 2006; 20(10):1611–1621.

Meltem Baykara, Ugur Coskun, Veli Berk, Metin Ozkan, Muhammet Ali Kaplan, Mustafa Benekli, Halit Karaca, Mevlude Inanc, Abdurrahman Isikdogan, Alper Sevinc, Emin Tamer Elkiran, Umut Demirci, Suleyman Buyukberber. Gemcitabine Plus Paclitaxel as Second-line Chemotherapy in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012; 13(10):5119-5124.

Menon SG, Goswami PC. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 2007; 26: 1101–1109.

Milinkovic Vedrana, Bankovic Jasna, Rakic Miodrag, Milosevic Nebojsa, Bankovic Tijana, Jokovic Milos, Milosevic Zorica, Skender-Gazibara Milica, Podolski-Renic Ana, Pesic Milica, Ruzdijic Sabera, Tanic Nikola. Genomic instability and p53 alterations in patients with malignant glioma. *Experimental and Molecular Pathology* 2012; 93(2):200–206.

Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; 385:353–357.

Minn AJ, Boise LH and Thompson CB. Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J Biol Chem* 1996; 271:6306-6312.

Miraglia M, De Santis B, Minardi V, Debegnach F and Brera C. The role of sampling in mycotoxin contamination: An holistic view. *Food Add Contam* 2005; 22(1): 31-36.

Mogi A and Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011; ID583929:9.

Mohr LC, Rodgers JK, Silvestri GA. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and the risk of lung cancer. *Anticancer Res* 2003; 23(3A):2111-2124.

Muthuswamy SK, Gilman M and Brugge JS. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Molecular and Cellular Biology* 1999; 19(10):6845–6857.

Nardinocchi L, Puca R, Sacchi A, D’Orazi G. Inhibition of HIF-1 α activity by homeodomain-interacting protein kinase-2 correlates with sensitization of chemoresistant cells to undergo apoptosis. *Mol Cancer* 2009; 8:1.

Newman SP, Foster PA, Stenge CI, Day JM, Ho YT, Judde JG, Lassalle M, Prevost G, Leese MP, Potter BVL et al. STX140 Is Efficacious In vitro and In vivo in Taxane-Resistant Breast Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14(2):597-606.

Nies AT. The role of membrane transporters in drug delivery to brain tumors. *Cancer Lett* 2007; 254:11–29.

O’Driscoll L, Daly C, Saleh M, Clynes M. The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology* 1993; 12:289–314.

O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ Jr, Kohn KW. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997; 57(19):4285-4300.

Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B and Hynes NE. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18(9):5042–5051.

Olivero M, M. Rizzo R Madeddu et al. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *British Journal of Cancer* 1996; 74(12):1862–1868.

Oxnard GR, Arcila ME, Chmielecki J, Ladanyi M, Miller VA and Pao W. New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosinekinase inhibitors in lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2011; 17(17):5530–5537.

Pao W, Miller V, Zakowski M et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101(36):13306–13311.

Palmeira A, Sousa E et al. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem* 2012; 19(13):1946-2025.

Pesic M, Markovic JZ, Jankovic D, Kanazir S, Markovic ID et al. Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line in vitro by anticancer drugs. *J Chemother* 2006; 18:66-73.

Pesić M, Podolski A, Rakić L, Ruzdijić S. Purine analogs sensitize the multidrug resistant cell line (NCI-H460/R) to doxorubicin and stimulate the cell growth inhibitory effect of verapamil. *Invest New Drugs* 2010; 28(4):482-492.

Pesić M, Andjelković T, Banković J, Marković ID, Rakić L, Ruzdijić S. Sulfinosine enhances doxorubicin efficacy through synergism and by reversing multidrug resistance in the human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R). *Invest New Drugs* 2009; 27(2):99-110.

Petty RD, Nicolson MC, Kerr KM, Collie-Duguid E, Murray GI. Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: from molecular mechanisms to clinical application. *Clin Cancer Res* 2004; 10(10):3237-3248.

Podolski-Renić A, Anđelković T, Banković J, Tanić N, Ruždijić S, Pešić M. The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. *Biomed Pharmacother* 2011; 65(5):345-353.

Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human betaactin cDNA. *Nucleic Acids Res* 1984; 12:1687-1696.

Presta M, Belleri M, Vacca A, Ribatti D. Anti-angiogenic activity of the purine analog 6-thioguanine. *Leukemia* 2002; 16:1490-1499.

Pronzato P & Rondini M. First line chemotherapy of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology* 2006; 17(5): v165–v168.

Quezada C, Garrido W, Oyarzún C, Fernández K, Segura R, Melo R, Casanello P, Sobrevia L, San Martín R. 5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *J Cell Physiol* 2011; 228(3):602-608.

Raffo AJ, Perlkman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS and Buttyan R. Overexpression of Bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 1995; 55:4438-4445.

Rajnish B, Hongtao Y. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 2004; 23:2016–2027.

Ramalingam S, Belani C. Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. *Oncologist* 2008; 13(1):5-13.

Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6(9):733-743.

Revankar GR, Hanna NB, Imamura N, Lewis AF, Larson SB, et al. Synthesis and in vivo antitumor activity of 2-amino-9H-purine-6-sulfenamide, -sulfonamide, and -sulfonamide and related purine ribonucleosides. *J Med Chem* 1990; 33: 121–128.

Riley TA, Finch RA, Vasquez KM. Isolation, identification, synthesis and therapeutic evaluation of selected metabolites of sulfinosine, a novel purine nucleoside analog active against thiopurine refractory experimental leukemia. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1989; 30:599.

Robert J and Jarry C. Multidrug resistance reversal agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 2003; 46:4805–4817.

Roberts P, Chumas PD, Picton S et al. A review of the cytogenetics of 58 pediatric brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 131:1-12.

Roy S, Kenny E, Kennedy S, Larkin A, Ballot J, Perez de Villarreal M, Crown J and O'Driscoll L. MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 mRNA and Protein Expression in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Research* 2007; 27:1325-1330.

Rowinsky EK. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annual Review of Medicine* 2004; 55:433-457.

Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC et al. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clinical Cancer Research* 2009; 15(18):5646-5661.

Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000; 108:567-574.

Saijo N. Recent trends in the treatment of advanced lung cancer. *Cancer Sci* 2006; 97:448-452.

Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Can Res* 2009; 15(18):5626-5645.

Sanfilippo O., Ronchi E., de Marco C., di Fronzo G. and Silvestrini R. Expression of P-glycoprotein in breast cancer tissue and *in vitro* resistance to doxorubicin and vincristine. *Europ J Cancer* 1991; 27:155-158.

Sathornsumetee S, Reardon D, Desjardins A et al. Molecular Target Therapy for malignant glioma. *Cancer* 2007; 110:13-24.

Saville MW, Lietzau J, Pluda JM et al. Treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma with paclitaxel. *Lancet* 1995; 346:26-28.

Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004; 432(7015):294-297.

Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Müller M, Postma DS, Timens W, van der Valk P, de Vries EG, Scheper RJ. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol* 2002; 55(5):332-339.

Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997; 8(3):161-170.

Seeger, M.A. and Van Veen, H.W. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794:725-737.

Shabbits JA, Hu Y and Mayer LD. Tumor chemosensitisation strategies based on apoptosis manipulation. *Mol Cance Ther* 2003; 2:805-813.

Sharom FJ. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol* 1997; 160:161-175.

Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9(1):105-127.

Shen H, Kauvar L, Tew KD. Importance of glutathione and associated enzymes in drug response. *Oncol Res* 1997; 9(6-7):295-302.

Shen J, Curtis C, Tavaré S, Tower J. A screen of apoptosis and senescence regulatory genes for life span effects when over-expressed in *Drosophila*. *Impact Aging* 2009; 1(2):191-211.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274(5293):1672–1677.

Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2:103-112.

Shigematsu H and Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *International Journal of Cancer* 2006; 118(2):257–262.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, and Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843–845.

Siegfried JM, Weissfeld LA, Luketich JD, Weyant RJ, Gubish CT and Landreneau RJ. The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Annals of Thoracic Surgery* 1998; 66(6):1915–1918.

Simić M.G. and Taylor K.A. Introduction to peroxydation and antioxidation mechanisms, *Oxygen Radicals in Biology and medicine*. New York London Plenum press 1988; 1:90.

Sinha S. and Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 2008; 27 (1):S137–S148.

Skehan Philip, Storeng Ritsa, Scudiero Dominic, Monks Anne, McMahon James, Vistica David, Warren T. Jonathan, Bokesch Heidi, Kenney Susan and Boyd R. Michael New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(13):1107-1112.

Slovak ML, Hoeltge GA, Dalton WS, Trent JM. Pharmacological and biological evidence for differing mechanisms of doxorubicin resistance in two human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988; 48(10):2793–2797.

Sokoloski JA, Sartorelli AC. Inhibition of mannose incorporation into glycoproteins and dolichol-linked intermediates of Sarcoma 180 cells by 6- methylmercaptapurine ribonucleoside. *Int J Cancer* 1987; 39:764-768.

Somerville L, Krynetski EY, Krynetskaia NF, Beger RD, Zhang W, Marhefka CA, Evans WE, Kriwacki RW. Structure and dynamics of thioguanine-modified duplex DNA. *J Biol Chem* 2003; 278(2):1005-1111.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95(1):29-39.

Staud F, Pavek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:720-725.

Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry* 2000; 65(1):95-106.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352:987-996.

Sun S, Schiller JH, and Gazdar AF. Lung cancer in never smokers - a different disease. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7(10):778–790.

Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(3):219-234.

Taylor R, Cullen S and Martin S. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:231–241.

Takara K, Sakaeda T and Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12:273–286.

Tammemagi MC, McLaughlin JR and Bull SB. Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1999; 8(7):625–634.

Teicher A Beverly. Next generation topoisomerase I inhibitors: Rationale and biomarker strategies. *Biochemical Pharamcology Volume* 2008; 75(6):1262–1271.

Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 1994; 54(16):4313-4320.

Townsend DM and Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22(47):7369-7375.

Trimarchi JM and Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:11–20.

Tritton TR, Yee G. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science* 1982; 217:248-250.

Tsujimoto Y, Finger L, Yunis J. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226:1097–1099.

van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006; 24(18):2715-22.

Van Herwaarden AE, Wagenaar E, Merino G et al. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer protein secretes riboflavin (vitamin-B2) into milk. *Mol Cell Biol* 2007; 27:1247-1253.

Varagić, V. M., Milošević, M. P. *Farmakologija, Elit – Medica, Beograd* 2004.

Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W, Kunert-Keil C, Walker LC, Warzok RW. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* 2002; 12:535-541.

Vogt T, Hafner C, Bross K et al. Antiangiogenic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and metronomic trofosfamide in patients with advanced malignant vascular tumors. *Cancer* 2003; 98:2251–2256.

Voss V, Senft C, Lang V, Ronellenfitch MW, Steinbach JP, et al. The pan-Bcl-2 inhibitor (2)-gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 1002–1016.

Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, Das K, Eckelman BP, Shin H, Elliott LO et al. Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: Implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochem J* 2005; 385:11-20.

Underiner TL, Ruggeri B, Gingrich DE. Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Curr Med Chem* 2004; 11:731–745.

Wade M and Wahl GM. c-myc, genome instability, and tumorigenesis: the devil is in the details. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 302:169–203.

Walbert T, Gilbert MR, Groves MD, Pudukallu VK, Yung WK, Conrad CA, Bobustuc GC, Colman H, Hsu SH, Bekele BN, Qiao W, Levin VA. Combination of 6-thioguanine, capecitabine, and celecoxib with temozolomide or lomustine for recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol* 2011; 102(2):273-280.

Wang GJ, Volkow ND, Fowler JS, Cervany P, Hitzemann RJ, Pappas NR, Wong CT, Felder C. Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. *Life Sci* 1999; 64:775–784.

Wei HC, Rollins J, Fabian L, Hayes M, Polevoy G, Bazinet C, Brill JA. Depletion of plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ reveals essential roles for phosphoinositides in flagellar biogenesis. *J Cell Sci* 2008; 121(7):1076-1084.

Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49(14):3713-3721.

Wessely Rainer, Schömig Albert, Kastrati Adnan. Sirolimus and Paclitaxel on Polymer-Based Drug-Eluting Stents. Similar But Different *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 47(4):708–714.

White E and DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5308–5316.

Wolf DC, Horwitz SB. P-glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. *Int J Cancer* 1992; 52:141-146.

Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the “primer-dropping” method. *Anal Biochem* 1994; 223: 251–258.

Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30:87.

Xia W., R. J. Mullin, B. R. Keith et al. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* 2002; 21(41):6255–6263.

Yang HW, Liu HY, Liu X, Zhang DM, Liu XD, Wang GJ, et al. Increased P-glycoprotein function and level after long-term exposure of four antiepileptic drugs to rat brain microvascular endothelial cells in vitro. *Neurosci Lett* 2008; 434:299–303.

Yang P, Ebbert JO, Sun Z and Weinshilboum RM. A role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. *J Clin Oncol* 2006; 24:1761–1769.

Yuan A, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT, Yang PC. Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2000; 89:475-483.

Yusuf RZ, Duan Z, Lamendola DE, Penson RT, Seiden MV. Paclitaxel Resistance: Molecular Mechanisms and Pharmacologic Manipulation. *Current Cancer Drug Targets* 2003; 3(1):1-19.

Zacharatos P, Kotsinas A, Tsantoulis P, Evangelou K, Kletsas D, Asimacopoulos PJ, Doussis-Anagnostopouou I, Pezzella F, Gatter K, Papavassiliou AG, Kitas C, Gorgoulis VG. Relationship of the K-ras/c-mos expression patterns with angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Mol Med* 2001; 7(9):590-597.

Zaman GJ, Versantvoort CH, Smit JJ, Eijdemans EW, de Haas M, Smith AJ, Broxterman HJ, Mulder NH, de Vries EG, Baas F, et al. Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53(8):1747-1750.

Zeng Z, Chen T, Li X, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 800-808.

Zhu CQ, Shih W, Ling CH and Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 2006; 59:790-800.

Zimmerman CK, Green RD. How cell die: Apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 108:99-103.

Žlender V. Apoptosis – programmed cell death. *Arh Hig Rada Toksikol* 2003; 54:267-274.

Biografija

Mirjana Dačević (devojačko Božić) je rođena 28. novembra 1971. godine u Prištini. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Arandjelovcu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1990 godine, a diplomirala 1996. godine sa prosečnom ocenom osam šezdeset i devet (8,69). U toku studija radi volonterski u Laboratoriji za transporte, Instituta za istraživanje i razvoj ICN Jugoslavija.

Od početka profesionalnog angažovanja dr Mirjana Dačević je uključena u sve problematike sa kojima se istraživački rad u laboratoriji suočava. Magistarsku tezu pod nazivom "Mehanizmi preuzimanja prekursora nukleinskih kiselina u C6 ćelije glioma pacova *in vitro*" odbranila je jula 2001 pod mentorstvom dr Zorana Redžića. 2002. godine je dobila nagradu Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj za mlade doktore i magistre nauka.

Dr Mirjana Dačević je od oktobra 1997. godine zaposlena u Laboratoriji za neurotransporte Instituta ICN Galenika. Od 2003. godine Mirjana Dačević radi na poziciji višeg stručnog saradnika za monitoring i kliničku dokumentaciju u Službi za medicinsko - registracione poslove u Galenici, a od 2008. je rukovodilac te službe i lice odgovorno za klinička ispitivanja. Na ovim poslovima dr Mirjana Dačević se bavi stručno regulatornim poslovima, kao i planiranjem, organizacijom i sprovođenjem kliničkih studija i farmakovigilancom. Za svo to vreme Mirjana Dačević se aktivno bavila i istraživačkim radom. Dr Dačević je naučno zvanje istraživač saradnik stekla u martu 2009. godine na Institutu za medicinska istraživanja.

U periodu od 1997-1998 je učestvovala na projektu sa prof. dr Genadijem Buznjikovicim u okviru međunarodnog Rusko-Jugoslovenskog projekta "Neurotransmiteri u embriogenezi" u Institutu za biologiju mora, Kotor, Crna Gora. U periodu od 2008-2010 kao istraživač saradnik je angažovana na projektu Ministarstva za nauku br. 143009 "Identifikacija specifičnih gena za terapiju kancera". Trenutno je angažovana kao istraživač saradnik na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj br. III 41025 "Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetski balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja" i br. III 41012 „Interakcije ksenobiotika i uticaj na sisteme u biomedicini“. Dr Mirjana Dačević je na međunarodnim stručnim skupovima iz oblasti

ispitivanja bioekvivalencije lekova i farmakovigilance više puta učestvovala kao predavač po pozivu i član programskog odbora.

Dr Mirjana Dačević je član društva za Neuronauke od 1998. godine, član Farmakoterapijske sekcije Srpskog lekarskog društva od 2004 i Association of Clinical Research Professionals od 2008. godine.

Autor je većeg broja publikacija od kojih je 11 publikovano u časopisima indeksiranim u Current contents-u (CC).

Dr Dačević je udata i majka troje dece.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Мирјана Дачевић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога пуринског нуклеозидног аналога – сулфинозина у инхибицији раста малигних ћелија неосетљивих на дејство хемиотерапеутика

- 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, 10.04.2013

Мирјана Дачевић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Мирјана Дачевић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Улога пуринског нуклеозидног аналога – сулфинозина у инхибицији
раста малигнух ћелија неосетљивих на дејство хемиотерапеутика

Ментор Проф др Александра Исаковић

Коментор др Милица Пешић, научни сарадник

Потписани Мирјана Дачевић

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, 10.04.2013

Мирјана Дачевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Улога пуринског нуклеозидног аналога – сулфинозина у инхибицији раста малигних ћелија неосетљивих на дејство хемиотерапеутика

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, 10. 04. 2013

Mujjana Zarekovic