



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КЛИНИЧКА МЕДИЦИНА

ДЕЈСТВО МЕТФОРМИНА И НИТРОГЛИЦЕРИНА
СА 2-ДЕОКСИ-*D*-ГЛУКОЗОМ И КОФЕИНОМ НА
ОДАБРАНИМ ЋЕЛИЈСКИМ КУЛТУРАМА

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:
Проф. др Љиљана Андријевић
Проф. др Јасна Михаиловић

Кандидат:
Весна Зельковић

Нови Сад, 2019. године

Испитивања која су урађена за време израде доктората су делимично финансирана из средстава дугорочног пројекта од значаја за науку и технолошки развој АП Војводине-научног пројекта број 142-451-2413 / 2018-03, (у току је трећа фаза пројектног циклуса 2016-2019. године) под називом: „Ефикасна, селективна, нетоксична антитуморска терапија наноинкапсулацијом, циљаним погађањем антиканцерских мета и РЕТ/СТ праћењем болесника”, Медицински факултет Нови Сад из Новог Сада (финансиран од АП Војводине, Покрајински секретаријат за науку и технолошки развој)

ЗАХВАЛНИЦА

Докторска теза је урађена у Служба за патолошко–анатомску и лабораторијску дијагностику, Института за онкологију Војводине, Сремска Каменица, у периоду од јануара 2017. до фебруара 2018, као и у Научном институту за ветеринарство „Нови Сад“, на Одељењу за репродукцију.

Велику захвалност дугујем својим менторима, **проф. др Љиљани Андријевић** која ми је пружила велику помоћ у сваком сегменту израде овог рада, делећи са мном своје идеје, искуство и знање и **проф. др Јасни Михаиловић** на свеобухватној помоћи приликом израде и писања докторске дисертације као и радова који су припремљени за публикување.

Захваљујем се **проф. др Јовану Поповићу** на вишегодишњој сарадњи и стрпљењу, као и на свим корисним саветима којим је у тешким и компликованим ситуацијама израда и уобличавање докторског рада успео је да ствари учини једноставнијим.

Др Вишњи Богдановић и **Славици Шолајић** дугујем посебну захвалност јер су ми омогућиле да применим и надоградим стечена знања из области научноистраживачког рада.

Не могу заборавити ни помоћ академика **проф. др Бранислава Гудурића**, **проф. др Бранислава Перина**, **проф. др Ђорђа Поважана**, **проф. др Мирне Ђурић** и **доц. др Мирјане Милошевић Тошић**.

Захваљујем се **др Александару Миловановићу** са Научног института за ветеринарство из Новог Сада, **др Славку Мојсиловићу** са Института за медицинска истраживања из Београда који су несебично поделили своја знања и искуства из области проточне цитометрије, као и сарадницима и колегама из лабораторије за патолошко-анатомску дијагностику Института за Онкологију као и сарадницима из лабораторије за репродукцију Научног института за ветерину.

На крају, највећу захвалност дугујем својим родитељима, на подршци и на огромном стрпљењу и љубави.

Овај рад посвећујем кћерки **Искри** која свему даје смисао.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Иденфикациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	МОНОГРАФСКА ДОКУМЕНТАЦИЈА
Тип записа: ТЗ	ТЕКСТУАЛНИ ШТАМПАНИ МАТЕРИЈАЛ
Врста рада (dipl., mag., dokt.): ВР	ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА
Име и презиме аутора: АУ	Весна Зељковић
Ментор (титула, име, презиме, звање): МН	Проф.др Љиљана Андријевић, редовни професор, Медицински факултет Проф.др Јасна Михаиловић, редовни професор, Медицински факултет
Наслов рада: НР	ДЕЈСТВО МЕТФОРМИНА И НИТРОГЛИЦЕРИНА СА 2-ДЕОКСИ- <i>D</i> -ГЛУКОЗОМ И КОФЕИНОМ НА ОДАБРАНИМ ЂЕЛИЈСКИМ КУЛТУРАМА
Језик публикације: ЈП	СРПСКИ (Ћирилица)
Језик извода: ЈИ	срп./ енг.
Земља публикавања: ЗП	РЕПУБЛИКА СРБИЈА
Уже географско подручје: УГП	АП ВОЈВОДИНА
Година: ГО	2019
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	НОВИ САД , ХАЈДУК ВЕЉКОВА 3
Физички опис рада: ФО	(број поглавља 7 / страница 125 / слика 22 / графикона 97/ схема 2/ референци 204)
Научна област: НО	МЕДИЦИНА
Научна дисциплина: НД	МОЛЕКУЛАРНА МЕДИЦИНА

Предметна одредница, кључне речи: ПО	антинеопластични лекови; неоплазме; медицинска онкологија; Метформин; кофеин; нитроглицерин; апоптоза; деоксиглукоза; неоплазме плућа; цитотоксини
УДК	615.277.07:576.385.5
Чува се: ЧУ	У библиотеци Медицинског факултета у Новом Саду, Хајдук Вељкова 3, Нови Сад
Важна напомена: ВН	
Извод: ИЗ	<p>У овој дисертацији испитивана су антитуморска дејства антихипергликемијског лека метформина, вазодилаторног лека нитроглицерина, и комбинација ових лекова са дијагностичким средством 2-деокси-<i>D</i>-глукозом и/или радио и хемио сензибилизатором кофеином на хуманим културама аденокарцинома плућа (<i>A549</i>), колоректалног карцинома (<i>HT29</i>), аденокарцинома цервикса (<i>HeLa</i>), као и на контролној ћелијској култури нормалних фибробласта плућа (<i>MRC 5</i>). <i>In vitro</i> испитивање утицаја метформина, нитроглицерина, 2-деокси-<i>D</i>-глукозе и кофеина на пролиферацију ћелија карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>), ћелијској култури аденокарцинома плућа (<i>A549</i>) и ћелијској линији карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>). Ћелије у експоненцијалној фази раста третиране су растућим концентрацијама метформина, нитроглицерина и 2-деокси-<i>D</i>-глукозе и утврдила се дозна зависност цитотоксичног ефекта. Метформин, кофеин и 2-деокси-<i>D</i>-глукоза су утицали на смањење процента преживљавања туморских ћелија, док је применом нитроглицерина овај ефекат изостао, иако у експериментима код истовремене примене нитроглицерина и кофеина постоји пад процента преживелих ћелија. Најпотентнији ефекат је постигнут код истовремене примене метформина и кофеина, док је разлог за одсуство снажног цитотоксичног ефекта метформина и 2-деокси-<i>D</i>-глукозе код комбиноване примене молекуларни механизам деловања појединачних супстанци. Снажан пролиферативни ефекат је евидентиран применом метформина и кофеина на здравим фибробластима плућа.</p>
Датум прихватања теме од стране Сената: ДП	28. 12. 2017.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	Председник: Члан: Члан: Члан: Члан:

UNIVERSITY OF NOVI SAD**FACULTY****KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Vesna Zeljković
Mentor: MN	Ljiljana Andrijević, MD, PhD., Full professor Jasna Mihailović, MD, PhD., Full professor
Title: TI	THE ACTION OF METFORMIN AND NITROGLICERIN WITH 2-DEOXY-D-GLUCOSE AND CAFFEINE ON SELECTED CELLULAR CULTURES
Language of text: LT	Serbian (Cyrillic)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	(number of chapters 7 / pages 125 / pictures 22 / graphs 97 / tables 3 / citations 204)
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	MOLECULAR MEDICINE
Subject, Key words: SKW	Antineoplastic Agents; Neoplasms; Medical Oncology; Metformin; Caffeine; Nitroglycerin; Apoptosis; Deoxyglucose; Lung Neoplasms; Cytotoxins

UC	615.277.07:576.385.5
Holding data: HD	Library of Medical Faculty of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>In this dissertation, the anti-cancer effects of an antihyperglycaemic agent of metformin, a vasodilator drug nitroglycerin, and a combination of these drugs with a 2-deoxy-<i>D</i>-glucose diagnostic agent and / or radio and hemio sensitizer with caffeine on human cultures of adenocarcinoma of the lungs (<i>A549</i>), colorectal carcinoma (<i>HT29</i>), cervix adenocarcinoma (<i>HeLa</i>), as well as on the control cell culture of normal fibroblasts of the lungs (<i>MRC 5</i>). An <i>in vitro</i> study of the effects of metformin, nitroglycerin, 2-deoxy-<i>D</i>-glucose and caffeine on the proliferation of cervical cancer cells (<i>HeLa</i>), cell culture of the lung adenocarcinoma (<i>A549</i>), and colon cancer of the colon (<i>HT29</i>). The cells at the exponential growth stage were treated with rising concentrations of metformin, nitroglycerin and 2-deoxy-<i>D</i>-glucose, and the cytotoxic effect was determined. Metformin, caffeine, and 2-deoxy-<i>D</i>-glucose reduced the number of tumor cells, while nitroglycerin did not it could be concluded. Although there is a decrease in survival in experiments with the simultaneous administration of nitroglycerin and caffeine, the most effective effect is achieved in the simultaneous use of metformin and caffeine, while the reason for the absence of a potent cytotoxic effect of metformin and -deoxy-<i>D</i>-glucose is the molecular mechanism of the action of individual substances. The most significant effect was achieved with the simultaneous administration of metformin and caffeine to the cell culture of lung adenocarcinoma. A potent proliferative effect was recorded using metformin and 2-deoxy-<i>D</i>-glucose on healthy lung fibroblasts.</p>
Accepted on Senate on: AS	28. 12. 2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: member: member: member: member:</p>

САДРЖАЈ

1. УВОД	11
1.1. Дефиниција карцинома	11
1.2. Молекуларна основа карцинома.....	13
1.2.1. Протоонкогени	14
1.2.2. Тумор-супресорни гени	17
1.2.3. Гени који регулишу програмирану ћелијску смрт (апоптозу)	19
1.2.4. Гени који су укључени у репарацију <i>DNK</i>	19
1.3. Епидемиологија карцинома	21
1.4. Метаболизам малигне ћелије.....	27
1.5. Преглед досадашњих истраживања	28
1.6. Избор циљева истраживања	31
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	34
2.1. Циљеви истраживања.....	34
2.2. Хипотезе	34
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	35
3.1. Ћелије и ћелијске културе.....	35
3.2. Раствори и реагенси	35
3.3. Тест вијабилности	36
3.3.1. <i>DET</i> тест.....	36
3.3.2. Сулфородамин Б-тест (<i>SRB</i> есеј)	37
3.4. Одређивање параметара ћелијске смрти	38
3.4.1. Анексин В-изоцијанатни тест	38
3.5. Одређивање тумор-супресорских гена	39
3.6. Фотографисање ћелијских култура.....	40
4. РЕЗУЛТАТИ	41
4.1. Цитотоксичност метформина	41
4.1.1. Цитотоксичност метформина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>).....	41
4.1.2. Цитотоксичност метформина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (<i>A549</i>).....	43
4.1.3. Цитотоксичност метформина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>)	44
4.1.4. Цитотоксичност метформина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (<i>MRC5</i>)	45
4.2. Цитотоксичност 2-Деокси- <i>D</i> -глукозе	46
4.2.1. Цитотоксичност 2-Деокси- <i>D</i> -глукозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>)	46

4.2.2. Цитотоксичност 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (<i>A549</i>)	47
4.2.3. Цитотоксичност 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>)	48
4.2.4. Цитотоксичност 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (<i>MRC5</i>).....	49
4.3. Цитотоксичност кофеина	51
4.3.1. Цитотоксичност кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>).....	51
4.3.2. Цитотоксичност кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (<i>A549</i>).....	52
4.3.3. Цитотоксичност кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>)	53
4.3.4. Цитотоксичност кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (<i>MRC5</i>)	54
4.4. Цитотоксичност нитроглицерина.....	55
4.4.1. Цитотоксичност нитроглицерина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>)	55
4.4.2. Цитотоксичност нитроглицерина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (<i>A549</i>)	56
4.4.3. Цитотоксичност нитроглицерина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>)	58
4.4.4. Цитотоксичност нитроглицерина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (<i>MRC5</i>).....	60
4.5. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе	62
4.5.1. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>)	62
4.5.2. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (<i>A549</i>)	64
4.5.3. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>)	65
4.5.4. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (<i>MRC5</i>)	66
4.6. Цитотоксичност метформина и кофеина:.....	67
4.6.1. Цитотоксичност метформина и кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>)	67
4.6.2. Цитотоксичност метформина и кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (<i>A549</i>)	68
4.6.3. Цитотоксичност метформина и кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>)	69
4.6.4. Цитотоксичност метформина и кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (<i>MRC5</i>).....	70

4.7. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе:.....	71
4.7.1. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>)	71
4.7.2. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (<i>A549</i>)	73
4.7.3. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>)	75
4.7.4. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси- <i>D</i> -глюкозе праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (<i>MRC5</i>)	77
4.8. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина:	79
4.8.1. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (<i>HeLa</i>)	80
4.8.2. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (<i>A549</i>)	81
4.8.3. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (<i>HT29</i>).....	83
4.8.4. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина праћена <i>SRB</i> тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (<i>MRC5</i>).....	85
4.9. Апоптоза ћелија карцинома цервикса (<i>HeLa</i>) потенцирана дејством метформина	87
4.10. Експресија <i>p53</i> на ћелијама карцинома цервикса (<i>HeLa</i>) потенцирана дејством метформина	89
4.11. Апоптоза и некроза имунофлуоресцентним микроскопом	90
5. ДИСКУСИЈА	92
6. ЗАКЉУЧАК	110
7. ЛИТЕРАТУРА.....	111
О АУТОРУ	125

1. УВОД

1.1. Дефиниција карцинома

Карцином због своје учесталости, разноврсности етиологије и тежине клиничке слике представља значајан медицински и социјални проблем. Добијање ефикасног али јефтиног антиканцерогеног лека представља императив у савременим биомедицинским истраживањима.

Једну од првих дефиниција неоплазми је дао еминентни британски онколог Вилис (*Willis*) још почетком педесетих година XX-ог века и она је идаље у употреби [1]: „Неоплазија је абнормална маса ткива, чији раст превазилази раст нормалог ткива и није у координацији са нормалним ткивом, и чији се раст наставља веома интензивно и након престанка стимуланса који је изазвао промену.“ Познато је да је отпорност неоплазија резултат наследних генетских промена које се преносе на потомство туморских ћелија, чак и након престанка дејства стимуланса који га је подстакао. Управо ове генетске промене омогућавају прекомерну и нерегулисану пролиферацију (независну од физиолошких фактора раста), те неоплазија на тај начин постаје аутономна у односу на остала ткива [2- 6].

Термин неоплазија дословце значи процес „новог раста“, док се под неоплазмом подразумева било који абнормални раст ћелија [2, 3]. Разликује се две врсте неоплазми: бенигне и малигне [7]. Заједничка карактеристика свих неоплазмије да се састоје из две основне компоненте: прве - неопластичне ћелије које чине паренхим неоплазме и друге компоненте, која је строма састављена од везивног ткива и крвних судова. Основна разлика између бенигих и малигну неоплазми чини разлика у фреквенцији и брзини раста, агресивности новонастале генерације ћелија као и у могућности промене локације у околна или удаљена ткива.

Карцином је малигна неоплазма, која се одликује атипичним и абнормалним растом и стварањем метастаза.

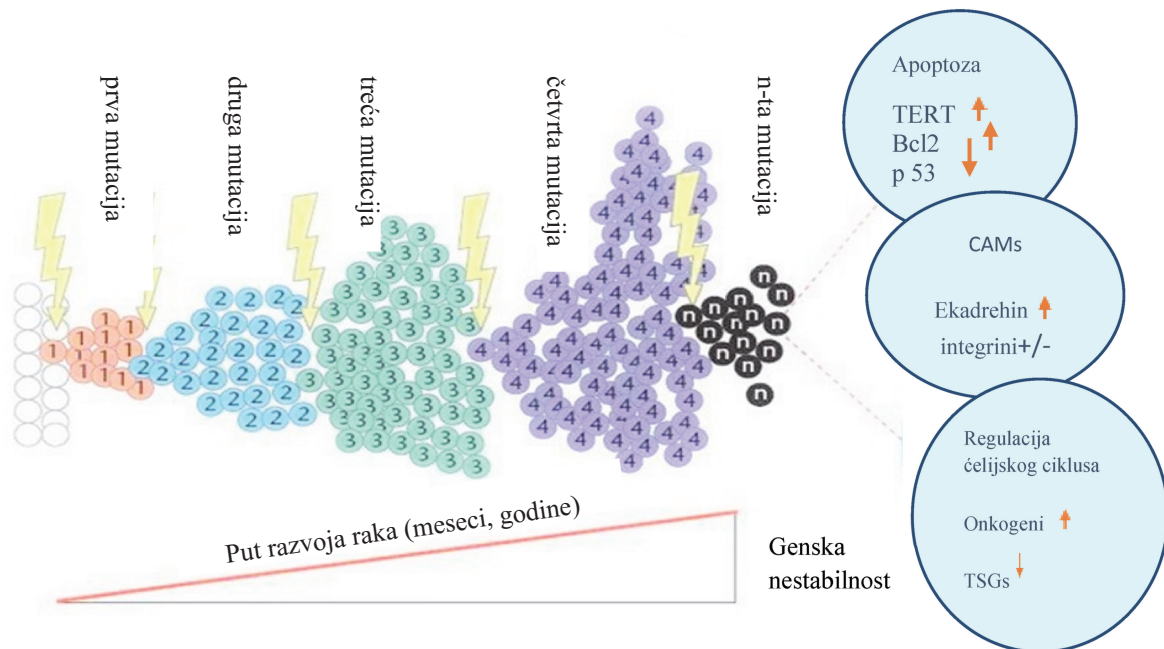
Бенигне неоплазме се састоје од добро диференцираних неопластичних ћелија које најчешће формирају фиброзу капсулу, окружене су здравим ткивом и не шире се по организму. Како Купер (*Cooper*) наводи, можемо рећи да бенигне неоплазме не угрожавају живот пацијента, осим у случајевима немогућности оперативног приступа бенигној неоплазми [3].

Малигне неоплазме се одликују агресивним и инвазивним растом ћелија једне ћелијске лозе, поседују аутономност и веома често се проширују како у околна ткива, тако и у удаљена места и органе где формирају метастазе. Процес метастазирања је каскадни процес, и настаје одвајањем мале групе ћелија са примарне локације и њиховим преношењем путем крви или лимфе на другу локацију. Ту метастатска неоплазма

поново почиње агресиван раст и неконтролисану деобу ћелија и на тај начин формира секундарну неоплазму. Битна карактеристика малигне неоплазме је да не формира фиброзне капсуле.

Критеријум за дефинисање метастаза није удаљеност од примарног, изворног тумора, већ одсуство ткивног контакта [4-6], а присуство метастаза је сигуран показатељ присуства малигне неоплазије. Према Пињателију (*Pignatelli*) и сарадницима, разликују се три основна начина метастазирања: лимфогено, хематогено и трансћелијско метастазирање [6]. Малигне неоплазме, за разлику од бенигних, варирају од добро диференцираних до недиференцираних ћелија. Малигне неоплазме састављене од недиференцираних ћелија су анапластичне. Недостатак диференцијације или анаплазија сматра се знаком малигне трансформације [2,3].

Анаплазија је праћена бројним морфолошким променама. Најкарактеристичније су: плеоморфизам (варијације у величини и облику), абнормална нуклеарна морфологија (једро је промењеног облика са обиљем *DNK* и оно је хиперхроматично) као и поседовање великог броја митоза (најчешће са нетипичним митотичким фигурама). Поред цитолошких абнормалности важна карактеристика анапластичних ћелија је да не поседују нормални поларитет, односно да су изгубиле поларитет [3].



Слика 1. Пут развоја карцинома. Мутације у геному ћелија који контролишу пролиферацију (као што су прото-онкогени и/или гени супресора тумора). Свака нова мутација обезбеђује селективну предност за ову ћелију, што доводи до ‘клоналне експанзије’. Промењене ћелијске особине у овом процесу укључују дерегулацију ћелијског циклуса, превенцију апоптозе и адхезивних особина ћелија (*CAMs* - молекули целуларне адхезије).

Извор: Alison MR. *Cancer. Encyclopedia of Life Sciences*, 2001 [7]; припремила и прилагодила ауторка

Како наводе Маларки (*Malarkey*) и Маронпот (*Maronpot*) [8], потребно је да прође барем десет узастопних мутација да би ћелија испољила малигни карактер. Канцерогенеза је каскадни процес који може трајати, од неколико недеља, месеци до више десетина година, и састоји се од три основне фазе:

1. Иницијације: у овој фази долази до ирверзибилне генетичке промене које је или наслеђена или је настала под утицајем неког канцерогена (хемијских мутагена, зрачења, вируса...)

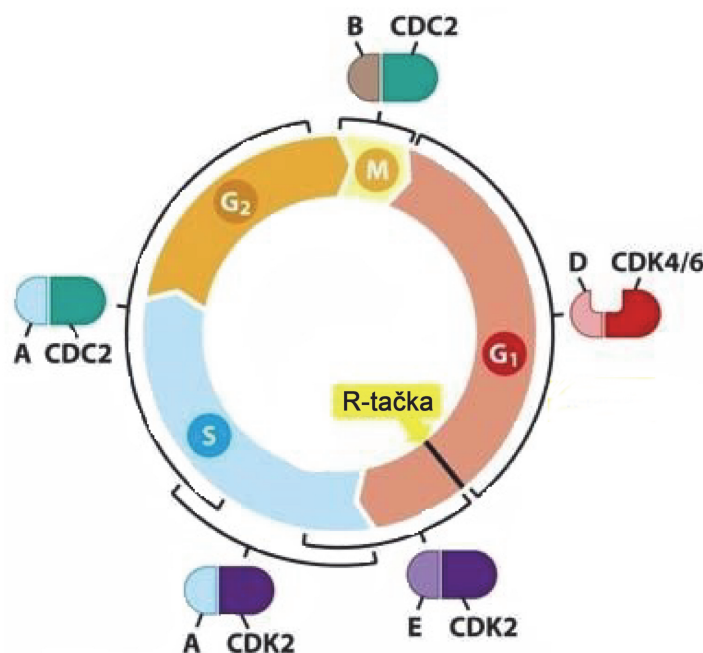
2. Промоције: у овој фази долази до деобе инициране ћелије под утицајем митогена, односно формирање неоплазме и

3. Прогресије: ову фазу одликује брз раст, ангиогенеза и метастазе као и формирање малигне неоплазме [3,5].

1.2. Молекуларна основа карцинома

Како смо већ навели сви карциноми почињу на ћелијском нивоу. Људски организам чине више од сто милиона милиона (100.000.000.000.000) ћелија, а карцином почиње са променом у једној ћелији или малој групи ћелија [6].

У нормалним здравим ћелијама пролиферација и прогресија мора бити усаглашена и усмерена у корист организма као целине. У физиолошким условима пролиферација ћелија кроз ћелијски циклус је регулисана групама протеина који међусобно комуницирају у одређеном низу догађаја [3]. Она се најчешће одвија на следећи начин: фактор раста се везује на његов специфични рецептор који се углавном налази на ће-



Слика 2. Ћелијски циклус

Извор: Weinberg RA. *The biology of cancer 1st ed.* Garland Science, 2007 [9]; припремила и прилагодила ауторка

лијској мембрани, потом активацијом рецептора фактора раста, активира се неколико протеина, а протеини даље преносе сигнале на унутрашњу страну ћелијске мембране. Даље пренос сигнала иде или преко цитосола до језгра, активацијом другог гласника или преко сигналних молекула који директно активирају транскрипцију. Ово изазива индукцију и активацију нуклеарних регулаторних фактора који иницирају *DNK* транскрипцију и улазак ћелије у ћелијски циклус, што на крају резултира ћелијском деобом. Контролне регулаторне тачке су ту да би се проверило да ли су поједине фазе ћелијског циклуса на прави начин завршене. Такође контролне тачке служе да се обезбеди да се неадекватно реплицирана *DNK* не пренесе на ћерку ћелију. Најважније место у регулацији овог процеса заузимају циклин зависне киназе *CDK*, као и циклин *D-CD* [5] (Слика 2).

Поновни улазак ћелија у ћелијски циклус одлучује се на тачки ограничења (R тачка) [9]. У нормалним ћелијама, активација се одвија било преко фактора транскрипције *E2F* у језгру или преко *p53*. Транскрипциони фактор *p53* често се назива „чуваром генома“. Како наводе и Ханахан (*Hanahan*) и Вајнберг (*Weinberg*), он може зауставити ћелијски циклус и индуковати апоптозу (програмирану ћелијску смрт) кроз своју способност да: изазива експресију инхибитора ћелијског циклуса како би се спречила пролиферација ћелије све док се не поправи било каква штета или да иницира апоптозу, уколико су геномска оштећења превелика и не могу се поправити [10].

Како Кемар (*Kumar*) наводи, на молекулској основи у развоју карцинома утичу четири класе гена:

- протоонкогени задужени за промовисање раста ћелије
- тумор-супресорни гени задужени за инхибицију раста неопластичне ћелије,
- гени који регулишу програмирану ћелијску смрт (апоптозу), као и
- гени који су укључени у репарацију *DNK*

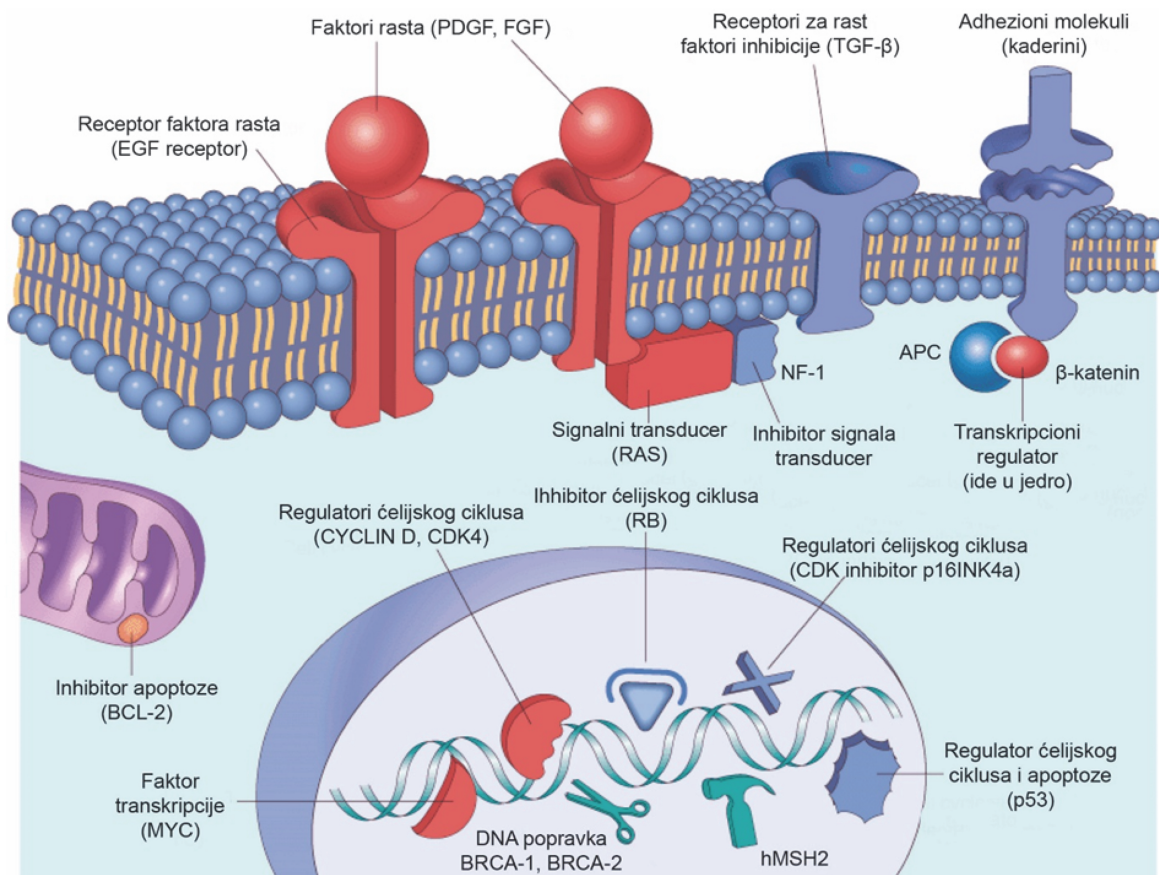
1.2.1. Протоонкогени

Протоонкогени су физиолошки регулатори пролиферације и диференцијације ћелија [2]. Они имају временски и просторно строго контролисану улогу, најчешће током ембрионалног развоја. Дејством канцерогена, нефизиолошких митогена, протоонкогени мутирају и прелазе у форму онкогена. Њихови производи, онкопротеини, подсећају на нормалне производе протоонкогена, осим што су онкопротеини ускраћени за важне регулаторне елементе [4]. По Бомеру (*Bommer*) и сарадницима, протоонкогени могу бити претворени у онкогене различитим механизмима, али се као резултат јавља: прекомерно стварање фактора раста, преоптерећеност ћелије сигнаlima за репликацију, неконтролисана стимулација у међуфазама репликације као и раст ћелија са повећаним нивоима транскрипционих фактора.

У последњих тридесет година од како су нобеловци Вармус (*Varmus*) и Бишоп (*Bishop*) открили присуство протоонкогена на ћелијама, идентификовано је више од 100 онкогена и више од 25 тумор-супресорних гена. Сви онкогени се могу класификовати по својој функцији коју поседују у четири групе [8]:

- факторе раста (*c-sis*)
- рецепторе за факторе раста (пример *c-Erb B*)
- протеине укључене у путеве преноса сигнала (нпр. *G*-протеин, *c-H-Ras* и *c-K Ras* тирозин киназе) и
- регулаторне транскрипционе протеине (*DNK* везујући протеин, *c-тус* и *c-fos*)

Онкоген *Ras* је најчешће мутиран онкоген заступљен у око 30 % карцинома код људи, како се наводи у COSMIC-у [11]. Он припада породици *G*-протеина или гванозин-нуклеотид везујући протеин. Конкретно, то је једна подјединица мале *GTP*-азе, која је структурно везана за *Gα* подјединицу хетеротримерног *G*-протеина (велике *GTP*-азе). *G*-протеини функционишу као сигнални прекидачи са „укљученим“ и „искљученим“ стадијумима (Слика 3). У „искљученом“ стању је везан за нуклеотид гванозин дифосфат (*GDP*), док је у „укљученом“ стању *Ras* везан за гванозин трифосфат (*GTP*), који има додатну фосфатну групу у поређењу са *GDP*-ом. Овај додатни фосфат држи два прекидачка подручја у конфигурацији „оптерећене опруге“. Када се ослободи, региони прекидача се опусте што изазива конформационе промене у неактивном стању.



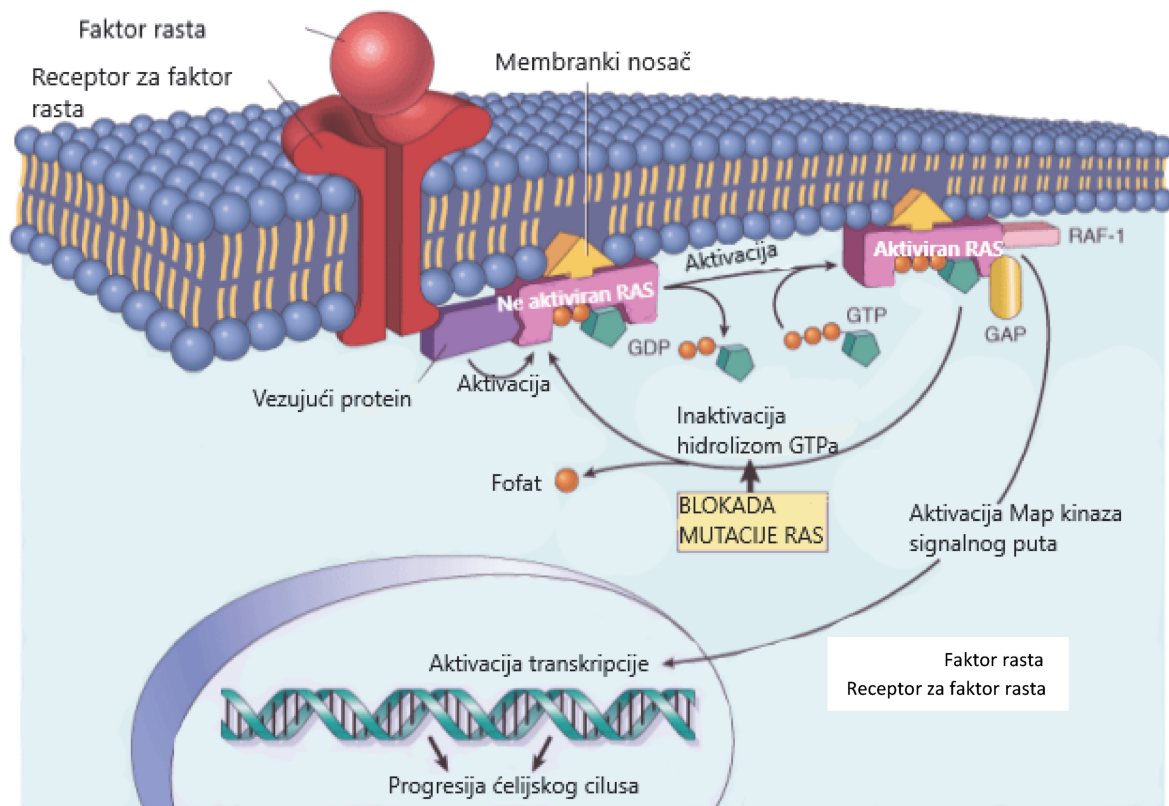
Слика 3. Приказ најзначајнијих онкогена

Извор: Kumar V, Abbas AK, Fausto N., Aster, J.C. i Perkins, J.A. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Saunders, An Imprint of Elsevier Inc (2014), припремила и прилагодила ауторка [2]

Ras има висок афинитет за ефекторске молекуле *Raf*, који активира пут митоген-активираниог протеина киназе (*MAPK*) да пренесе сигнале који промовишу раст у језгру. Мутантни *Ras* протеин је трајно активиран, што доводи до континуиране стимулације ћелија без икаквог спољашњег окидача [2, 8, 12-14]. Велик број туморских ћелија има мутиран *Ras* протеин, а највећа инциденција је у аденокарциному панкреаса 57% [11, 16], аденокарциному дебелог црева 40-50% [12-14] и аденокарциному у плућима 20-30%; [15]. Поседује три изоформе: *HRas*, *KRas* и *NRas*.

Протеин *KRas* поседује три домена преко којих остварује везивање са: протеинима унутрашњих страна ћелијске мембране, гуанозин-дифосфатом (*GDP*) и гуанозин-трифосфатом (*GTP*) као и са цитоплазматским протеинима [11].

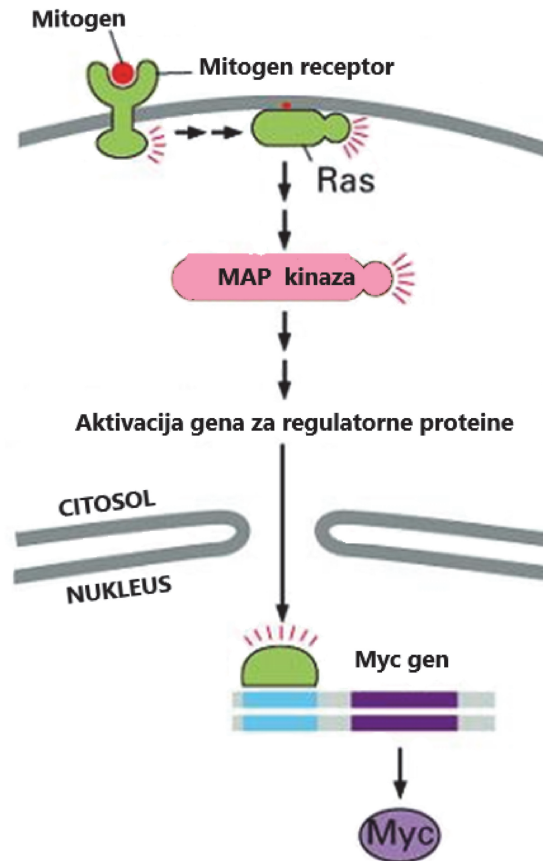
Важну физиолошку улогу у нормалном процесу контроле раста, у одржавању ткивне хомеостазе имају и **фактори раста (*GF*)**. Они преносе сигнале раста из једне ћелије у другу. Ови сигнали се на површини ћелије везују за одговарајуће рецепторе фактора раста (*GFRs*). Рецептори даље преносе сигнал раста путем сигналних путева, до једра где се активирају циљани протеини задужени за пролиферацију ћелије (Слика 4) [5,7,9].



Слика 4. Модел акције *Ras* онкогена

Извор: Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. i Perkins, J.A. Robbins and Cotran *Pathologic Basis of Disease, Saunders, An Imprint of Elsevier Inc (2014), прунпремила и прилагодила ауторка*

Код ћелија карцинома долази до индукције сопствених стимулативних сигнала раста или се константно активирају унутрашње компоненте задужене за стимулацију пролиферације [9-14].



Слика 5. MAP киназни пут као пример сигнализације за раст. Митоген (или фактор раста) се везује за његов рецептор, рецептор тирозин киназа. Тирозинска фосфорилација рецептора доводи до активације неколико кључних протеина као и активацију *Ras*-а, везаног за унутрашњост ћелијске мембране. Активиран *Ras* Раf па MAP киназу, који активира *Myc* гене, који активира експресију регулационих протеина.

Извор: Iberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*, 4th ed. Garland Science/Taylor & Francis LLC; 2002, припремила и прилагодила ауторка [17].

1.2.2. Тумор супресорни гени

Тумор-супресорски гени заустављају неконтролисане деобе ћелије и тиме спречавају раст карцинома. У ћелијама карцинома ти гени су мутирани. Трансформација нормалне у карциномску ћелију прати губитак функције једног или више тумор-супресорских гена и обе копије гена морају бити оштећене у циљу развоја карцинома.

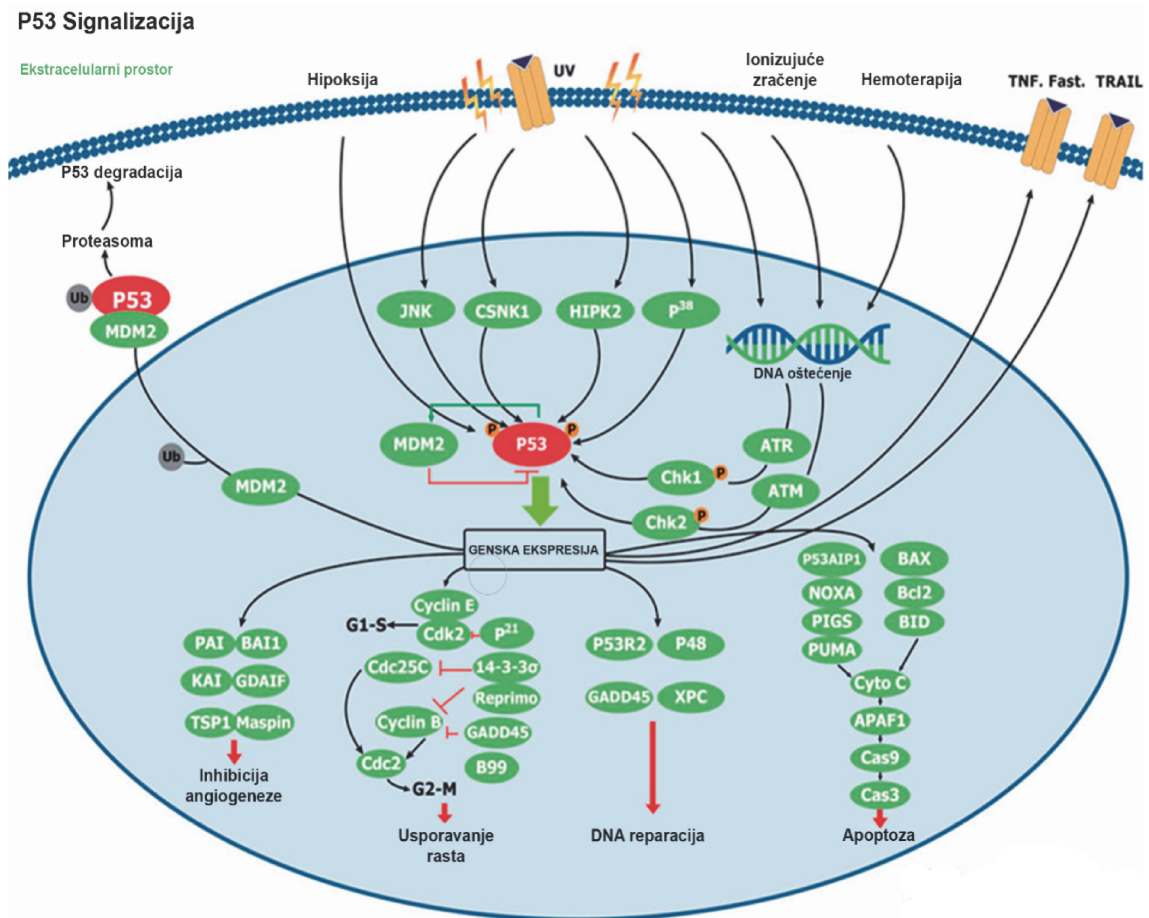
Према улози коју имају у ћелији тумор-супресорски гени се деле на:

1. регулаторе ћелијског циклуса
2. регулаторе путева преноса сигнала
3. протеине укључене у ћелијско-ћелијску интеракцију и интеракцију ћелија и матрикса

4. регулаторе процеса апоптозе
5. протеине цистоскелета као и
6. протеине са непознатом функцијом у ћелији.

Најпознатији тумор-супресорски ген, који је мутиран у око 50% свих хуманих канцера, је *p53* [18-19]. Ген *p53* кодира протеин који спречава ћелијску деобу. Када дође до мутације гена *p53*, протеин који је задужен да блокира ћелијску деобу се не ствара, тако да се ћелије неконтролисано деле и развија се карцином. Управо због ове своје особине назван је „чуваром генома“ [4,5]. Он своју улогу врши тако што изазива експресију инхибитора ћелијског циклуса како би се спречила пролиферација ћелије све док се не поправи направљена штета, или тако што иницира апоптозу, уколико је оштећење генома превелико и не може се поправити.

Протеин ретинобластома (*Rb*) је тумор супресорски ген који контролише прелазак ћелијског циклуса из *G1* у *S* фазу. *Rb* протеин везује регулаторни транскрипциони фактор *E2F* који је потребан за синтезу ензима репликације *DNK*. Када је *Rb* везан за *E2F*, транскрипција и репликација је блокирана [5,15]. Поремећај у смислу не постојања *Rb* гена води до неконтролисане пролиферације ћелија и развоја малигне неоплазије.



Слика 6. Механизам деловања *p53*

Извор: <https://rockland-inc.com/p53-pathway.aspx>, припремила и прилагодила ауторка [19]

Поред *p53*, протеина ретинобластома *Rb* и *PTEN* је веома често мутиран ген заступљен у хуманим карциномима. Он је аберантан у више од 40% свих хуманих карцинома. *PTEN* је фосфатаза и тензински хомолог на хромозому десет, који дефосфорилише фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (*PIP₃*) у фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (*PIP₂*) и тако негативно регулише АКТ сигнални пут који је задужен за раст и пролиферацију ћелија.

1.2.3. Гени који регулишу програмирану ћелијску смрт (апоптозу)

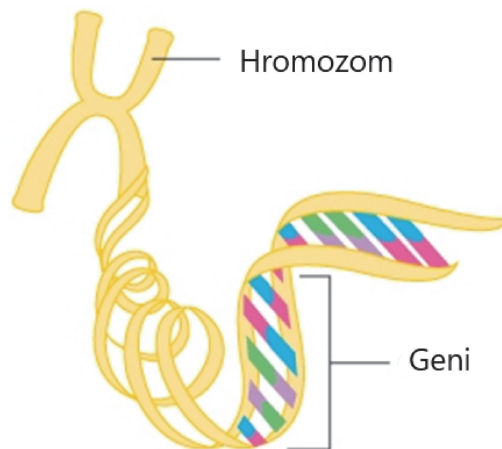
Постоје два типа ћелијске смрти, некроза и апоптоза, који се разликују по својој морфологији, механизмима и физиолошким улогама. Како *Kumar* наводи када је оштећење мембрана озбиљно, лизозомски ензими улазе у цитоплазму и врше дигестију ћелије, а целуларни садржај попушта, што доводи до некрозе. За разлику од апоптозе, програмиране ћелијске смрти, која се карактерише нуклеарним растварањем без потпуног губитка интегритета мембране, под утицајем агресивних агенаса који посебно оштећују *DNK*. Док је некроза увек патолошки процес, апоптоза је важна за одржање многих нормалних функција у организму и није нужно повезана са повредом ћелија.

Апоптоза се контролише интеракцијама између неколико молекула одговорних за елиминацију нежељених ћелија из тела. Како *Кираз (Kiraz)* са сарадницима наводи, апоптоза се може покренути ендогено (митохондријално) или егзогено преко сигнала са спољашње стране ћелије. Спољни пут укључује апоптотске рецепторе смрти или директно деловањем ензима цитотоксичних Т-лимфоцита (перфорин, гранзим *B*). Различите породице протеина као што су каспазе, инхибитори протеинске апоптозе *B* ћелијских лимфоцита (*Bcl*) -2 породица гена, рецептора за тумор некротични фактор гена *TNF*-а, или *p53* укључени су или посредују у процесу апоптозе [16-19]. Имортализација (бесмртност) се дефинише као стицање бесконачног животног века ћелије. Нормалне соматске ћелије сисара пролиферишу ограничен број пута пре него што се подвргну програмираној ћелијској смрти. Сензорне ћелије могу остати метаболички активне иако имају трајно прекинуту пролиферацију. Бесмртност ћелија је суштински корак у малигној трансформацији нормалних ћелија и делимично се може приписати активности теломеразе, ензима одговорног за одржавање теломера на крајевима хромозома. Проширењем теломерне *DNK* теломераза може да се супротстави прогресивном скраћивању теломера, што би иначе довело до смрти ћелије. За разлику од нормалних ћелија које немају детективе нивоа активности теломеразе, око 90% тумора човека чине ћелије које садрже активни ензим теломеразу.

1.2.4. Гени који су укључени у репарацију *DNK*

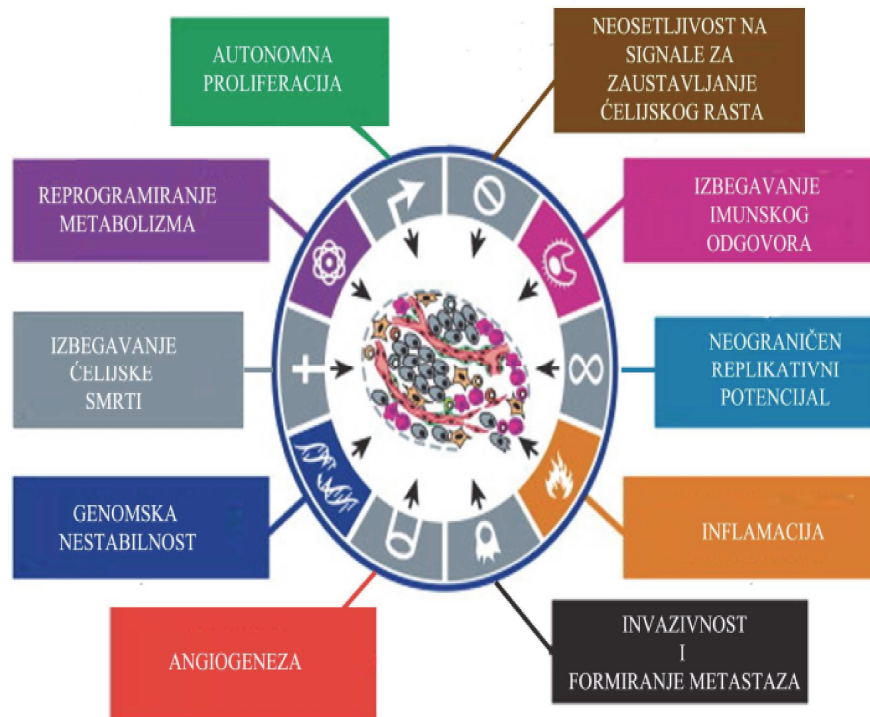
Софистицирани системи за поправку *DNK* су еволуирали да би се одржао људски геном, поправљањем оштећења која су можда оштетили и *DNK*. Главни механизми поправљања *DNK* укључују: поправку неусклађености, поправку базе и нуклеотида, поправљање депурираних места и поправку двоструких прекида.

Важност ових репараторних система за заштиту од убрзане мутагенезе и развоја канцера показује се кроз ретке наслеђене синдроме предиспозиције засноване на мутацијама у ензимским системима поправке *DNK*.



Слика 7. Утицај гена на репарацију *DNK*
Извор: *Cancer Research UK*

Да резимирамо, а како и наводи Hanahan разликујемо шест ‘обележја карцинома’, који описују биолошке способности које су ћелије стекле током каскадног процеса развоја неоплазија код људи.



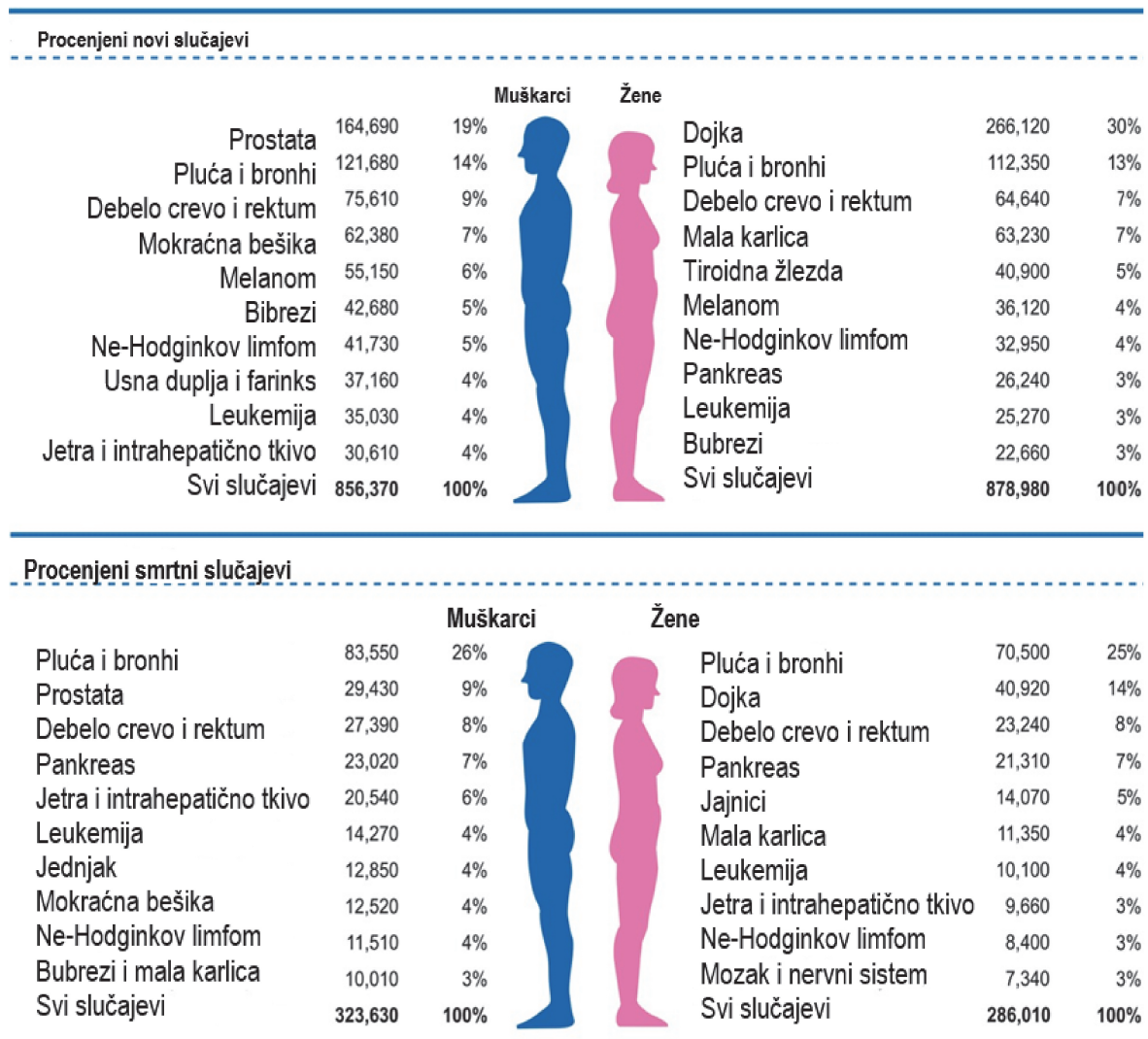
Слика 8. Преглед основних обележја карцинома: 1. Аутономна пролиферација независна од спољашњих фактора 2. Неосетљивост за сигнале за заустављање ћелијског раста 3. Избегавање ћелијске смрти 4. Неограничена могућност репликације 5. Ангиогенеза 6. Инвазивност и формирање метастаза 7. Репрограмирање метаболизма 8. Избегавање имунског одговора; и додате су карактеристике које леже у основи карцинома 9. Инфламација и 10. Геномска нестабилност

Извор: Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 2011; 144:646–674.* [10] Преузела и модификовала ауторка.

1.3. Епидемиологија карцинома

Према подацима Светске здравствене организације (SZO) други узрок укупног морталитета су карциноми [20–22]. Исти извор наводи да број оболелих од карцинома има тренд пораста те је у 2012. години укупан број новооболелих износио 14,1 милиона, а процењује се да ће 2030. године број новооболелих од малигнух тумора износити чак 21,7 милиона. Овако велик број оболелих од малигнитета је последица како продуженог животног века становништва, тако и све већег присуства фактора ризика за малигне болести као што су: пушење, неправилан начин исхране, пасиван начин живота, стрес, гојазност и други [4].

Како наводи Сигел (*Siegel*) са сарадницима, најновији доступни подаци о учесталости и морталитету заостају од 2 до 4 године иза текуће године због времена по-

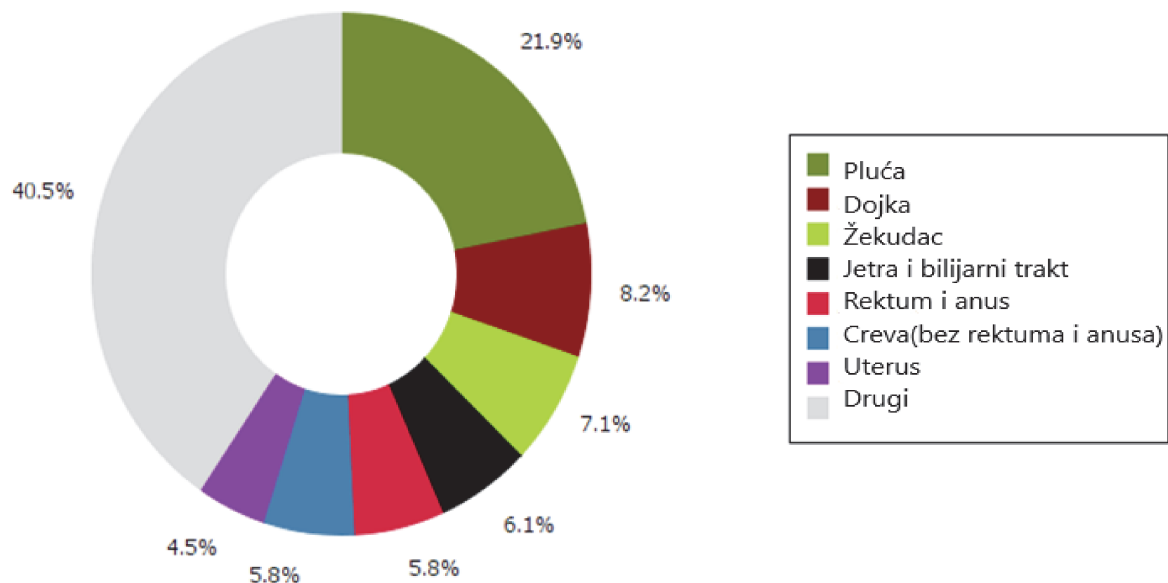


Слика 9. Десет главних врста карцинома: процењеног броја новооткривених случајева и пројекција броја преминулих, као и подела по полу у САД, 2018.

Извор: *Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018 [20].*

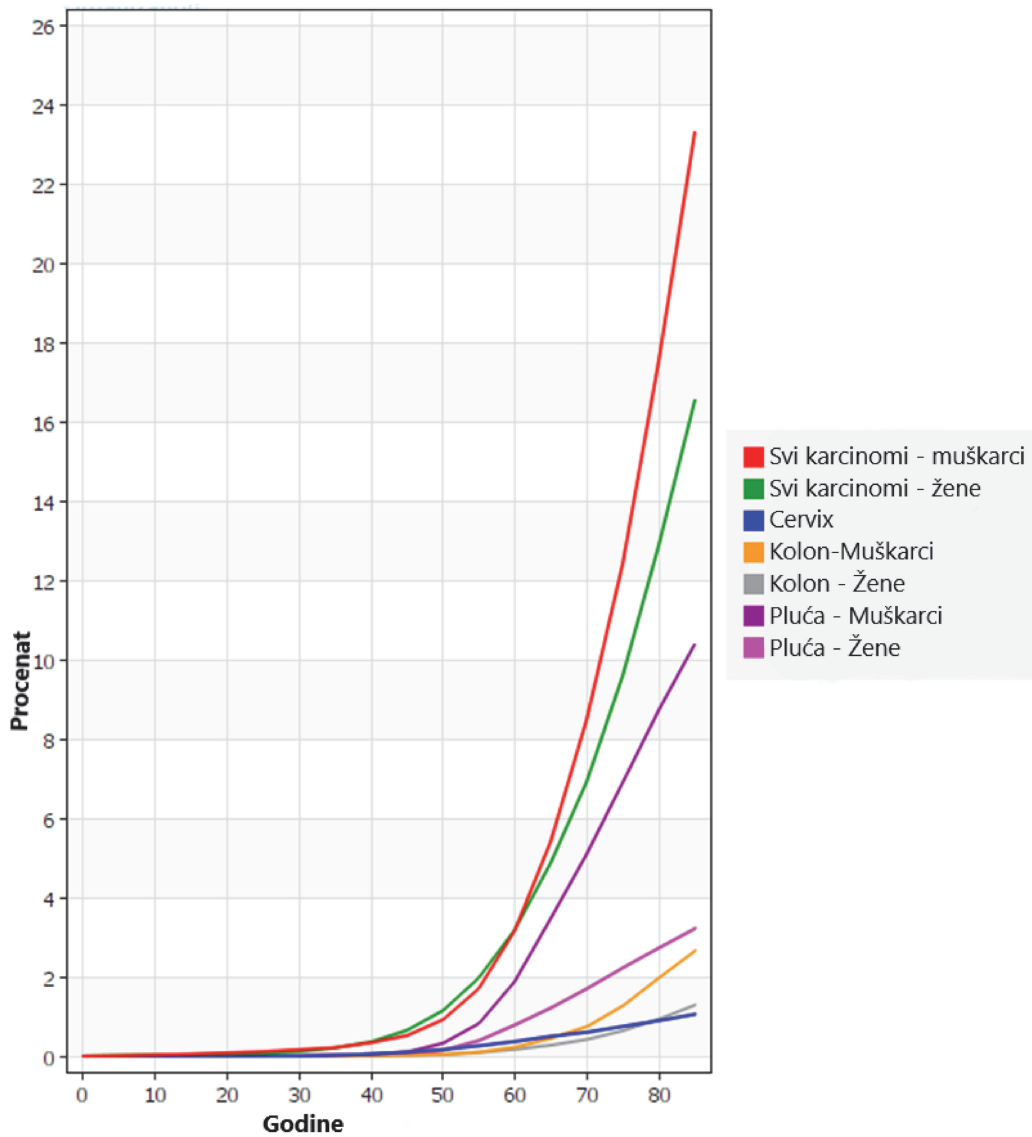
требног за прикупљање података, обраду, контролу и статистичку анализу. Управо из тог разлога ћемо се позвати на пројектован број новооткривених случајева карцинома као и број смртних случајева у Сједињеним Америчким Државама 2018. године како бисмо проценили трендове заступљености и морталитета, и да бисмо видели да ли се очекују неке промене у 2018-тој години (Слика 9).

Карцином плућа је најчешћа неоплазма како у свету тако и у Србији већ неколико деценија. Према GLOBOCAN (*Global Cancer Statistics*) 2012, највећу заступљеност у укупној популацији има карцином плућа, са укупно 1,8 милиона (12,9%) нових случајева, односно 1,2 милиона нових случајева код мушкараца (16,7%). Најчешћи новооткривени малигнитети код мушкараца су малигни тумори плућа, а потом следе малигни тумори дебелог црева, док су код жена малигни тумори дојке 1,6 милиона (25%) нових случајева, дебелог црева 0,6 милиона (14%), грлића материце 0,5 милиона (12%) и малигни тумори плућа 0,5 милиона (12%) нових случајева [23–26].

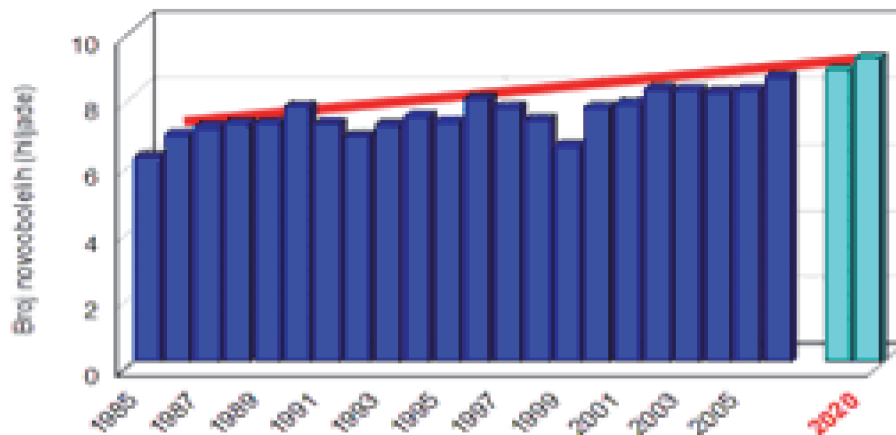


Слика 10. Укупни морталитет по врстама карцинома
Извор: Приказано по референцама [22–26].

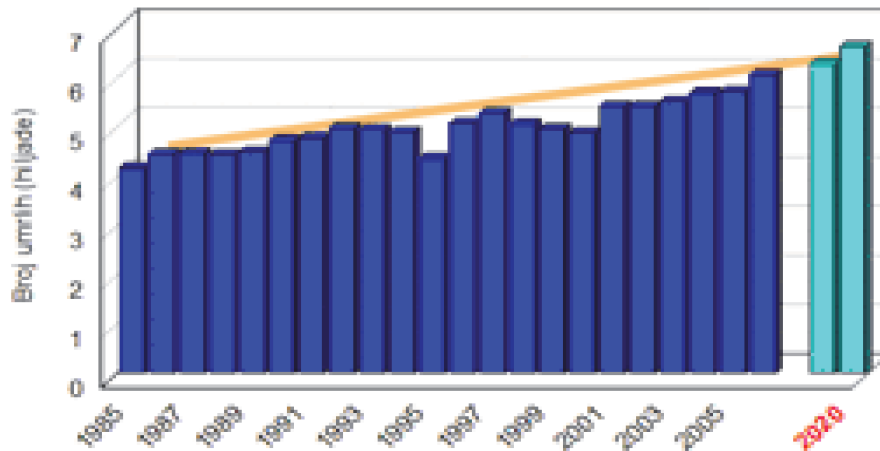
Епидемиолошки подаци из 2012. године, за Србију указују да је у Србији код мушкараца највећа инциденца карцинома плућа, а потом следи карцином дебелог црева. У женској популацији инциденција је следећа: на првом месту је малигни тумор дојке, на другом малигни тумор дебелог црева, а потом следе малигни тумор плућа и цервикса [23–26]. Како наводи Светска здравствена организација (SZO) карцином плућа најчешће погађа популацију старости између 50 и 70 година, док се само у 5% случајева јавља код особа млађих од 40 година. У Европи се годишње дијагностикује око 150.000 нових карцинома плућа, а тога мање од 10%, односно 5.500 оних са раком може се излечити и опстати у дужем временском периоду без малигну обольења [13].



Графикон 1. Морталитет свих карцинома по годинама
Извор: International Agency for Research on Cancer (IARC)



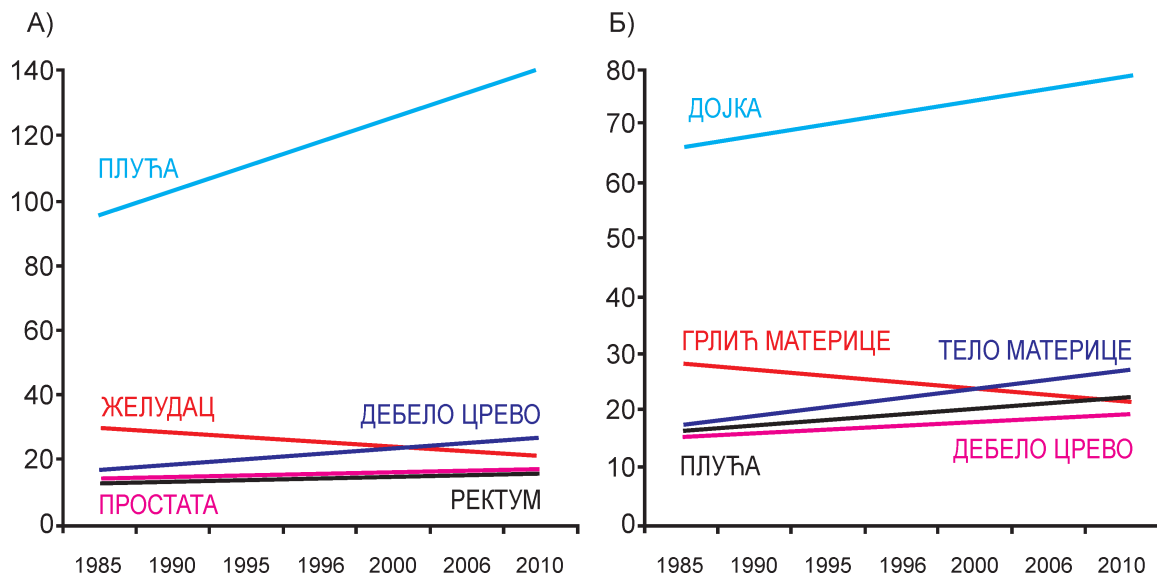
Графикон 2. Пројекција броја оболелих у Војводини до 2020.
Извор: Институт за Онкологију Војводине



Графикон 3. Пројекција броја умрлих у Војводини до 2020

Извор: Епидемиолошки подаци Института за Онкологију Војводине

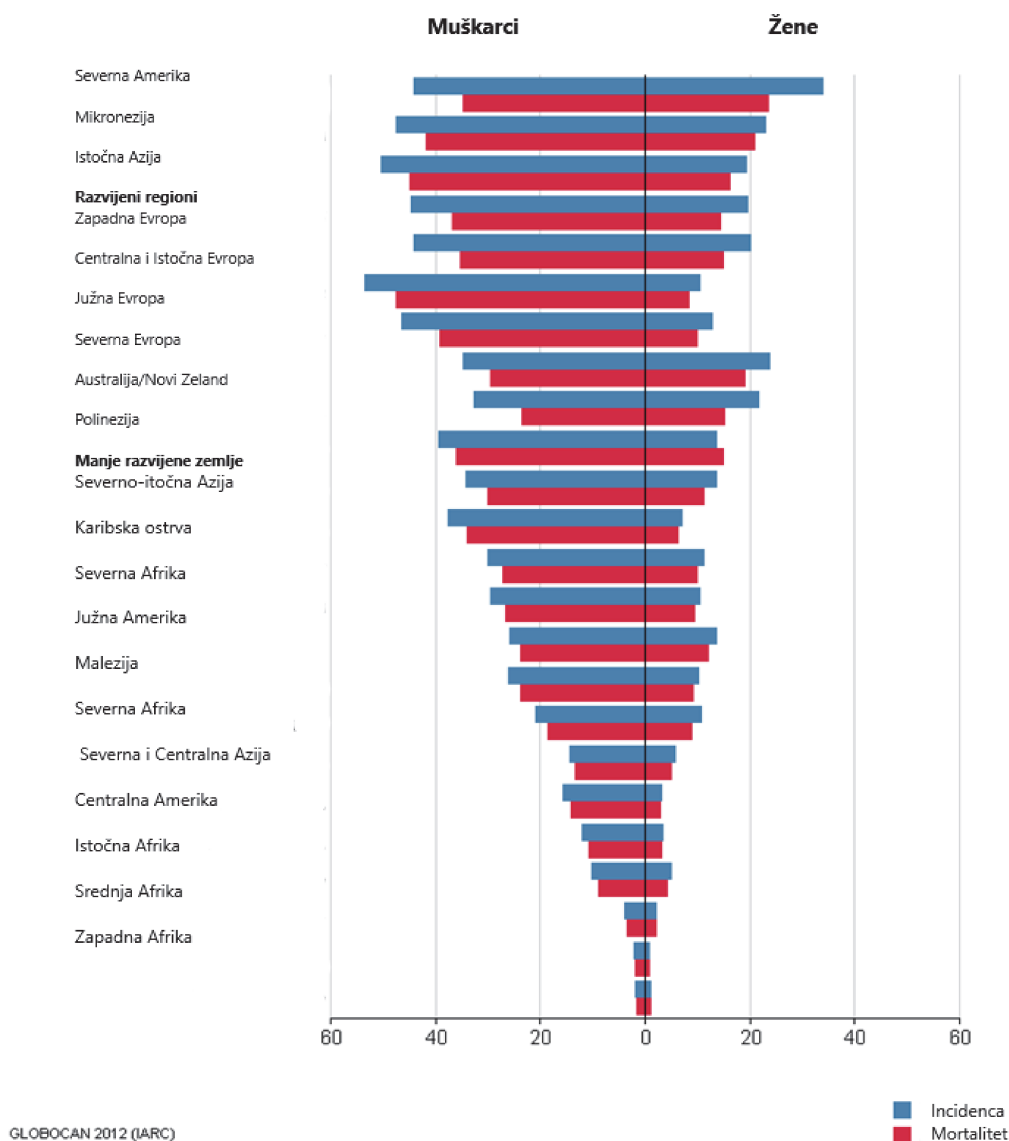
Како смо навели у поглављу 1.3, произилази став да би највећи значај планираног испитивања био уколико се испитивање изврши на културама ћелија најучесталијих карцинома у нашој популацији и то на хуманом аденокарциному плућа (A549), карциному дебелог црева (HT29) и карциному грлића материце (HeLa).



Графикон 4. Трендови учесталости 5 најчешћих малигних тумора у Војводини са пројекцијама до 2010. године:

А) мушкарци Б) жене

Карцином плућа је најчешћи карцином на свету у последњих неколико деценија. Установљено је да је у свету било 1,8 милиона нових оболелих током 2012. године, што је скоро 13% од свих малигних болести. Карцином плућа је свакако најучесталији међу мушкарцима са 1,2 милиона новооболелих у 2012. г. (преко 16% од свих злоћудних болести). Највише оболевају мушкарци у Централној и Источној Европи, где је старосно нормирана стопа 53,5 новооболелих на 100.000 становника.



Графикон 5. Инциденца и морталитет карцинома бронха у свету (Подаци GLOBOCAN-а – Интернационална агенција Светске Здравствене Организације за истраживање карцинома)

Извор: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/lung-new.asp>

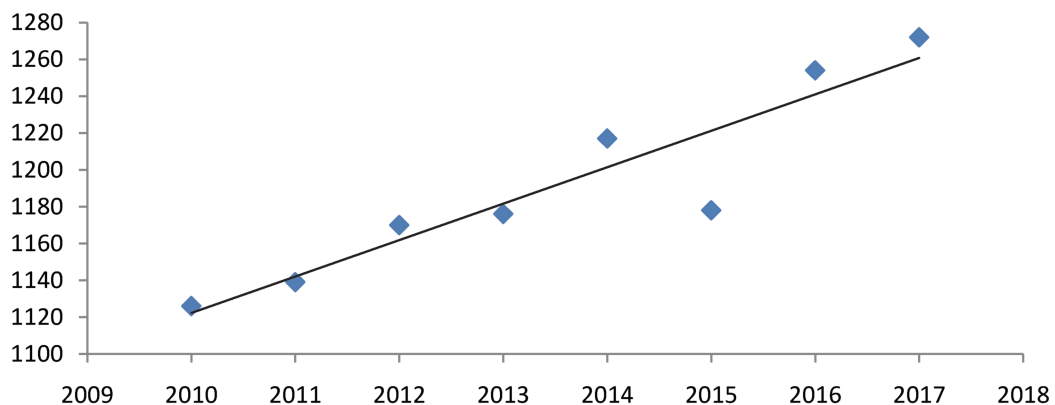
Рак плућа је такође најчешћи узрок смрти међу малигним болестима у свету. Од њега је умрло 1,6 милиона људи у 2012. години, односно скоро 20% међу оболелима од свих злоћудних болести. Ови подаци говоре о врло високој смртности карцинома плућа, јер је однос новооболелих и умрлих 0,87. Другим речима само 13 од 100 оболелих преживи ову болест [24–26]. У Србији је рак плућа такође најчешћа малигна болест. Према истим подацима Србија се налази на другом месту у свету по укупној старосно нормираној стопи од 45,6 новооболела на 100.000 становника, односно по броју новооболелих међу мушкарцима Србија је на 4. месту са 70,3 новооболела (иза Мађарске, Јерменије и Македоније), а по броју новооболелих међу женама са 23,9 новооболела на 100.000 становника, на 11. месту [26].

	Земља	Старосно нормирана стопа 100,000 (Свет)
1.	Мађарска	51.6
2.	Србија	45.6
3.	Демократска Република Кореа	44.2
4.	Македонија	40.8
5.	Нова Каледонија	40.1
6.	Црна Гора	39.6
7.	Данска	39.2
8.	Сједињене Америчке Државе	38.4
9.	Пољска	38.0
10.	Канада	37.9
17.	Турска	34.7
19.	Хрватска	34.3
20.	Словенија	33.9

Tabela 1. Старосно нормирана стопа обољевања од карцинома бронха у свету
Извор: *Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide* <http://globocan.iarc.fr>; accessed on 16/01/2016.

У Србији је у периоду од 1999. до 2008. године забележен пораст у обољењу од карцинома плућа за 27,4%, што је више него дупло већи код жена него код мушкараца. Стандардизована стопа морталитета од карцинома плућа порасла је за 27,6%, такође скоро дупло више код жена него код мушкараца [28].

У Војводини се такође уочава благи пораст обољевања од рака плућа. (Графикон 2.)

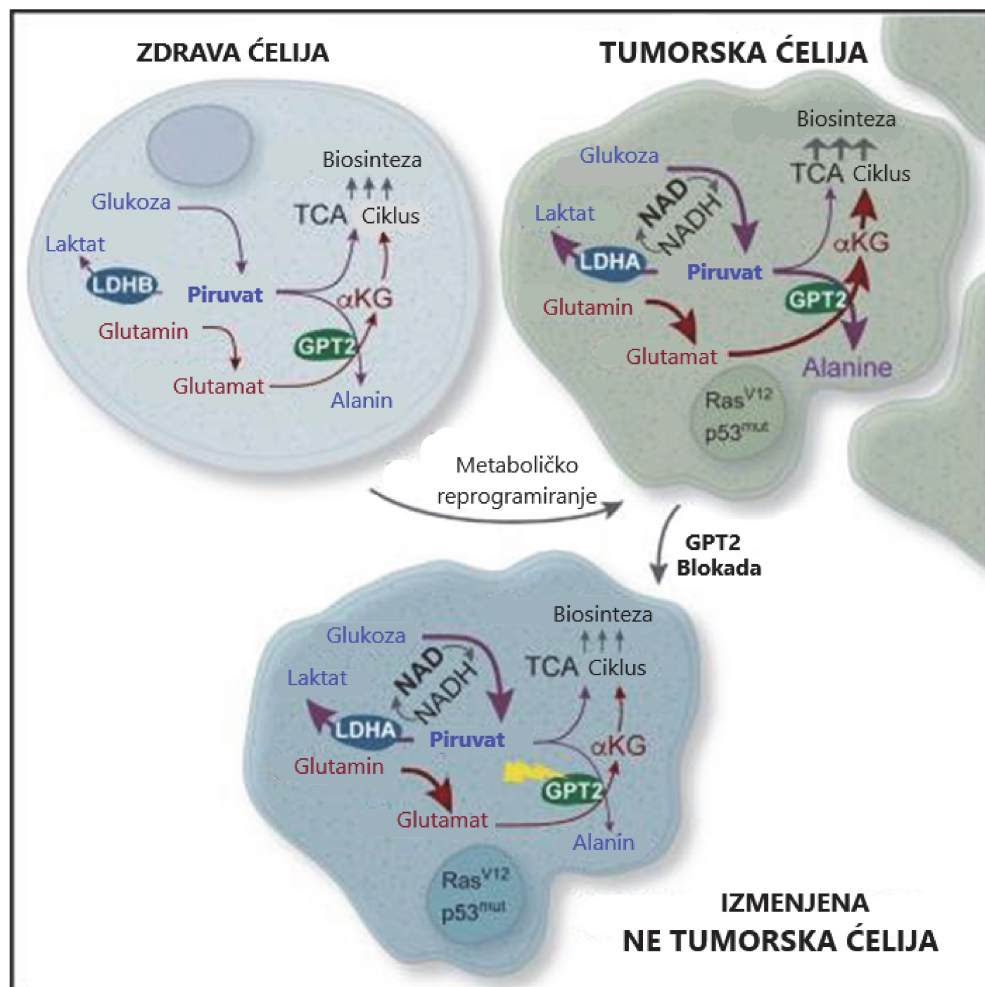


Графикон 6. Тренд обољевања (број новооткривених болесника са карциномом бронха) у Војводини (према подацима Регистра за карцинома бронха Института за плућне болести Војводине, март 2018. год.)

Чешће обољењу мушкарци. Највећи број оболелих се налази у доби од 60 до 70 година. Просечна старост болесника са раком плућа у нашој средини је око 62 године.

1.4. Метаболизам малигне ћелије

Пионир у испитивању метаболизма туморских ћелија био је нобеловац Ото Варбург (*Oto Warburg*) који је поредећи туморску ћелију са здравом приметио да се метаболизам глукозе другачије одвија [29, 30]. Наиме у туморским ћелијама глукоза се у већим количинама претвара у лактат чак и у присуству кисеоника и уз потпуно функционисање митохондрија, па је тај процес назвао „аеробна гликолиза“, за разлику од нормалних здравих ћелија код којих се глукоза конвертује у пирогрођану киселину (пируват) уз присуство кисеоника, а само када га нема у довољним количинама долази до трансформације у лактат [31]. Управо овај ефекат „аеробне гликолизе“ је педесетих година назван Варбурговим феноменом [32, 33, 34]. Обзиром на то да до данашњих



Слика 11. Шема метаболичког репрограмирања у онкогенези

Извор: *Smith B, Schafer XL, Ambeskovic A, Spencer CM, Land H, Munger J. Addiction to coupling of the Warburg effect with glutamine catabolism in cancer cells. Cell Rep. 2016; 17(3):821. [32]*

дана још увек није у потпуности разјашњен утицај Warburg феномена на раст и преживљавање туморских ћелија у последњој деценији је интензивирано испитивање овог ефекта и његов утицај на нивоу сигналних путева, на продукцију *ATP*-а, на ћелијску биосинтезу као и утицај на микроокружење тумора, а све у циљу изналажења што адекватније и ефикасније антитуморске терапије.

Утицај Варбурговог феномена на синтезу *ATP*-а, је био у фокусу многих истраживача који су дошли до закључка да је аеробна гликолиза не ефикасан начин стварања *ATP*-а, јер се по јединици глукозе овим путем створи мање *ATP*-а у поређењу са ћелијским дисањем. Међутим стопа метаболизма глукозе аеробном гликолизом је далеко већа, тако да производња лактата из глукозе одвија 10–100 пута брже него потпуна оксидација глукозе у митохондријама [30-33, 35, 36]. Даље је утврђено да је управо митохондријална *DNK* (*mDNK*) задужена за кодирање кључних протеина у електрон транспортном ланцу (*ETL*) митохондрија, који има кључно место за производњу *ATP*-а путем оксидативне фосфорилације (*OXPHOS*). Туморске ћелије користе аеробну гликолизу, са ниским нивоима *OXPHOS*, да промовише брзу пролиферацију ћелија и раст тумора [37-41].

Теоријско објашњење се позива на теорију еволуције којим ће ћелије са вишом стопом, али нижим приносом у производњи *ATP*-а стећи компетативну предност при конкурисању за исте али ограничене енергетске ресурсе [35, 41, 45]. Како, туморско микроокружење има ограничену количину доступне глукозе, туморска ћелија конкурише за хранљиве материје истовремено са ћелијом имуног система [46, 47]. Додатна подршка овој теорији долази из студије коју је спровео Епштен (*Epstein*), и којом је потврдио да промене у ћелијском окружењу утичу на повећање ћелијских захтева за *ATP*-ом, посредством *ATP*-зависне мембранске пумпе, при чему се ниво аеробне гликолизе нагло повећава док је оксидативна фосфорилација остала константна [48]. Аденозин монофосфат киназа је основни енергетски сензор ћелије. Она се састоји од каталитичке α субјединице и регулаторних β и γ . У условима ниског енергетског статуса када је у ћелији смањен ниво *ATP*-а, а повећана концентрација *AMP*-а, *AMP* се везује за γ субјединицу што доводи до конформационих промена ензима и његовог активирања [49-52].

Даљим испитивањем Варбурговог феномена, закључено је да се он јавља као биохемијски адапциони механизам неконтролисане пролиферације туморских ћелија. Промене одговорне за настанак ћелија тумора дешавају се у три главне групе гена (описане су горе). Прву групу гена чине већ поменути гени одговорни за очување стабилности генома, они који регулишу стопу мутација у ћелији. То су гени чијим се алтерацијама развија генетска нестабилност [8].

1.5. Преглед досадашњих истраживања

Малигне ћелије се одликују абнормалностима у метаболизму [29], пре свега оне користе највише гликолизу за производњу *ATP*, познато као Варбургов ефекат [29, 30, 32-35]. Међутим, недавни докази сугеришу да оксидативна фосфорилација игра значајнију улогу у развоју малигне туморске ћелије [37, 39, 40]. Утврђено је да је управо митохондријална *DNK* (*mDNK*) задужена за кодирање најважнијих протеина у електрон-

транспортном ланцу митохондрија [43, 49, 52]. Промене у метаболизму малигне ћелије, интегритету генома, пролиферацији и апоптози су кодиране посредством протоонкогена као и одсуством дејства тумор-супресорних гена [36, 38, 41]. Фосфатидилинозитол (3,4,5)-трифосфат (*PI3K*)/серин-треонин киназа (*Akt*)/ атипична серин-треонин киназа *mTOR* као и специјална гванозин *ATP*-аза *Ras* (енгл. Rat sarcoma gene)/ протеин киназа активира на митогенима (*MAPK*)/ екстрацелуларна сигнално регулисана протеин киназа (*EPK*) карактеристични су сигнални молекули за настанак различитих малигнух тумора [41, 51]. Међу најчешће инактивним тумор-супресорским генима у канцерогеној ћелији се посебно издвајају *p53* као и фосфатаза и тенсински хомолог на хромозому десет (*PTEN*). Често промењени онкогени код канцерогене ћелије су *Ras* и *BRAF* онкогени. *Ras/MAPK/EPK* сигнални пут регулише процес ћелијске деобе, преживљавања и апоптозе [50-52]. Најзначајнији координатор ћелијског раста, *mTORC1* активира различите метаболичке сигнале, посебно метаболизам глутамин (глутаминализу) и контролише велики број ћелијских процеса, укључујући и аутофагију [41, 44]. Синтезу протеина и метаболизам митохондрија промовише *mTORC1* [45, 46, 54].

Досадашња истраживања антикарциногене активности код самосталне примене нитроглицерина, метформина, 2-деокси-*D*-глюкозе и кофеина у *in vitro* условима показана су кроз потенцирање аутофагије и апоптозе активирањем познатих метаболичких сигналних путева малигнух ћелијама.

Метформин је често прописивани лек који се користи за лечење дијабетес амелитус тип II. Делује као сензибилизатор инсулина и може се користити било као монотерапија или као део комбиноване формулације у лечењу дијабетеса мелитус. Метформин такође може спречити развој дијабетеса код особа са дијагнозом преддијабетеса [55, 56]. На основу епидемиолошких података, закључено је да је у популацији дијабетичара који су били на терапији метформином смањена и инциденција и морталитет од малигнух тумора у односу на здраву популацију [57, 58]. Показано је да терапија метформином има и протективни антитуморски ефекат, јер дијабетичари који су на терапији метформином у мањем проценту оболевају од карцинома или ако већ имају карцином, имају дужи век преживљавања [59, 60].

Молекуларни механизам повезаности између DM 2 и туморогенезе још увек није разјашњен, али се сматра на основу претходних студија да у основи три фактора играју важну улогу. То су: Инсулинска резистенција DM 2, који се одликује хиперинсулинемијом, која узрокује повећан ниво инсулина и инсулин-зависног фактора раста (*I/IGF*), који се везује за рецепторе и активирати фосфатидилинозитол 3-киназу (*PI3K*)/*Akt* и митоген- активирани протеинске киназе (*MAPK*), што доводи до пролиферације ћелија [60, 62]. Како су Донат (*Donath*) и Си (*Xie*) са сарадницима навели, они посматрају дијабетес као инфламаторну болест, те метаболички поремећај и оксидативни стрес код пацијената са дијабетесом континуирано промовишу проинфламаторно стање, што резултира смањењем антиоксидативног капацитета ћелија [62-63]. Управо због тога пацијенти са DM имају већу вероватноћу за дуготрајне инфекције те како Герлинг (*Geerling*) наводи они се налазе у благој имунодефицијентности те су подложни опортунистичким инфекцијама [64]. Како смо већ навели, у антитуморском дејству метформина описана су два главна метаболичка пута, и то: *I/IGF* и *PI3K/Akt/mTOR* [65, 73-75].

У бројним *in vitro* студијама је показано да метформин инхибира пролиферацију и индукује апоптозу ћелија различитих туморских култура [55, 67-81]. На ћелијској култури мијелоидне леукемије показано је да метформин зауставља пролиферацију ћелија у *G1* фази ћелијског циклуса. Ова блокада је посредована смањеном експресијом циклина *D1* и *Mcl-1* и повећаном експресијом циклин зависне киназе *p21*, каспазе 3, каспазе 9, *PARP-1* и *Bac* онкогена [55, 68, 79]. Поменути ефекти су зависни од активности *AMPK*-а [70]. На канцерским ћелијама простате, метформин са инхибитором гликолизе 2-деокси-*D*-глюкозом блокира пролиферацију канцерогених ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса. Међутим у ћелијама карцинома ендометријума метформин је индуковао деструкцију ћелија независно од активности каспазе 3. У ћелијској култури карцинома простате комбинација метформина и 2-деокси-*D*-глюкозе је индуковала *AMPK*-зависну апоптозу посредовањем *p53* [77]. Метформин, који је још описан и као „митохондријални отров“ инхибише комплекс 1 у митохондријалном електрон-транспортном ланцу, индукујући енергетски стрес и смањену производњу *ATP* [43, 55, 70, 82, 83-85]. Метформин испољава антитуморске ефекте углавном преко активираних *AMPK*, чији је утицај испитиван на ћелијским културама карцинома дојке, колоне, јајника, материце и плућа [58, 70]. Активација *AMPK* је посредована јетреном киназом *B1* (која је кодирана *LKB1*, тумор-супресорским геном), што води до смањене синтезе протеина и липида, као и смањене експресије фактора раста. Смањена пролиферација малигне ћелије посредована је путем инхибиције *mTOR*-а [43, 70, 82, 83-84]. Метформин такође утиче на редокс систем митохондрија преко инхибиције митохондријалне глицерофосфатне дехидрогеназе, што доводи до супресије глуконеогенезе [70,78]. Метформин свој антитуморски ефекат углавном постиже активацијом *AMPK*-а и фосфатидилинозитол 3-киназе (*PI3K*)/*Akt* сигналног пута као и инхибицијом *mTOR* сигналног пута [55, 57].

Антитуморска активност 2-*DG* у комбинацији са метформином, на ћелијској линији карцинома простате, огледа се у убрзавању апоптозе. У новим *in vitro* студијама је испитивана њена антитуморска активност када се апликује самостално. Тако је испитивање на ћелијској култури колоректалног карцинома и на ћелијским културама леукемије потврђено да индукује апоптозу и застој ћелијског циклуса, као и да инхибира пролиферацију, миграцију и инвазију канцерских ћелија. Ово дејство остварује утичући на смањење експресије *Mcl-1* и *Bcl-2* онкогена, као и катепсина L који је задужен за одржавање цитоскелета ћелије и има велики утицај на *MMT* комплекс у ћелији [86, 88]. Своје антитуморско дејство 2*DG* остварује и утицајем на *AMPK/m TOR* сигнални пут [89, 91].

Потенцијална антитуморска активност нитроглицерина, у *in vitro* студијама је доказана на ћелијским културама карцинома дојке, ендометријума, простате и леукемије на којима је потврђена повезаност хипоксије и ендогено створеног *NO*. Показана је и антитуморска активност нитроглицерина изазивањем апоптозе активисањем тумор-супресорског гена *p53* [92, 93].

Кофеин се увек налазио у фокусу истраживања због његове велике заступљености у намирницама, међутим тек се од недавно нашао у фокусу истраживања антитуморског дејства. У *in vitro* испитивањима на ћелијским културама карцинома плућа, дојке и цервикса доказана је његова антитуморска активност. Он утиче на смањену ек-

пресију *Bcl-2* протеина и смањено стварање каспазе 3. Такође је потврђено и његово дејство на тумор-супресорски ген *p53* [94–97].

1.6. Избор циљева истраживања

Из свега наведеног један од циљева савремене антитуморске терапије треба да тежи производњи фармаколошки активне супстанце која ће циљано потенцирати дејство тумор-супресора као што је *p53* или *PTEN*; или пак модификовати дејство онкогена као што су *Ras* или *Bcl*. Посматрајући позитивне ефекте код пацијената оболелих од карцинома, који су поред класичне антитуморске терапије користили и метформин или нитроглицерин дошли смо до закључка да би било значајно и испитивати да ли и саме супстанце метформин или нитроглицерин показују антитуморску активност. Како је период од синтезе новог лека до његове употребе веома мукотрпан, дугачак и веома скуп, савремени приступ лечењу карцинома тражи нова решења досадашњим класичним терапијама, у основи хемиотерапије [98]. Испитивање плејотропног дејства, добро познатих лекова као што су метформин и нитроглицерин, у терапији карцинома, може наћи оправданост управо због њихове нешкодљивости као и чињенице значајних уштеда и доступности пацијентима [59, 93, 98].

Оправданост овог истраживања се огледа у научном, економском и социјалном аспекту проблема.

Метформин и нитроглицерин су изабрани из следећих разлога:

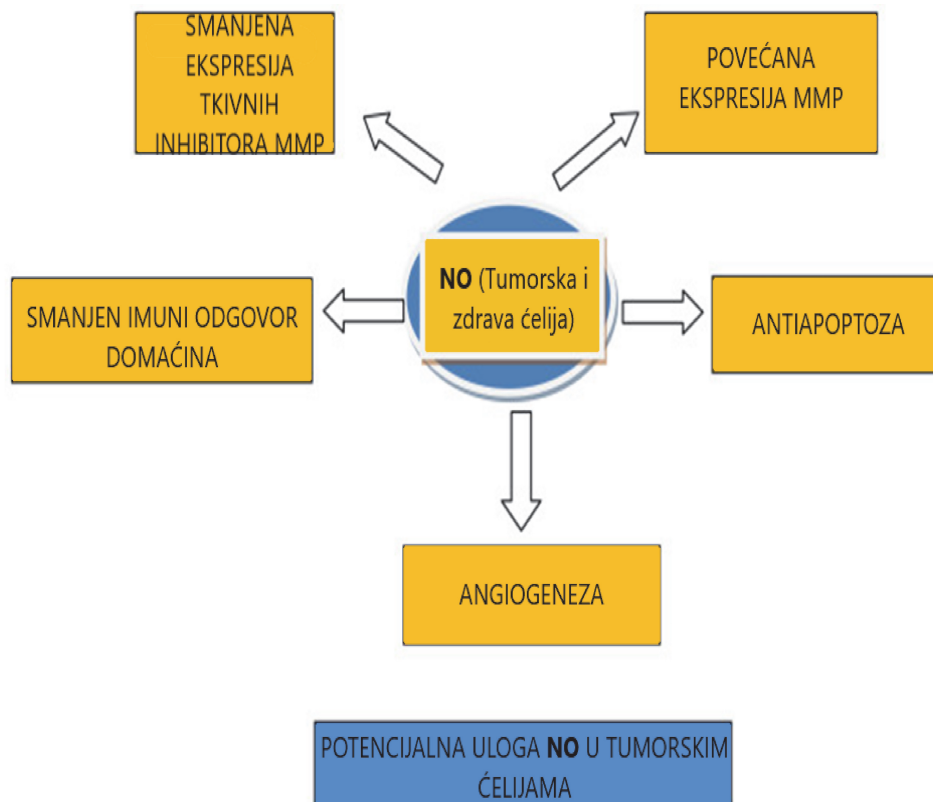
- Уочено је антитуморско деловање;
- Дуго су у употреби;
- Немају значајнијих нежељених ефеката;
- Лако су доступни и јефтине.

Метформин (1,1-диметилбигванидин хидрохлорид) припада бигванидинској класи оралних хипогликемика и представља широко коришћен антидијабетесни лек [59]. Осим овог најзначајнијег дејства метформина, уназад неколико година се испитује и антитуморско дејство метформина. Од како је Еванс (*Evans*) са сарадницима први показао да метформин смањује ризик од настанка малигног тумора за чак 25%, урађена су бројна испитивања његовог антитуморског дејства [55]. Комплетан механизам његовог антитуморског дејства није у потпуности разјашњен, али се сматра да има како директни тако и индиректни ефекат. Активација аденозин монофосфат протеин киназе (*AMPK*) претпостављени је механизам његовог антитуморског дејства. Под индиректним ефектом се подразумева ефекат снижења нивоа глукозе као њене смањене продукције у јетри, повећане осетљивости на инсулин и коришћења глукозе од стране адипоцита, што све започиње активирањем *AMPK*-а. Механизам којим метформин смањује производњу глукозе у јетри захтева *LKB1*/серин треонин киназу 11 (*STK11*) која контролише *AMPK* и глуконеогенезу [33]. Директан ефекат метформина на туморску ћелију се огледа у инхибицији апоптозе туморске ћелије [14, 15]. Пролиферација ћелије

тумора се зауставља у *G1* фази циклуса, а овај механизам зависи и од активације *AMPK* и инхибиције *mTOR*-а (енгл. *mammalian target of rapamycin*). Осим што учествује у инхибицији аутофагије, активација *STK11/mTOR* је један од основних сигнала за преживљавање ћелије; овај сигнални пут има значајну улогу у регулацији ћелијске пролиферације, апоптозе, метаболизма глукозе као и процесу транскрипције и транслокације [99, 101]. Плазма концентрација метформина код максималне дозе метформина од 750 mg је 15×10^{-3} mmol/L.

Нитроглицерин (1,2,3-тринитроксипропан) јесте нитрат са снажним вазодилаторним ефектом, који се користи као коронарни вазодилатор. Најчешће се користи у профилакси и лечењу ангине пекторис, али и за третман хипертензије и за индукцију хируршке хипотензије. Нитроглицерин делује као дозор азот(II)-оксида (*NO*), који је одговоран за вазодилаторни ефекат. У испитивању антитуморске активности нитроглицерин испољава двоструки ефекат [92, 93, 102, 103]. При ниским концентрацијама *NO* (<100 nM) има проканцерогени ефекат, који је повезан са повећањем ангиогенезе и пролиферацијом ћелија као и супресијом апоптозе. При високим концентрацијама *NO* (> 500 nM) има антитуморски ефекат који се огледа у оштећењу дезоксирибонуклеинске киселине (*DNK*), потенцирању оксидативног/нитратног стреса, цитотоксичности и апоптози канцерогене ћелије [102].

Сви механизми антитуморског деловања нитроглицерина су посредовани *NO*, који спречава ћелијско дисање и синтезу *DNK*, модулира метаболизам гвожђа и стиму-



Слика 12. Потенцијална улога *NO* у канцерогенези.

Извор: Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol*. 2013;11:118. [92].

лише апоптозу, активирањем експресије *p53* и активацијом каспаза из породице протеаза, а истовремено смањује концентрацију ендогених инхибитора апоптозе [93-103].

Аналог глукозе јесте 2-Деокси-*D*-глукоза (*2-DG*). Антитуморско дејство *2-DG* се огледа у модификовању метаболизма глукозе и смањењу енергије у канцерској ћелији. Унутар ћелије *2-DG* се конвертује у фосфорилвану *2-DG*, дејством хексокиназе, првог ензима који ограничава брзину гликолизе. Међутим, фосфорилвана *2-DG* се не метаболише даље, од стране другог ензима гликолизе, фосфоглуко-изомеразе, те долази до акумулације фосфорилване *2-DG*, коју хексокиназа компетитивно инхибира у овој фази и ограничава брзину гликолизе. Директна последица је трошење интрацелуларног аденозин-трифосфата (*АТФ-а*), што смањује пролиферацију ћелија [86, 88]. *2-DG* такође изазива и аутофагију [86, 87]. Аутофагија је главни механизам којим ћелија прерасподељује хранљиве материје из помоћних ћелијских процеса на оне битније у условима недостатка нутријената или када је ћелија под стресом [45, 67, 99-101]. Аутофагија може представљати механизам ћелијског умирања у случајевима кад је претерано или неадекватно експониран ген за апоптозу (*Akt*) или код ћелија са мутираним генима за апоптозу. Аутофагија може представљати и механизам за ћелијско преживљавање у неповољним условима као што су: недостатак нутријената, хипоксија, зрачење или третман одређеним цитостатицима, јер уклања оштећене протеинске партикуле и на тај начин чува енергетске депое ћелије [31-34]. Аутофагија има заштитну улогу против ћелијске смрти изазване *2-DG*. Блокада аутофагије повећава осетљивост канцерске ћелије на цитотоксични ефекат *2-DG*. Поред тога, *2-DG* повећава оксидативни стрес и снажно убрзава апоптозу у канцерској ћелији. Иако сама *2-DG* има ограничен терапијски ефекат на неким канцерским ћелијама, може се комбиновати са другим терапијским агенсима или као додатак радиотерапији јер при комбинованој примени испољава синергистичко антитуморско дејство [39-40]. Користи се у РЕТ/СТ снимањима јер појачава разлике у метаболизму глукозе здравих и малигнућих ћелија.

Кофеин је познат стимуланс централног нервног система који делује преко аденозинских рецептора и катехоламинских неуротрансмитера, адреналина и норадреналина. Веома је заступљено једињење у великом броју намирница, пре свега у кафи, чају и у другим безалкохолним напицима. Механизам његовог дејства је инхибиција различитих протеин киназа, укључујући *АТМ* и *АТФ*, важне протеин киназе укључене у *DNK* индуковану ћелијску смрт и апоптозу [104, 105]. Кофеин показује антитуморску активност и као неселективни инхибитор фосфодиестеразе (*PDE*). Он делује тако што се аденин такмичи за приступ на каталитичко место *PDE* и спречава *PDE* да инхибира циклични аденозин монофосфат (*cAMP*) или циклични гуанозин монофосфат (*cGMP*). Повишен ниво интрацелуларног *cAMP* и *cGMP* води инхибицији раста канцерогене ћелије и индукује њену апоптозу [45]. Користи се и као хемио и као радио сензибилизатор тј. да појача дејство хемиотерапије и радиотерапије.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљеви истраживања

Иако је цитотоксичан ефекат метформина показан у бројним *in vitro* студијама [56, 68, 69, 71-89], као и одређеним *in vivo* студијама [56,81], до сад није испитивано деловање метформина, нитроглицерина са адјувантима као што су 2-деокси-*D*-глукоза и кофеин, на ћелијским културама аденокарцинома плућа (*A549*), колоректалног карцинома (*HT29*) и аденокарцинома цервикса (*HeLa*). Механизми овог деловања су још увек недовољно разјашњени, те су из свега наведеног постављени следећи циљеви докторске дисертације:

1. Доказати цитотоксично деловање метформина, нитроглицерина, 2- деокси-*D*-глукозе и кофеина на културама ћелија аденокарцинома плућа (*A549*), колоректалног карцинома (*HT29*) и аденокарцинома цервикса (*HeLa*).
2. Доказати цитотоксично дејство при истовременој примени 2-деокси-*D*-глукозе или кофеина са метформином, на културама ћелија аденокарцинома плућа (*A549*), колоректалног карцинома (*HT29*) и аденокарцинома цервикса (*HeLa*).
3. Доказати цитотоксично дејство при истовременој примени 2-деокси-*D*-глукозе или кофеина са нитроглицерином, на културама ћелија аденокарцинома плућа (*A549*), колоректалног карцинома (*HT29*), и аденокарцинома цервикса (*HeLa*).
4. Доказати утицај метформина применом на ћелијској култури аденокарцинома цервикса (*HeLa*), било самостално или удружено на експресију онкогена *p53*, *ELISA* техником.

2.2. Хипотезе

1. Метформин, нитроглицерин, 2-деокси-*D*-глукозе и кофеин имају статистички значајно цитотоксично дејство на културама ћелија аденокарцинома плућа (*A549*), колоректалног карцинома (*HT29*) и аденокарцинома цервикса (*HeLa*).
2. Примена 2-деокси-*D*-глукозе и кофеина са метформином има статистички значајан цитотоксичан ефекат на ћелијским културама аденокарцинома плућа (*A549*), колоректалног карцинома (*HT29*) и аденокарцинома цервикса (*HeLa*).
3. Истовремена примена нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе као и нитроглицерина и кофеина на ћелијским културама аденокарцинома плућа (*A549*), колоректалног карцинома (*HT29*) и аденокарцинома цервикса (*HeLa*) има статистички значајно повећано цитотоксично дејство у односу на антитуморско дејство самог нитроглицерина.
4. Самостална примена метформина на ћелијској култури аденокарцинома цервикса (*HeLa*) статистички значајно повећава експресију *p53* онкогена.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Ћелије и ћелијске културе

Деловање метформина, нитроглицерина, 2-деокси-*D*-глукозе и кофеина појединачно као и у комбинацији испитивано је на хуманим ћелијским линијама карцинома грлића материце (*HeLa ATCC CCL 2*), ћелијској култури аденокарцинома плућа (*A549 ATCC CCL 185*) и карцинома дебелог црева (*HT29 ATCC HTB 38*). Овај део истраживања рађен је на Институту за онкологију Војводине у Сремској Каменици. Ћелијске линије су инкубирани у термостату 24 h у атмосфери са 100% влажношћу и 5% CO₂ (*Heraeus*), на температури од 37°C. Оне су култивисане у *Dulbecco* модификованом *Eagle*-овом медијуму са 4,5 g/l глукозе (*DMEM, Gibco BRL, UK*), са 10% феталног говеђег серума (*FBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*), и 1 % раствора антибиотика / антимикотика (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*). Ћелије су пасажирани два пута недељно, и у експерименту су коришћене у експоненцијалној фази раста између треће и десете пасаже. Наведене ћелијске линије су након одмрзавања са –80° C гајене у пластичним фласковима од 25 cm³ концентрацији 1x10⁶ ћелија у 10 ml. По достизању конфлуентности, ћелије су одлепљене са 0,1% трипсином (*trypan blue, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*) и коришћене у експериментима. У циљу испитивања ћелије се засејавају у плоче са 96 отвора (1x10⁵ ћелија по отвору). За анализу на проточном цитофлуориметру, ћелије су засађене у пластичне флаконе од 25 cm³, са 1x10⁶ ћелија. (Произвођач *Sarstedt, Nümbrecht, Немачка*). Све ћелије су третиране 24 и 48 сата након инкубирања у термостату 24h на 37° C, са 100% влажношћу и 5% CO₂ (*Heraeus*). Непосредно пред читавање су третиране ћелије пребачене у пластичне епрувете од 5ml (*Falcon BD, USA*).

3.2. Раствори и реагенси

Метформин хидрохлорид (99,99%, Галеника, Србија) је растворан у физиолошком раствору са пуферизованим фосфатним пуфером (*PBS, Dulbecco 's PBS, Capricorn Scientific GmbH, Germany*) непосредно пре експеримента. У експериментима су коришћени и 2-деокси-*D*-глукоза (*2DG*) (*Abcam, Cambridge, UK*), нитроглицерин (5 mg/1,6 ml; Хемофарм, Вршац, Србија), кофеин (99,99%, *Abcam, Cambridge, UK*), Сулфородамин Б (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*), Тризма база (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*), трихлорсирћетна киселина (*Merck Chemie GmbH, Germany*), сирћетна киселина (*Zorka pharma hemija, Šabac, Srbija*), анексин В-FITS (*Becton Dickinson Pharmingen, Germany*), пропиридијум јодид (*PI*) (*Becton Dickinson Pharmingen, Germany*), натријум хлорид (*Zorka pharma hemija, Šabac, Srbija*), виабилити кит (L7011, *Invitrogen*), SYBR-14/PI (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*), диметил сулфоксид (*DMSO*), *DMEM*

(*Dulbeccos modified Eagles medium, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*). Метформин, нитроглицерин и сви други фармаколошки модулатори су додати непосредно пре третмана.

3.3. Тест вијабилности

3.3.1. *DET* тест

Како смо навели, у екперименту су коришћене само вијабилне ћелије. Да би се одредио њихов број, као и њихова вијабилност коришћен је *DET* тест (*Trypan Blue dye exclusion test*), тест одбацивања боје, са 0,1% трипан плавим [106]. Тест одбацивања боје се користи за одређивање броја преживелих ћелија присутних у суспензији ћелија. Тест се базира на чињеници да живе ћелије поседују нетакнуту ћелијску мембрану која одбацује боју, док мртве ћелије имају оштећену ћелијску мембрану која везују боју (трипан плаво) и боје се у плаво. По протоколу теста, суспензија ћелија се једноставно помеша са бојом, а затим се визуелно испитује да би се утврдило да ли ћелије узимају или одбацују боју. За пребројавање се користила Њубауерова (*Neubauer*) комора, док се пребројавање вршило на хемоцитометру на инвертном микроскопу.

Суспензија ћелије (50 μ l) је разблажена са (200 μ l) 0.5% трипан плавог разблаженог у физиолошком раствору и ћелије су се одмах пребројавале у хемоцитометру на инвертном микроскопу [107].

Да би се одредио број ћелија у 1 ml суспензије, неопходно је узети у обзир димензије коморе и степен разблажења:

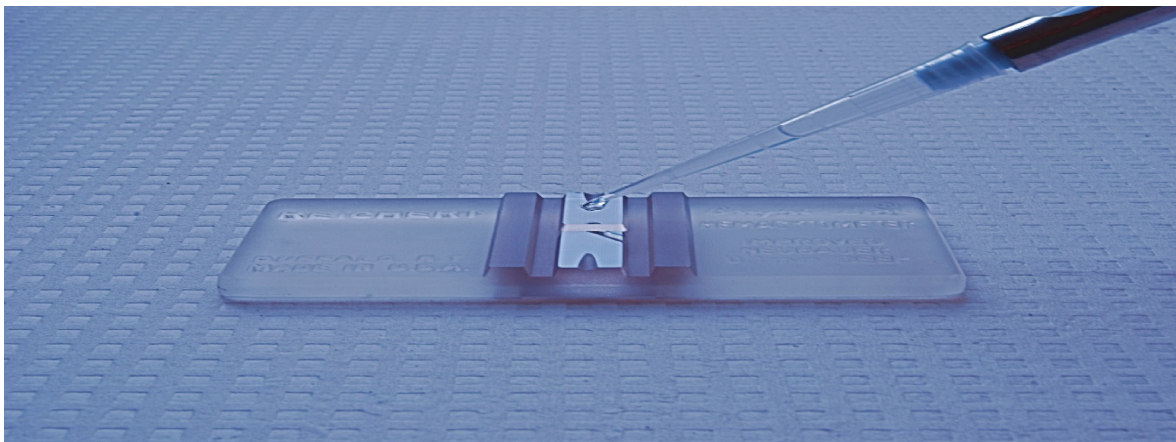
$$N = N_0 \times 10^4 \times 5$$

Где је: N - број живих ћелија у суспензији,

N_0 - број живих ћелија пребројаних у суспензији по квадрату коморе

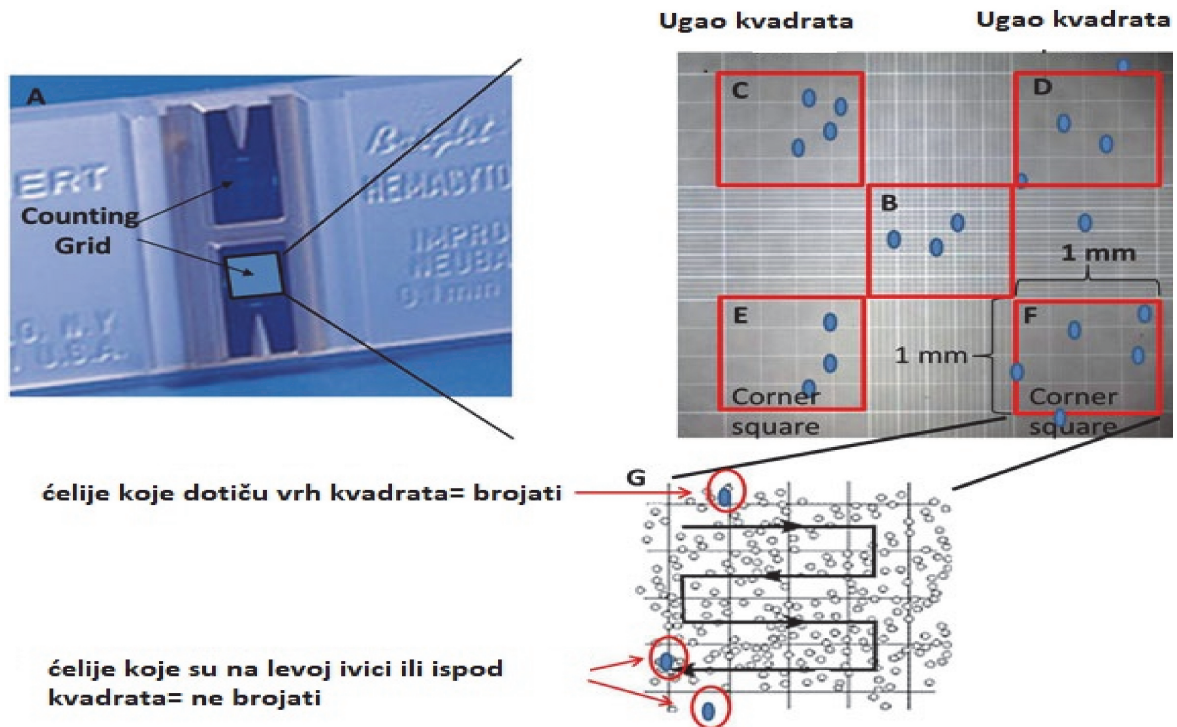
$10^4/ml$ - корекциони фактор

5 ml - фактор разблажења



Слика 13.

Извор: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer> [108]



Слика 14 :

$$V(\%) = (N_0/N_0 + M_0) \times 100$$

Где је M_0 број мртвих ћелија измерен по квадрату коморе хемоцитометра.

3.3.2. Сулфородамин Б-тест (SRB есеј)

In vitro испитивање утицаја метформина, нитроглицерина, 2-деокси-*D*-глукозе и кофеина на пролиферацију ћелија карцинома грлића материце (*HeLa*), ћелијској култури аденокарцинома плућа (*A549*) и ћелијској линији карцинома дебелог црева (*HT29*) испитивано је сулфородамидним тестом. Ћелије у експоненцијалној фази раста третиране су растућим концентрацијама метформина, нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе како би се утврдила дозна зависност цитотоксичног ефекта. Такође се проверила и временска зависност цитотоксичног ефекта мерењем 24 и 48 сати након третирања са сваком супстанцом. За испитивање цитотоксичности тестираних супстанци (појединачно и у комбинацијама) користио се и колориметријски SRB есеј (сулфородамин Б-тест). Ова метода по Шекану (*Skehan*), заснована је на мерењу садржаја ћелијских протеина, тако што се сулфородамидна боја везује за аминокиселинске остатке пореклом из протеина [109]. Ова метода је показала своју велику примену за испитивање цитотоксичности адхерентних ћелија. Након периода инкубације, ћелије у микротитар плочама са 96 отвора фиксирани су 10% раствором трихлоросирћетне киселине (*TRIS*) и обојене *SRB* бојом. Након 30 минута, вишак боје се уклања испирањем три пута са 1% сирћетном киселином. Ћелије се остављају на 25° C један сат да се осуше. Непосредно пре читавања резултата боја се екстрахује додатком *TRIS* пуфера. Апсорбанција се мери на 540 nm [110].

3.4. Одређивање параметара ћелијске смрти

Одређивање параметара ћелијске смрти анализирани методом проточне цитометрије, анексин В-изоцијанатом, обавио се на *Guava Easy Cyte* проточном цитометру (*Guava Technologies, Hayward, California, SAD*). У свим узорцима анализирано је најмање 10.000 честица.

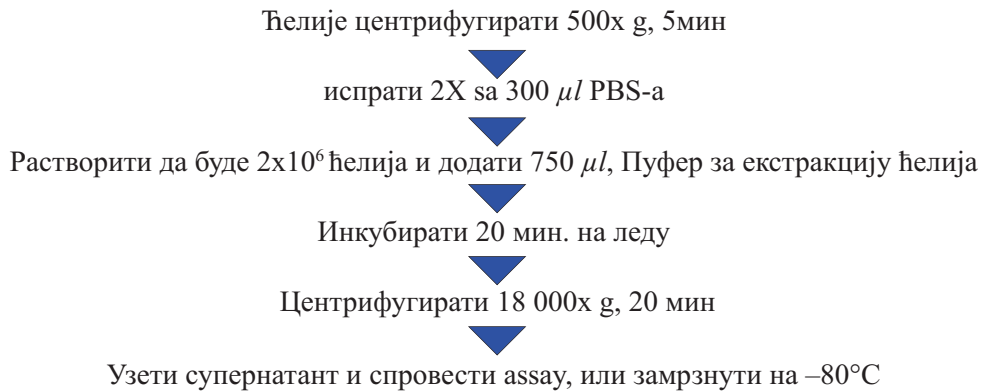
3.4.1. Анексин В-изоцијанатни тест

Апоптоза је нормалан физиолошки процес који се јавља током ембрионалног развоја, као и при одржавању ткивне хомеостазе. Апоптотички програм карактеришу одређене морфолошке особине, укључујући губитак асиметрије и везивања плазма мембране, кондензацију цитоплазме и нуклеуса, и интернуклеозомско цепање *DNK*. Губитак плазма мембране је једна од најранијих карактеристика. У раним фазама апоптозе јављују се промене на површини ћелије. Једна од ових промена плазма мембране је транслокација фосфатидилсерина (*PS*) са унутрашње стране плазма мембране на спољни слој, помоћу кога *PS* постаје изложен на спољној површини ћелије. Анексин В је Ca^{2+} зависни протеин, мале молекулске масе 35-36 *kDa*, који везује фосфолипид са високим афинитетом за *PS*. Због тога се овај протеин може користити као осетљива сонда за изложеност *PS* на ћелијској мембрани. Превођење *PS* на спољашњу ћелијску површину није специфично за апоптозу, већ се јавља и код ћелијске некрозе. Разлика између ова два облика ћелијске смрти је да током почетних фаза апоптозе ћелијска мембрана остаје нетакнута, док у тренутку када се јавља некроза ћелијска мембрана губи свој интегритет и постаје непропусна. Према томе, мерење везивања Анекса В на површину ћелије да би било индикативно за апоптозу мора бити изведено у комбинацији с тестом искључења боје ради утврђивања интегритета ћелијске мембране [111]. Анексин *B-FITS* је обележен флуоросцентним изоцијанатом (*FITS*) и који након побуђивања светлошћу аргонског ласера на *Guava Easy Cyte* апарату емитује зелену светлост. Пропиридијум јодид не може да прође кроз очувану ћелијску мембрану и он се под дејством аргонског ласера боји црвено. Очитавање се врши на 488 *nm* таласне дужине. Како се екстернализација фосфолипида јавља у ранијим фазама апоптозе, анексин *B-FITS* може идентификовати апоптозу на раном стадијуму, док се за потврду касне апоптозе и некрозе користи бојење пропиридијум јодидом (*PI*) [112]. Пропиридијум јодид се везује за нуклеотиде денатуриране *DNK*, али не може проћи кроз очувану ћелијску мембрану. Живе ћелије са нетакнутим мембранама искључују *PI*, при чему мембране мртвих и оштећених ћелија пропуштају *PI* [113]. Тако разликујемо ћелије које су живе су *FITS* Анексин *B* и *PI* негативни (анексин V^{-}/PI^{-}); ћелије које су у раној апоптози су *FITS* Анексин *B* позитиван и *PI* негативно (анексин V^{+}/PI^{-}); и ћелије које су у касној апоптози или су већ мртве, су и *FITS* Анексин *B* и *PI* позитивне (анексин V^{+}/PI^{+}). Бојање ћелија се вршило према протоколу произвођача (*BD Pharmingen, San Diego, CA*). Након периода инкубације ћелије су трипсинизирани и пребачени из пластичних флакона (25 *ml*) у одговарајуће епрувете (*BD Falcon*). Узорци су затим центрифугирани (*Eppendor 4564, Germany*, 250 г, 4°C, 5 минута). Супернатант је испиран (*PBS*) и седимент је

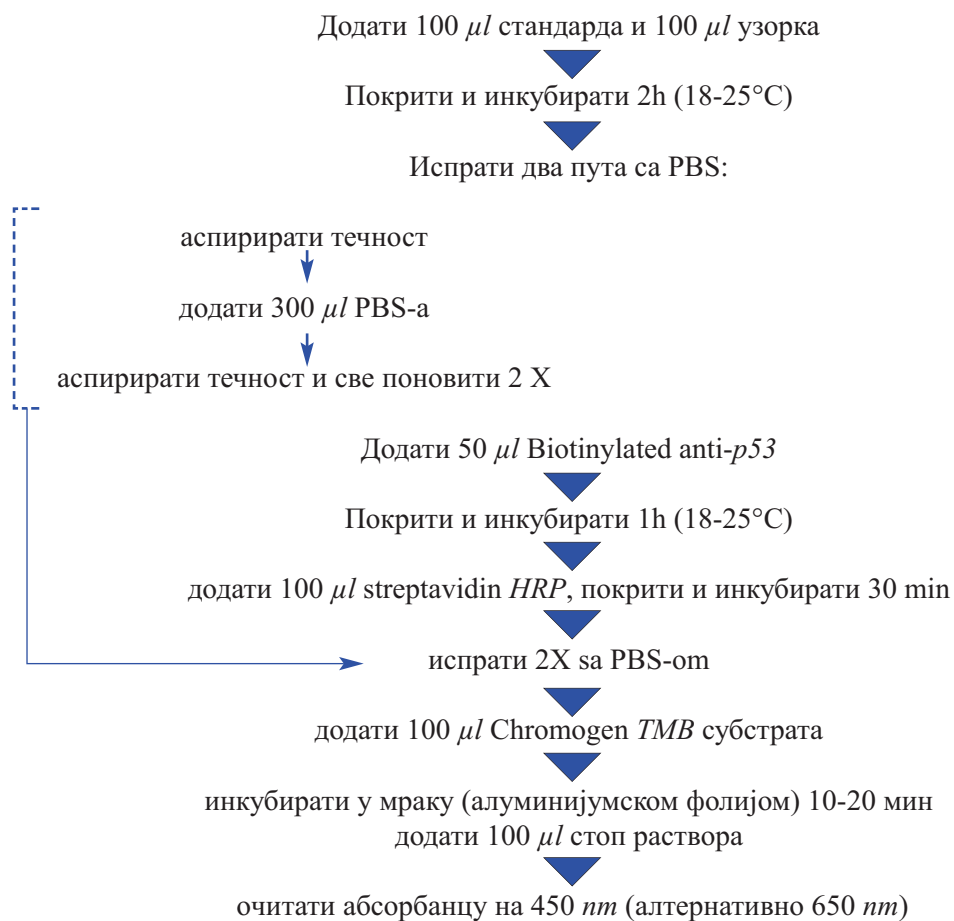
ресуспендиран додавањем пуфера за везивање боје (1X) и пажљиво хомогенизован на *Vortex* апарату. Процедура испирања и центрифугирања понављена је два пута. Након тога пребачено је 100 μ l раствора у епрувете од 5 ml и додато 5 μ l анаксин *B-FITS* и 5 μ l *PI*, нежно вортковано и инкубирано 15 минута на 25° C у мраку. По истеку инкубације у сваку епрувету је додато 400 μ l пуфера за везивање боје и читавање је вршено у року од 1 сата.

3.5. Одређивање тумор-супресорских гена

In vitro испитивање тумор-супресорског гена на ћелијској линији карцинома грлића материце (*HeLa*) дејством метформина извело се *ELISA* (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) техником. Ензимски имуносорбентни тест (*ELISA*) је снажан метод за детекцију и квантификацију специфичног протеина узорцима. Првобитно су је описали Енгвал (*Engvall*) и Перлман (*Perlmann*) [114], почетком седамдесетих година, као метод који омогућава анализу узорка протеина имобилизоване у бунарчићима користећи специфична антитела. Код *ELISA* технике, детектује се један протеин (тј. антиген и/ или тумор-супресорски ген) чије се присуство квантитативно и квалитативно анализира). Узорци, укључујући стандарде познатих *p53* концентрације, контролни узорци или узорци се пипетирају у ове бунаре. Током прве инкубације, стандарди или узорци и абиотиниловано моноклонско антитело специфично за *p53* су истовремено инкубирана. Након прања, ензим Стрептавидин-*HRP*, који се везује за биотиниловано антитело се додаје, инкубира и опере. *TMB* додаје се супстратни раствор који делује на везани ензим да индукује обојени производ реакције. Интензитет овог обојеног производа је директно пропорционално концентрацији *p53* присутне у узорцима. У првом кораку инкубације, *p53* из узорка се везује за површину микротитарске плоче, а пероксидазни когуњат (*POD*), антитело за детекцију интерреагује са имобилисаним *p53*. Током наредног корака испирања врши се детекција са колориметријским супстратом тетраметилбензидином (*TMB*), а детекција се врши спектрофотометријски [115]. За извођење овог метода, коришћене су плоче са 96 бунара (*Sarstedt, Nümbrecht, Germany*). *ELISA* тест се спроводи по упутству произвођача *Abcam (Abcam, Cambridge, UK)*. Пре употребе, најпре су припремљени сви стандарди и реагенси а потом је додато 100 μ l стандарда у сваки бунарчић док је у одговарајуће бунарчиће додато 100 μ l контролног раствора. По завршетку периода инкубације, 2 сата на собној температури (18-25° C), у супернатант је додато је 300 μ l пуфера за испирање и читав поступак испирања је поновљен два пута. Додато је 50 μ l биотинилованог анти-*p53* у све бунаре и инкубирано у мраку 1 сат на собној температури (18-25° C). У наредном кораку поновити испирање са пуфером за испирање. Додати 100 μ l стрептавидин-*HRP* раствора у све бунаре, укључујући и у слепу пробу, и инкубирати у мраку на собној температури 30 минута. Поново испрати два пута са раствором за испирање. У наредном кораку додати 100 μ l раствора супстрата хромоген *TMB* и инкубирати у мраку максимално 20 минута на собној температури. По истеку инкубације а непосредно пред читавање додати 100 μ l стоп раствора у сваки бунарчић. Читавање се врши на спектрофотометру користећи 450 nm.



Шема 1. Припрема узорака по *ABCAM*-у за *ELISA* тест одређивања *p53*



Шема 2. *ELISA* тест по *ABCAM*-у за одређивање *p53*

3.6. Фотографисање ћелијских култура

Различите ћелијске културе су фотографисане аутоматски *Olympus BX40* фотоапаратом. а уз одговарајући софтвер за преношење слика (*Olympus, SP/500 UZ, Japan*) су архивирани слике направљене на имунофлуоресцентном микроскопу са великим увеличањем.

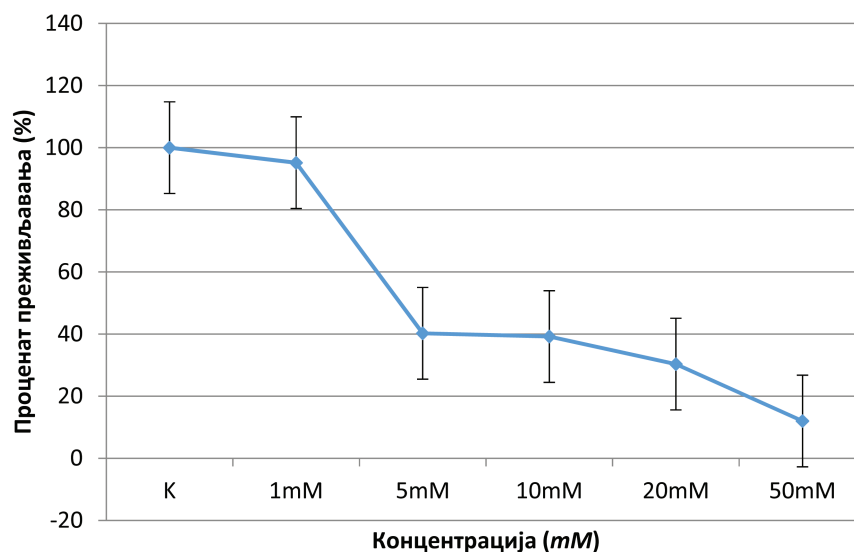
4. РЕЗУЛТАТИ

Да би се испитао цитотоксични ефекат метформина, нитроглицерина, 2-деокси-*D*-глюкозе и кофеина, на ћелијским културама карцинома грлића материце (*HeLa*), аденокарцинома плућа (*A549*) и карцинома дебелог црева (*HT29*) примењивао се *SRB* тест. Овим тестом је анализиран ефекат растућих концентрација на инхибицију преживљавања ћелијских линија након 24-часовног третмана као и након 48-часовног третмана. Ово испитивање се вршило и на контролној ћелијској линији, ћелијској култури нормалних фибробласта плућа (*MRC5*). Проточном цитофлуориметријом је потврђен снажан ефекат метформина на пораст броја ћелија карцинома грлића материце (*HeLa*) у апоптози и некрози, док је *ELISA* тестом потврђена повећана експресија *p53* на истој ћелијској култури.

4.1. Цитотоксичност метформина

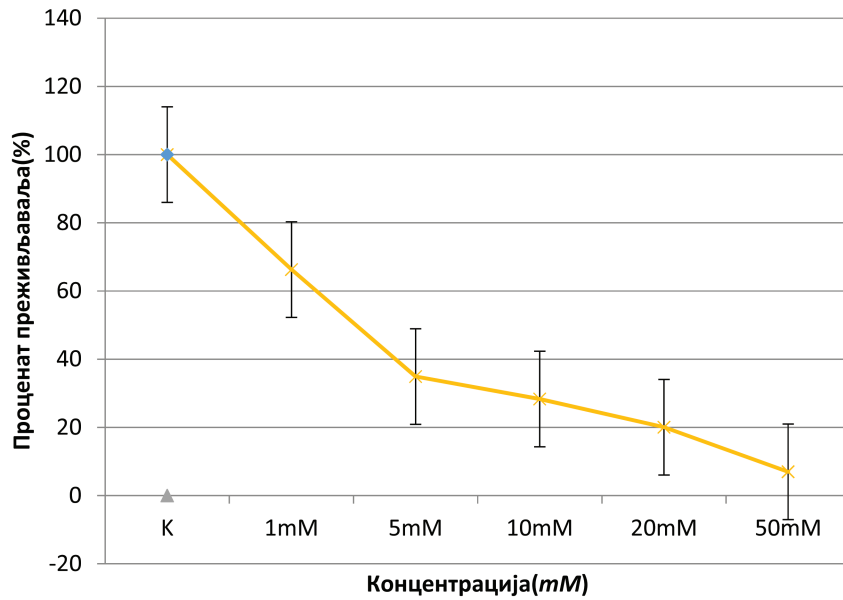
4.1.1. Цитотоксичност метформина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*)

У студији испитивања цитотоксичности метформина на ћелијској култури хуманог карцинома цервикса (*HeLa*), прво је испитиван распон концентрације од 50 μM до 50 mM . У првом делу студије, опсег је одређен између милимолских (mM) и микромолских (μM) концентрација. Цитотоксичност је испитана у концентрацијама од 1 mM , 5 mM , 10 mM , 20 mM и 50 mM (Графикон 7, Графикон 8).



Графикон 7. Цитотоксични ефекат дејства метформина након 24 h дејства на *HeLa* ћелијској култури

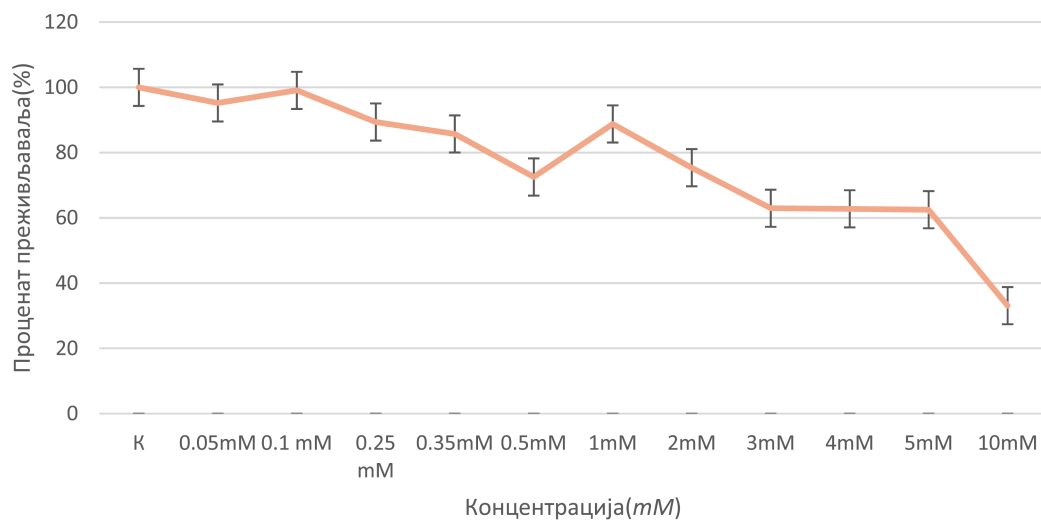
Одређена IC_{50} након 24 h третмана је 7,46 mM .



Графикон 8. Цитотоксични ефекат дејства метформина након 48 h дејства на HeLa ћелијској култури

Одређена IC_{50} након 48 h третмана је 2,55 mM.

На основу добијених података о дозно-зависној инхибицији раста ћелијских култура, израчунате су вредности IC_{50} , а у наставку експеримента ова вредност послужила је као индикатор избора концентрација за даља испитивања. У следећем кораку проучавана је цитотоксичност метформина у 11 концентрација и то при концентрацијама: 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 350 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM и 10 mM (Графикон 9).

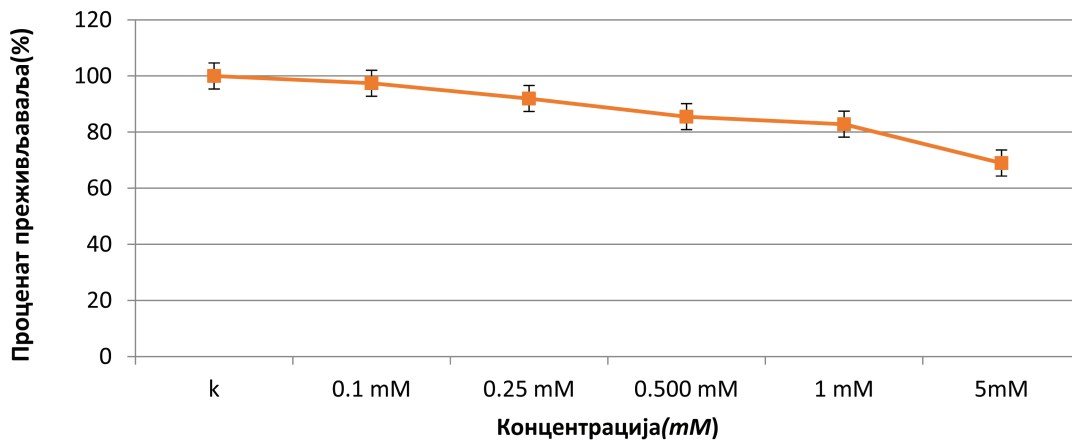


Графикон 9. Цитотоксични ефекат метформина након 24 h третмана на HeLa ћелијској култури, дејством 11 концентрација

Одређена IC_{50} након 24 h третмана је IC_{50} = 6,036 mM. При дејству метформина на 11 концентрација и при временској инкубацији од 48 h добијен је IC_{50} = 2,28 mM.

4.1.2. Цитотоксичност метформина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549)

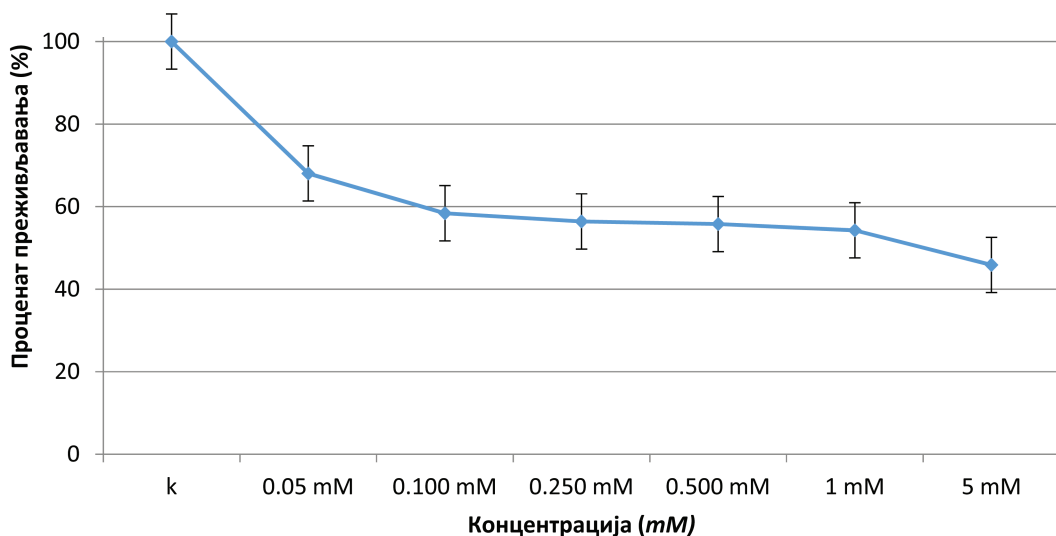
Деловањем метформина на ћелијској култури хуманог аденокарцинома плућа највећи цитотоксични ефекат постигнут је коришћењем концентрације од 5 *mM*. Дозна зависност је забележена те се повећава цитотоксичност са повећањем концентрације, од микромолских ка милимолским, и дошло је до наглог пада процента преживелих ћелија (Графикон 10).



Графикон 10. Ефекат на ћелијској култури аденокарцинома плућа након 24 *h* третмана метформина

Одређена IC_{50} након 24 *h* третмана метформина је 14,79 *mM*.

Временском инкубацијом, цитотоксични ефекат се повећава али је и даље присутан исти тренд, па долази до драстичног пада у броју преживелих ћелија преласком са микромолских на милимолске концентрације (Графикон 11).

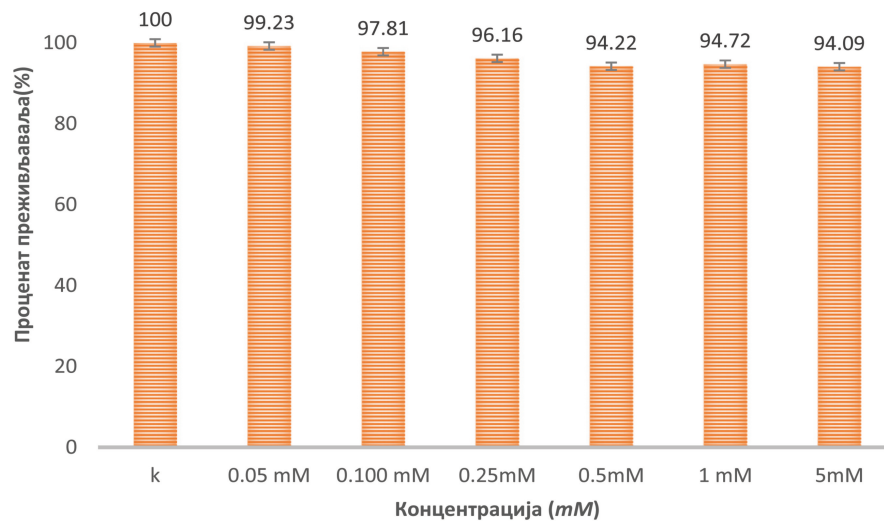


Графикон 11. Ефекат на ћелијској култури аденокарцинома плућа након 48 *h* третмана метформинем

Одређена IC_{50} након 48 *h* третмана је 3,30 *mM*.

4.1.3. Цитотоксичност метформина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*)

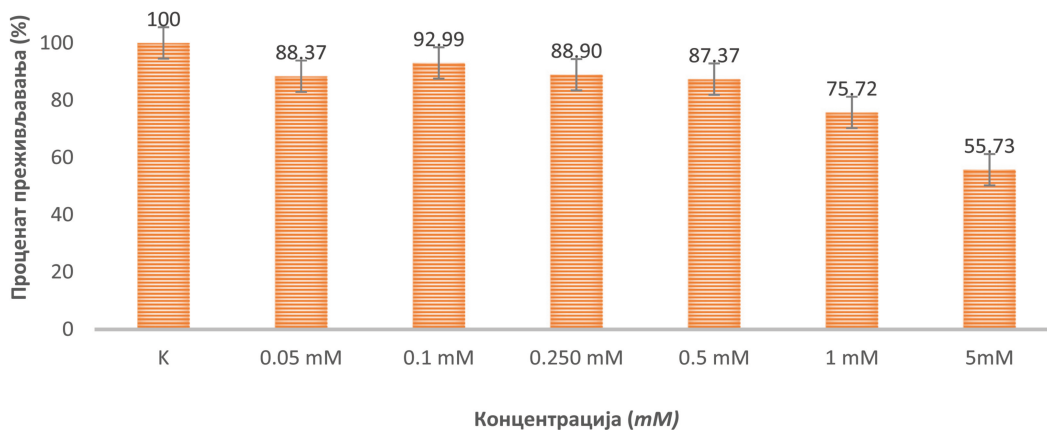
Цитотоксично дејство метформина на хуманој *HT29* ћелијској линији карцинома дебелог црева испитано је *SRB* тестом. Овим тестом је анализиран ефекат растућих концентрација метформина на инхибицију раста ћелијских линија након 24 часа третмана. Резултати су представљени у Графикону 12. На основу добијених података закључено је да је метформин неактивна супстанца, при примењеним концентрацијама.



Графикон 12. Ефекат на ћелијској култури карцинома дебелог црева након 24 h третмана метформина

Одређена IC_{50} након 24 h третмана је 26,53 mM.

Временском инкубацијом, цитотоксични ефекат се драстично повећава, постоји исти тренд, али долази до драстичног пада броја преживелих ћелија преласком са микромолских на милимолске концентрације (Графикон 13). Дејством метформина у концентрацији од 5 mM долази до преживљавања 55,73% ћелија.

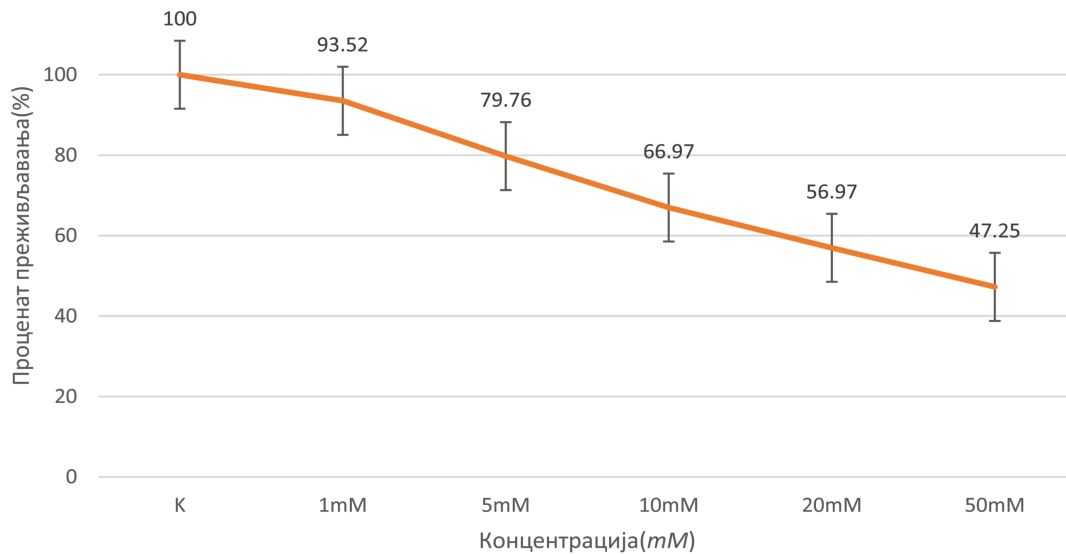


Графикон 13. Ефекат на ћелијској култури карцинома дебелог црева након 48 h третмана метформина

На основу добијених података о дозно-зависној инхибицији раста ћелијских култура израчуната IC_{50} је 10,54 mM.

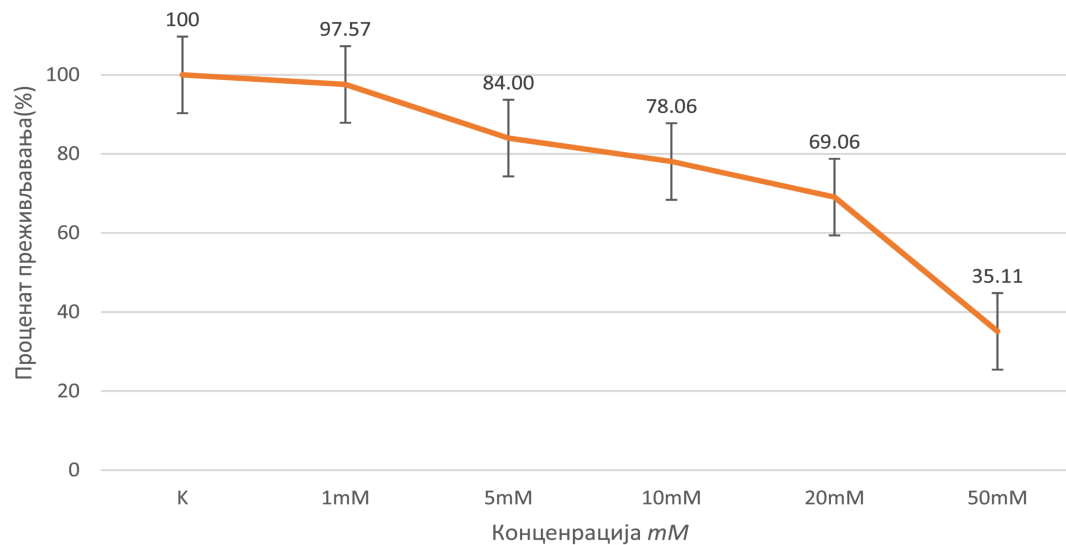
4.1.4. Цитотоксичност метформина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*)

Цитотоксичност метформина праћена је на хуманој ћелијској култури нормалних фибробласта плућа (*MRC5*), у растућим концентрацијама од 1mM до 50mM као што је приказано на Графикону 14. Драстичан пад броја преживелих био је само при концентрацији од 50mM при којој је 47% ћелија преживело, што је потврђено и касније израчунатим вредностима IC_{50} од $33,46\text{mM}$.



Графикон 14. Ефекат на ћелијској култури нормалних фибробласта плућа након 24 h третмана метформина

Инкубација током времена доводи до повећања цитотоксичности, али опет можемо рећи да метформин за примењене концентрације није цитотоксичан, што се види из Графикана 15. Такође одређена је концентрација при којој је преживело 50% здравих фибробласта плућа. То је концентрација од $33,46\text{mM}$.

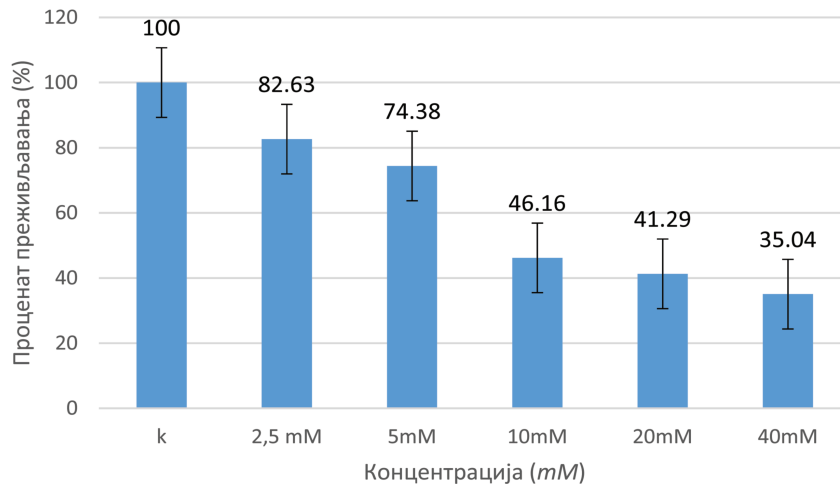


Графикон 15. Ефекат на ћелијској култури нормалних фибробласта плућа након 48 h третмана метформина

4.2. Цитотоксичност 2-Деокси-*D*-глюкозе

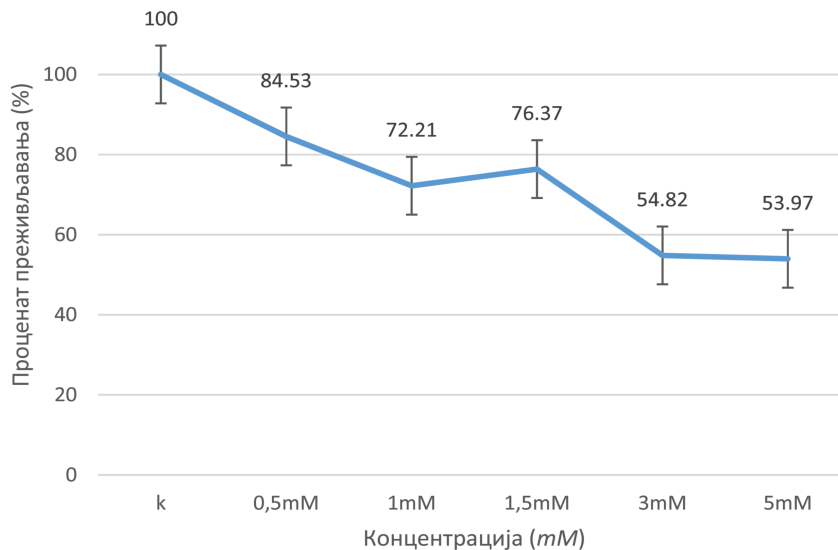
4.2.1. Цитотоксичност 2-Деокси-*D*-глюкозе праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*)

Приликом испитивања цитотоксичности 2-деокси-*D*-глюкозе на ћелијској култури хуманог карцинома цервикса (*HeLa*), прво је испитиван распон концентрације од 2,5 *mM* до 40 *mM* (Графикон 16). На основу испитивања у првом делу, одређен је IC_{50} те је у даљем току експеримента одређиван ефекат при примењеним концентрацијама између 0,5 *mM* и 5 *mM* (Графикон 17 и Графикон 18).



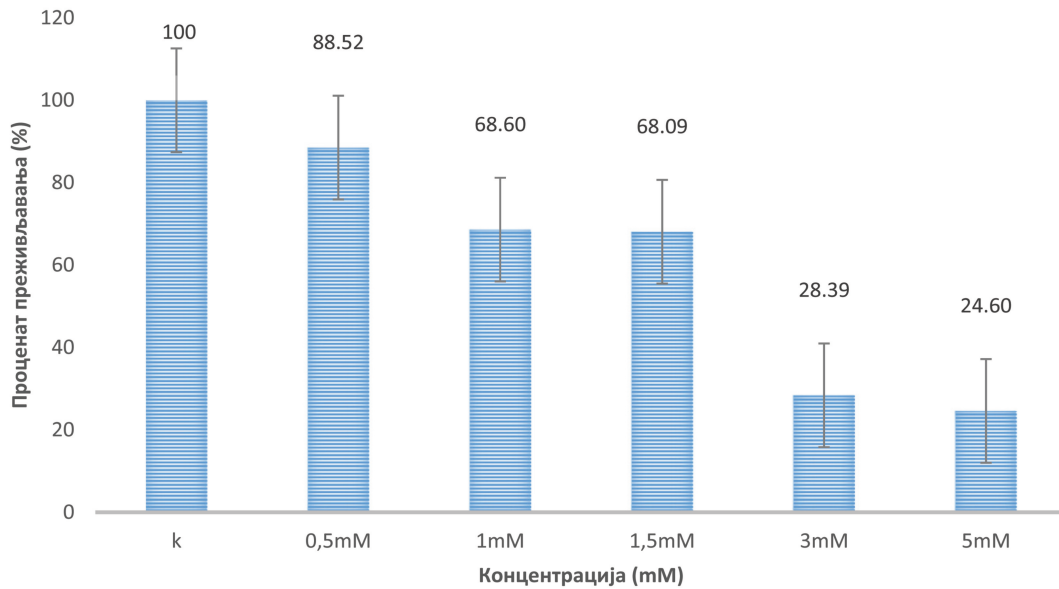
Графикон 16. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома цервикса након 24 *h* третмана 2-деокси-*D*-глюкозом, при првом одређивању опсега концентрација које показују цитотоксичан ефекат

Након 24 *h* третманом ћелијске културе карцинома цервикса 2-деокси-*D*-глюкозом, дејством концентрације од 5 *mM* проценат преживелих ћелија је само је 53,97%. Одређена IC_{50} при временској инкубацији од 24 *h* је 5,45 *mM* (Графикон 17).



Графикон 17. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома цервикса након 24 *h* третмана 2-деокси-*D*-глюкозом

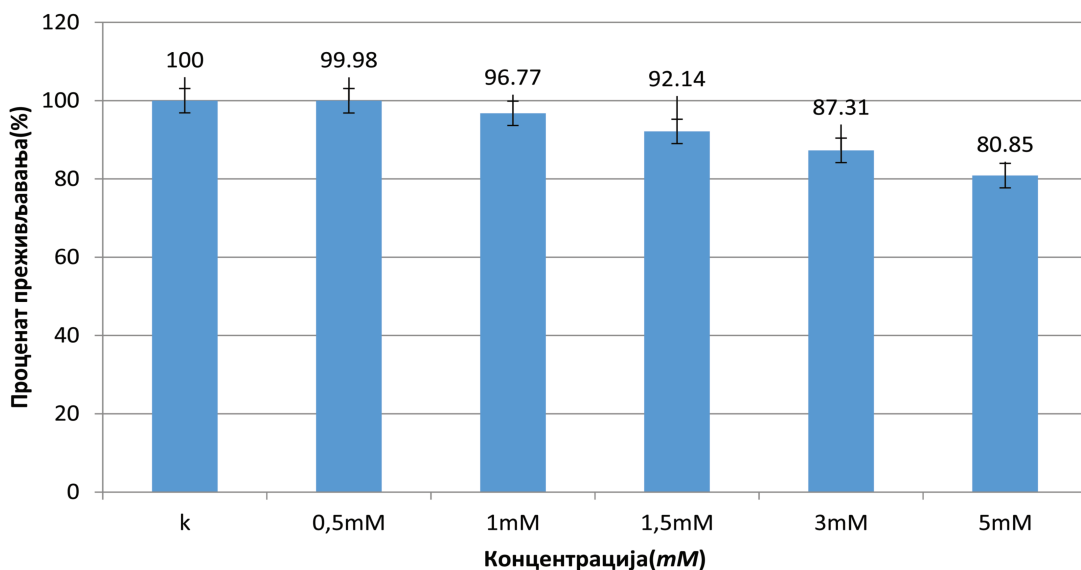
Продужевањем инкубације при вишим концентрацијама 2-деокси-*D*-глюкозе долази до драстичног пада у броју преживелих ћелија. Као што се и види на Графикону 18, драстичан пад настаје при концентрацијама од 3 *mM* и вишим. Одређена IC_{50} након 48 *h* третмана 2-деокси-*D*-глюкозом је 2,01 *mM*.



Графикон 18. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома цервикса након 48 *h* третмана 2-деокси-*D*-глюкозом

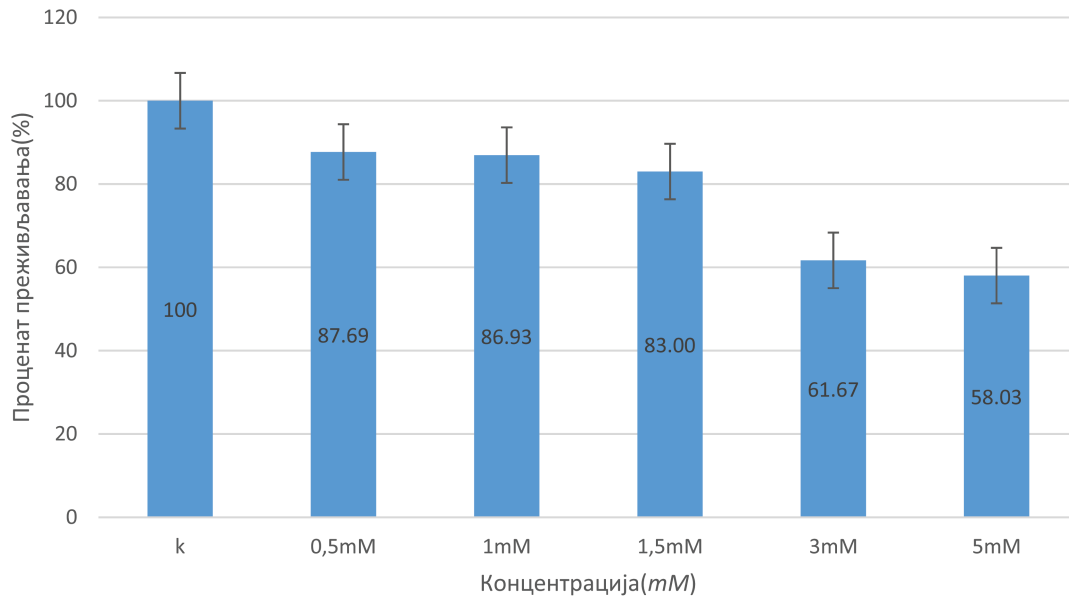
4.2.2. Цитотоксичност 2-Деокси-*D*-глюкоза праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (*A549*)

Дејством 2-деокси-*D*-глюкозом на ћелијску културу аденокарцинома плућа при 24 *h* третману није забележено снажно цитотоксично дејство, као што се и види на Графикону 19. Одређена IC_{50} је 4,97 *mM*.



Графикон 19. Ефекат на ћелијској линији аденокарцинома плућа након 24 *h* третмана са 2-деокси-*D*-глюкозом

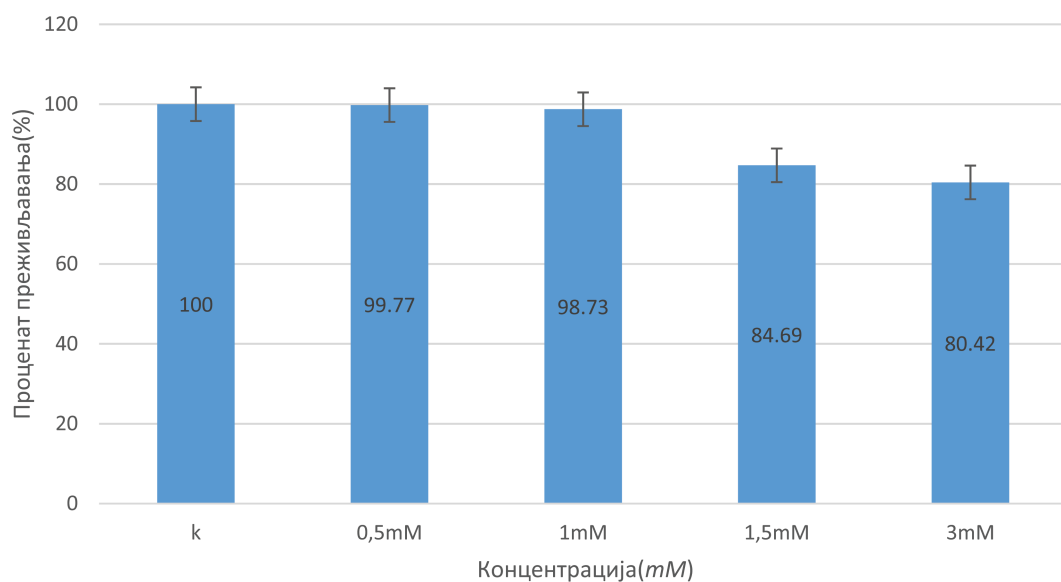
Продужавањем инкубације током 48 *h* потврђен је исти тренд цитотоксичности само са ипак донекле потентнијим ефектом, те је далеко мањи проценат преживелих ћелија након овог третмана, што је и показано на Графикону 20. Одређена IC_{50} је 5,44 *mM*.



Графикон 20. Ефекат на ћелијској линији аденокарцинома плућа након 48 *h* третмана са 2-деокси-*D*-глюкозом

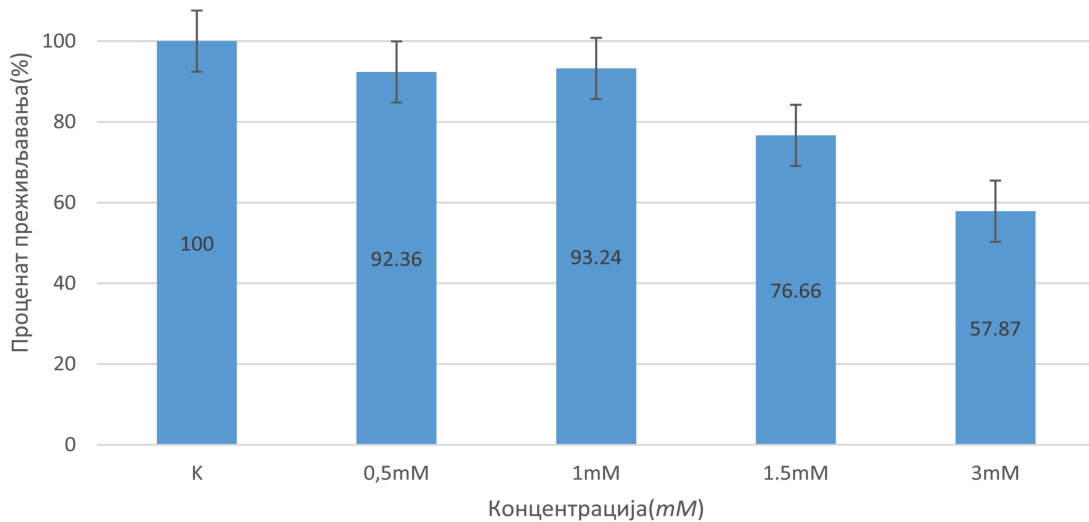
4.2.3. Цитотоксичност 2-Деокси-*D*-глюкозе праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*)

Испитивањем дејства 2-деокси-*D*-глюкозе на ћелијску културу хуманог карцинома дебелог црева при 24-часовном третману није забележено снажно цитотоксично дејство, при концентрацијама од 0,5 и 1 *mM* као што се и види на Графикону 21, IC_{50} износи 3,4 *mM*.



Графикон 21. Цитотоксичан ефекат дејства 2-деокси-*D*-глюкозе након 24 *h* третмана на *HT29* ћелијској култури

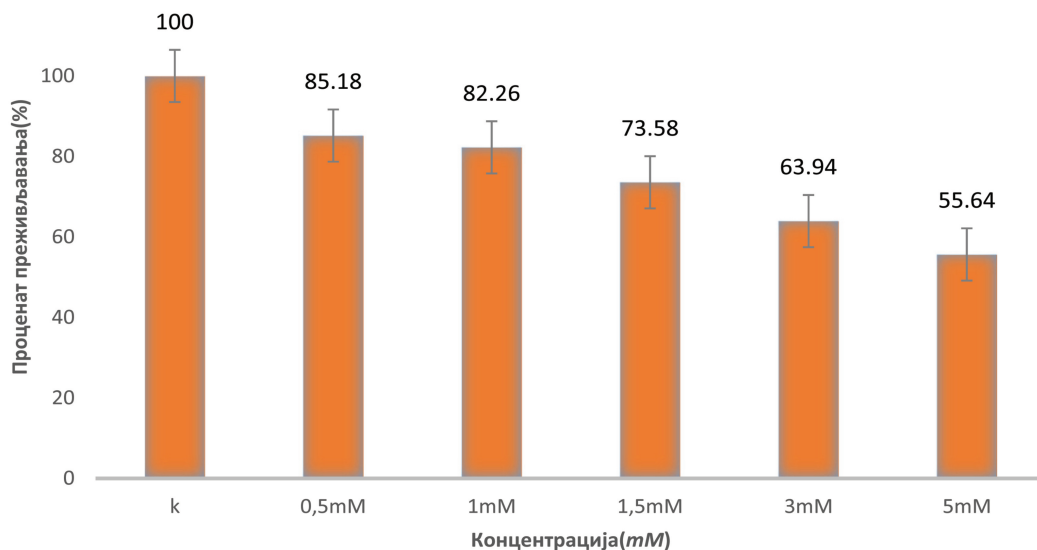
Након 48-часовног третмана, забележен је исти тренд у броју преживелих ћелија, али са ипак снажнијим ефектом при дејству концентрација од 1,5 mM и 3 mM у односу на 24-часовни третман, као што је и показано на Графикону 22. Одређени IC_{50} је 4,25 mM.



Графикон 22. Цитотоксични ефекат дејства 2-деокси-*D*-глюкозе након 48-часовног дејства на *HT29* ћелијској култури

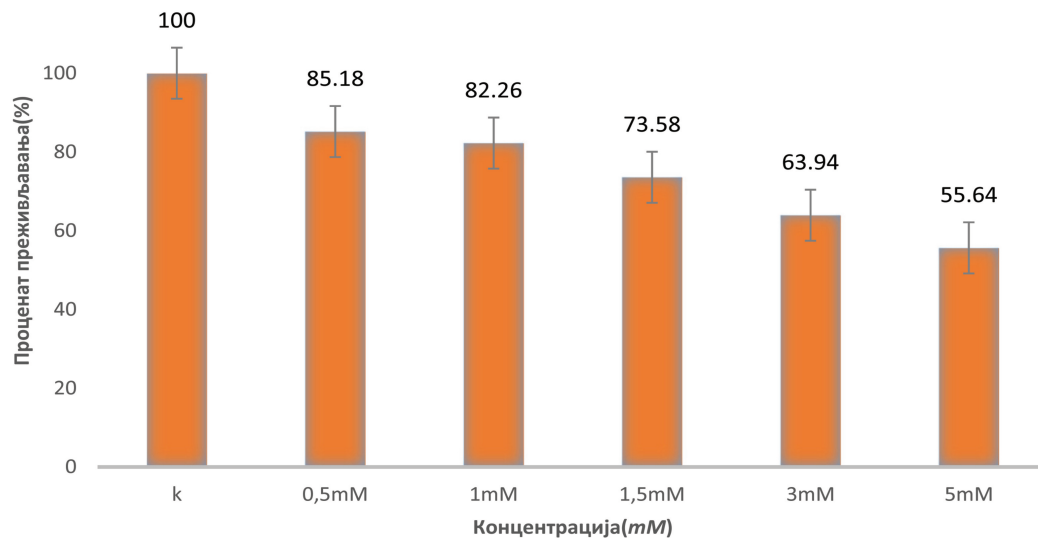
4.2.4. Цитотоксичност 2-Деокси-*D*-глюкозе праћена *SRB* тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*)

Посматрајући Графикон 23, на први поглед *MRC5* делује да је осетљивија ћелијска култура од *HeLa*, *HT29* и *A549*, али детаљно израчунавањем у програму *CalcuSyn* је потврђено да је *MRC5* стабилнија од наведених ћелијских култура дејством 2-деокси-*D*-глюкозом. Дејством 2-деокси-*D*-глюкозом при концентрацијама од 0,5 mM, на здравим фибробластима плућа забележено је преживљавање код 85% ћелија, а сличан проценат преживљавања забележен је дејством исте концентрације *2DG*-а и на ћелијској култури



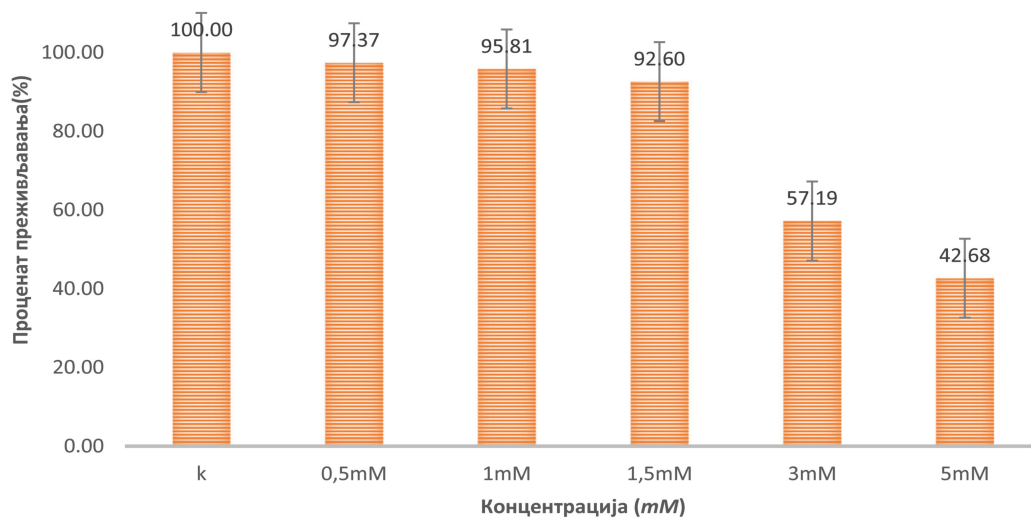
Графикон 22. Цитотоксични ефекат дејства 2-деокси-*D*-глюкозе након 48-часовног дејства на *HT29* ћелијској култури

карцинома цервикса, колона и аденокарцинома плућа: 84%, 99% и 99% ретроградно. Процент преживелих ћелија драстично се смањује са повећањем концентрације те код карцинома цервикса дејством 2DG-а у дози од 5 mM је 53% ћелија преживело, а код аденокарцинома плућа и карцинома колона дејством концентрације од 3 mM преживљавање је 80%. Процент преживљавања код здравих фибробласти плућа дејством концентрације од 5 mM је 55% (Графикон 23). Израчунавањем је добијено IC_{50} од 5,45 mM, 5,44 mM и 3,4 mM за аденокарцином цервикса, плућа и колона, ретроградно, док је IC_{50} за здраве фибробласте плућа добијена далеко већа вредност 7,05 mM.



Графикон 23. Цитотоксичан ефекат дејства 2-Деокси-D-глюкозе након 24 h третмана на MRC5 ћелијској култури

Временском инкубацијом при концентрацијама 0,5 mM, 1 mM и 1,5 mM готово да ни не постоји пад процента преживелих ћелија док при већим концентрацијама од 3 mM и од 5 mM процент преживелих ћелија пада на 57,19% и 42,68%, као што је приказано на Графикону 24.



Графикон 24. Цитотоксичан ефекат дејства 2-Деокси-D-глюкозе након 48-часовног третмана на MRC5 ћелијској култури.

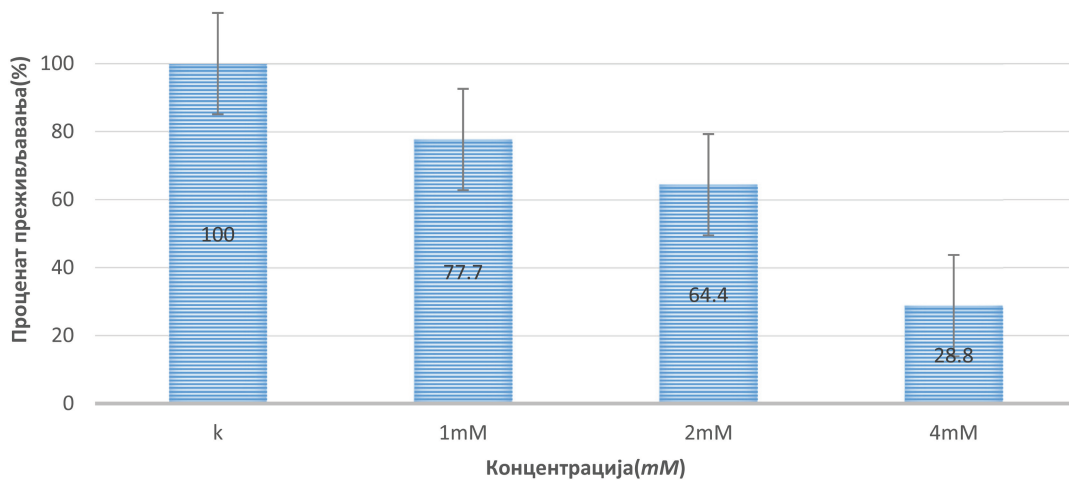
Одређена IC_{50} је 4,58 mM.

4.3. Цитотоксичност кофеина

Како смо истакли у поглављу 1.6, постоје епидемиолошки али и експериментални подаци о потенцијалној антипролиферативној активности кофеина, те смо се, на основу података из литературе, одлучили за примену кофеина у концентрацијама од 1 *mM*, 2 *mM* и 4 *mM*.

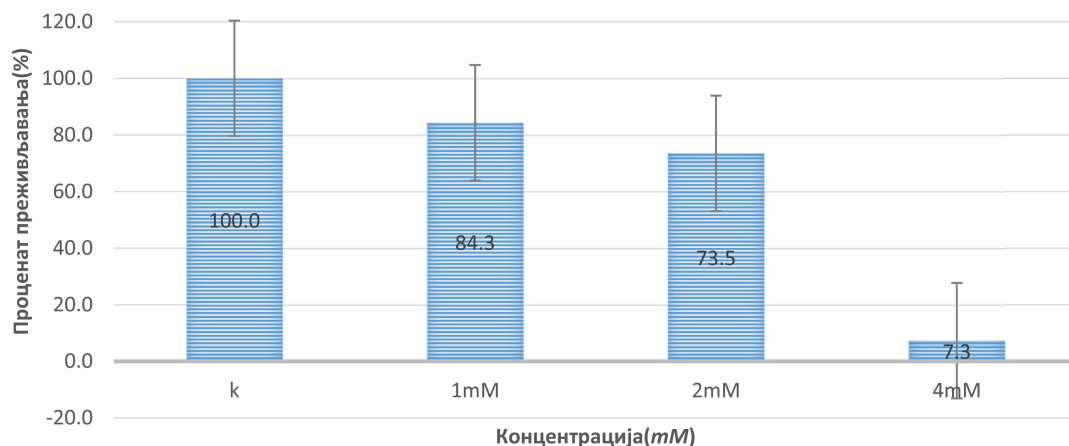
4.3.1. Цитотоксичност кофеина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*)

Дејством кофеина на *HeLa* ћелијској култури већ при концентрацијама од 1 *mM* при 24-часовном третману показан је снажан цитотоксичан ефекат, као што се види на Графикону 25. Одређени IC_{50} програмом *CalcuSyn* је 2,44 *mM*.



Графикон 25. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома цервикса након 24-часовног третмана кофеином

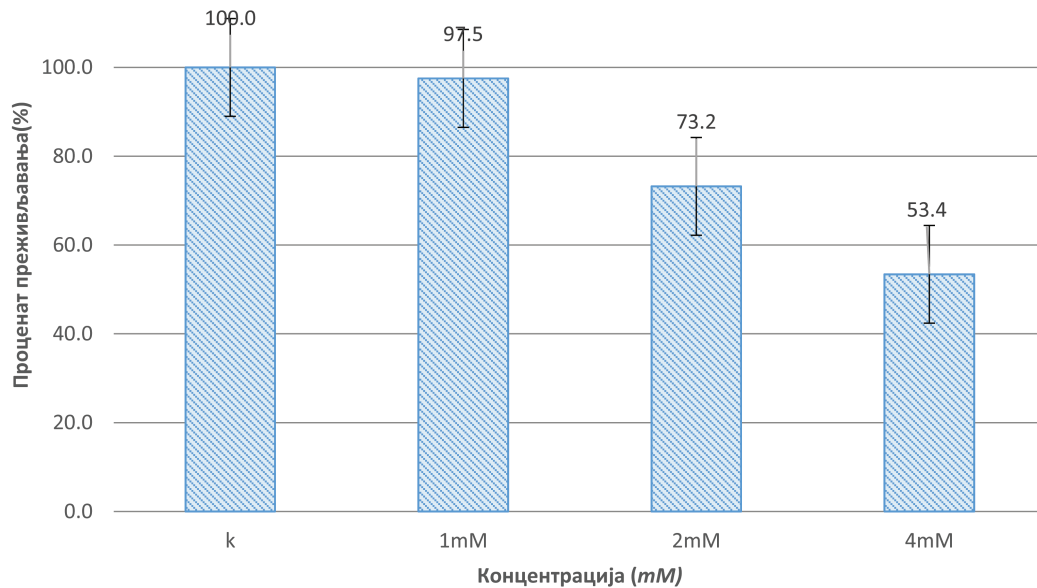
При 48-часовном третману је забележен далеко снажнији цитотоксични ефекат, те је при концентрацији од 4 *mM* евидентирано само 7% преживелих ћелија *HeLa* ћелијске културе, приказано на Графикону 26. Одређени IC_{50} је 2,03 *mM*.



Графикон 26. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома цервикса након 48-часовног третмана кофеином

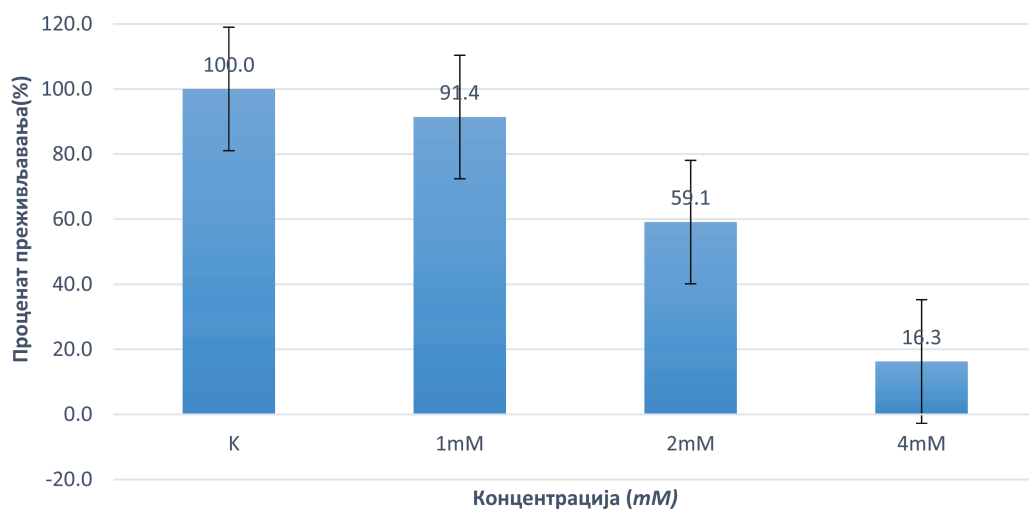
4.3.2. Цитотоксичност кофеина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549)

Дејством кофеина на ћелијску културу хуманог карцинома колона није забележен велики пад у броју преживелих ћелија при дејству концентрације од 1 *mM*, али је значајан пад у броју преживелих ћелија забележен при дејству концентрација од 4 *mM*, као што је показано на Графикону 27. Одређени IC_{50} је 3,38 *mM*.



Графикон 27. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома колона након 24- часовног третмана кофеином

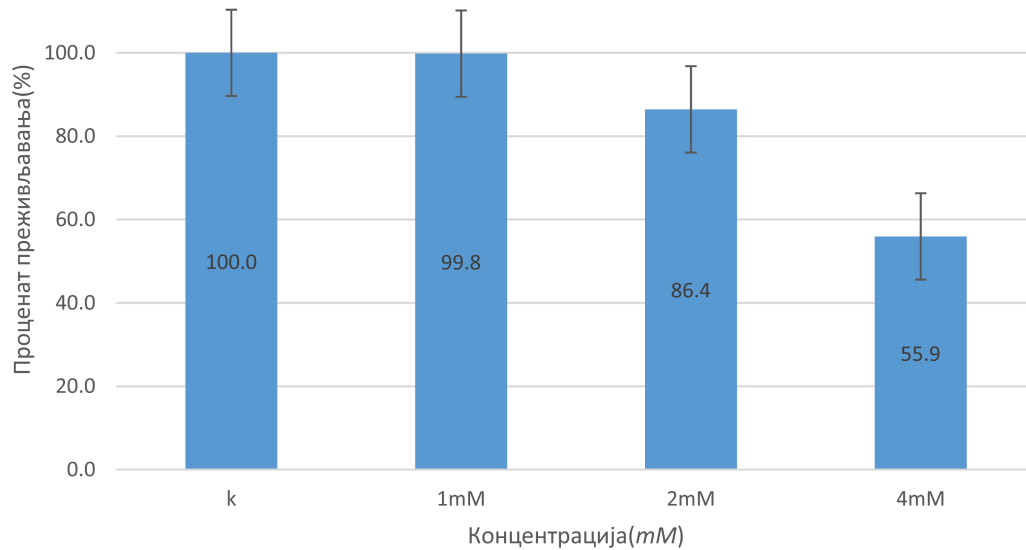
Продужењем инкубације је појачано дејство већ при концентрацији од 2 *mM*, Графикон 28, где је евидентирано преживљавање од само 59%, док је при двоструко јачој концентрацији проценат преживелих ћелија хуманог карцинома колона 16%, што се види на Графикону 28. Одређени IC_{50} је 2,44 *mM*.



Графикон 28. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома цервикса након 48- часовног третмана кофеином

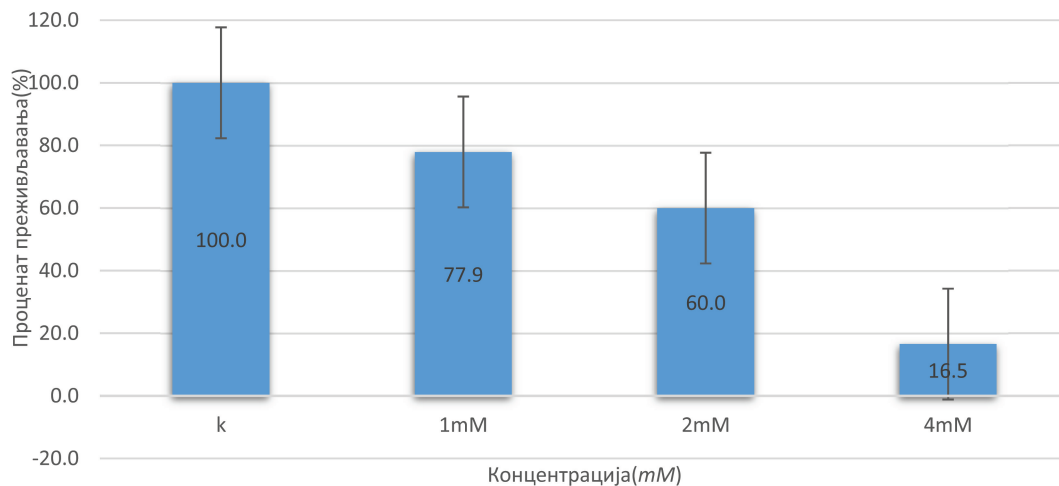
4.3.3. Цитотоксичност кофеина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*)

На ћелијској култури хуманог карцинома колона, дејством кофеина при мањим концентрацијама од 1 *mM* и 2 *mM*, није забележен значајнији пад у броју преживелих ћелија, већ тек при концентрацији од 4 *mM*, где је проценат преживелих ћелија 55,9% (Графикон 29). Одређена IC_{50} је 3,41 *mM*.



Графикон 29. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева након 24-часовног третмана кофеином

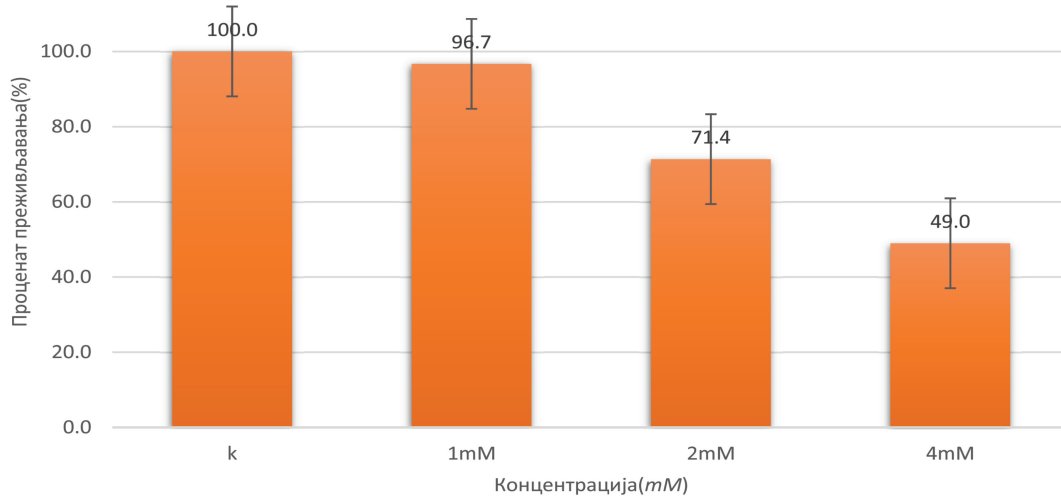
Продуженом инкубацијом, на ћелијској култури хуманог карцинома колона, дејством кофеина и при мањим концентрацијама од 1 *mM* и 2 *mM*, забележен је значајнији пад у проценту преживелих ћелија, 77,9% и 60%, ретроспективно, док је при концентрацији од 4 *mM*, проценат преживелих ћелија само 16,5%, што је и показано на Графикону 30. Одређени IC_{50} је 2,01 *mM*.



Графикон 30. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева након 48-часовног третмана кофеином.

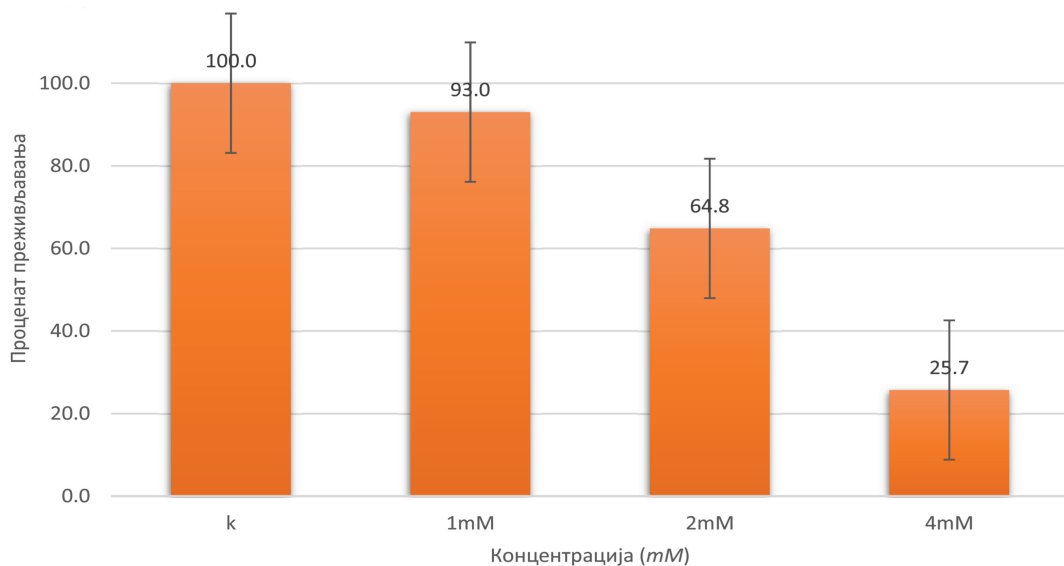
4.3.4. Цитотоксичност кофеина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*)

Ефекат дејства кофеина на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа показан је на графиконима 31 и 32. При 24-часовном третману готово да није забележен цитотоксични ефекат при дејству концентрације од 1 *mM*, број преживелих ћелија је 95,5%. Дејством већих концентрација цитотоксични ефекат се повећава, као што се види на Графикону 31.



Графикон 31. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа након 24-часовног третмана дејством кофеина

Продужавањем инкубације уочава се стрмији пад, те је проценат преживелих ћелија након 48-часовног третмана и дејства концентрације од 4 *mM*, 20,6% (Графикон 32), наспрам 45% дејством исте концентрације (4 *mM*), али при краћој временској инкубацији, од 24 *h* (Графикон 31).



Графикон 32. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа након 48-часовног третмана дејством кофеина

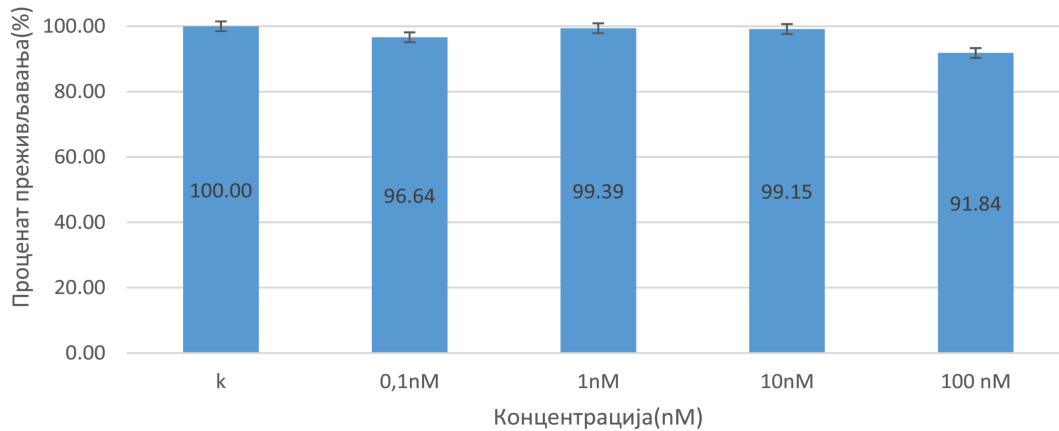
Одређени IC_{50} након 24-часовног третмана је 3,55 *mM*, а након 48 *h* је 2,62 *mM*.

4.4. Цитотоксичност нитроглицерина

При испитивању дејства нитроглицерина на ћелијске линије хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*), аденокарцинома плућа (*A549*), карцинома дебелог црева (*HT29*), као и на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа, најпре је коришћен опсег наномолских концентрација, а потом и опсег микромолских концентрација.

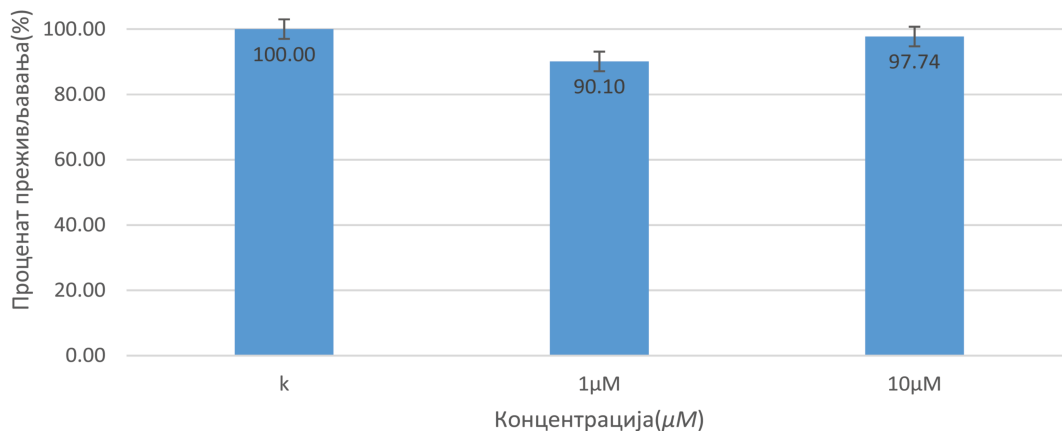
4.4.1. Цитотоксичност нитроглицерина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*)

Дејством нитроглицерина на ћелијској култури хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*) при наномолским концентрацијама и временској инкубацији од 24 h није забележен значајнији пад у броју преживелих ћелија, како при примени најслабијих тако и при примени најјачих концентрација, што је показано на Графикону 33. Стога одређени IC_{50} преко *CalcuSyn* програма излази из опсега испитиваних концентрација.



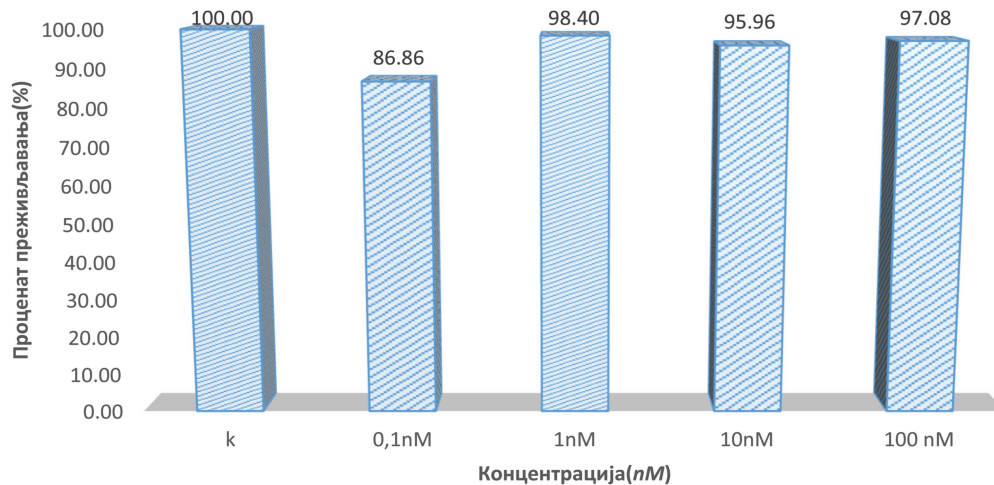
Графикон 33. Дејство нитроглицерина након 24-часовног третмана на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*) применом наномолских концентрација

Сличан ефекат је постигнут и при микромолским концентрацијама, 24 h те не постоји референтан пад процента преживелих ћелија, ћелијске културе, што је показано на Графикону 34.



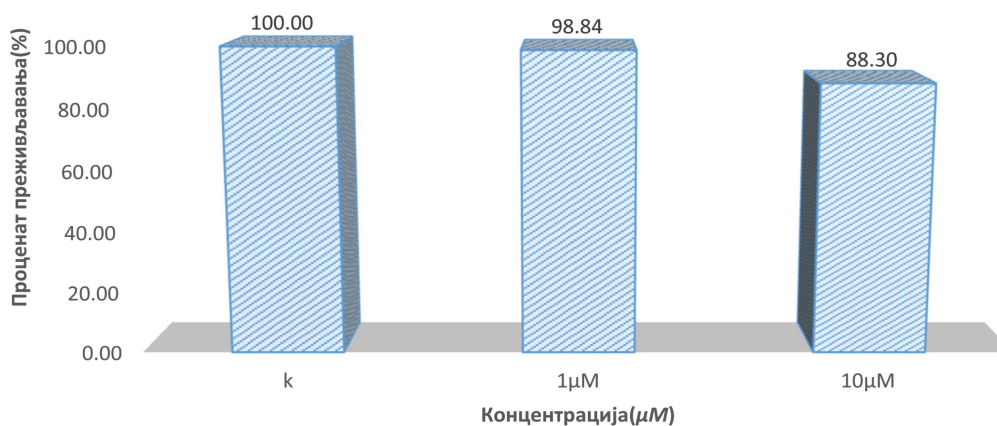
Графикон 34. Ефекат нитроглицерина након 24-часовног третмана на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*) дејством микромолских концентрација

При временској инкубацији од 48 h, при дејству микромолских концентрација забележен је пад у броју преживелих ћелија, али без статистичке значајности, јер је опсег процента преживљавања између 97,08% и 86,86%, што је и показано на Графикону 35.



Графикон 35. Ефекат нитроглицерина након 48-часовног третмана на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*) дејством наномолских концентрација

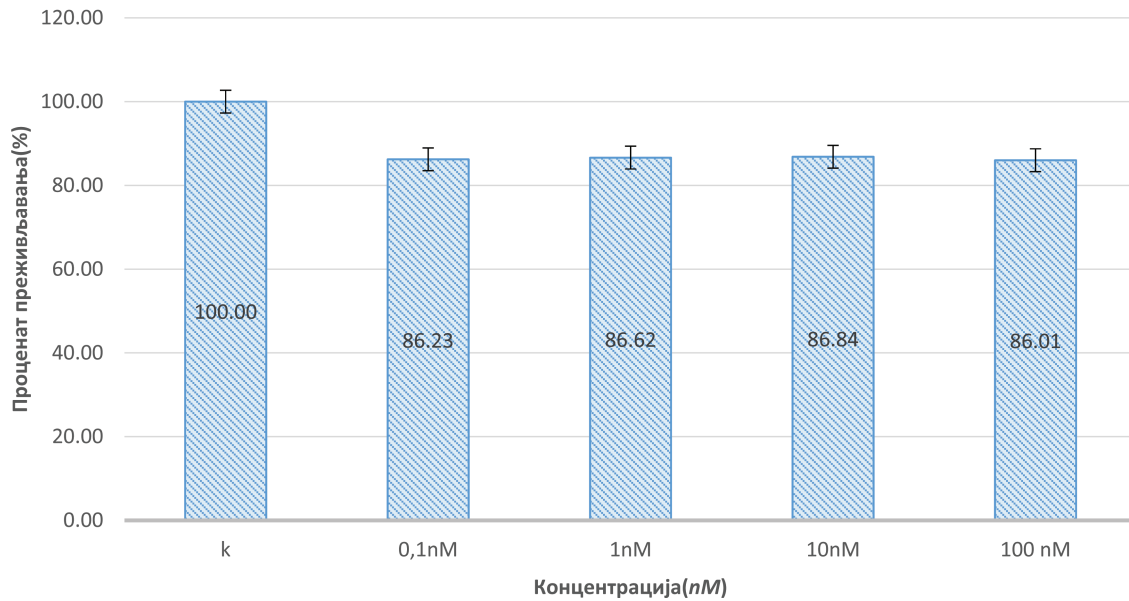
Сличан тренд је евидентиран и при временској инкубацији од 48 h и при дејству микромолских концентрација, Графикон 36. Дејством нитроглицерина од 10 μ M процент преживелих ћелија је 88,3 %.



Графикон 36. Ефекат нитроглицерина након 48-часовног третмана на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*) дејством микромолских концентрација

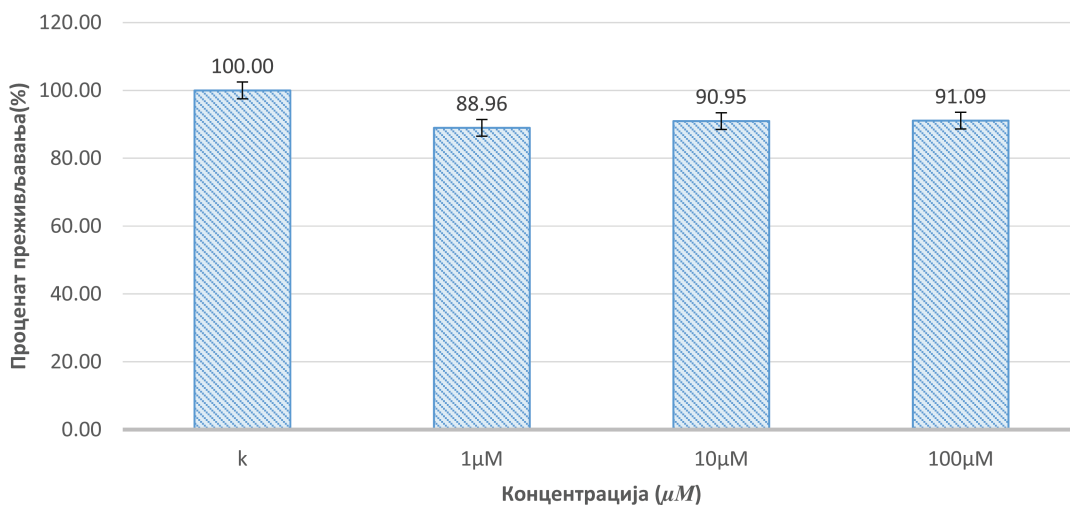
4.4.2. Цитотоксичност нитроглицерина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (*A549*)

Дејством нитроглицерина на ћелијској култури аденокарцинома плућа (*A549*) при наномолским концентрацијама и временској инкубацији од 24 h није забележен значајнији пад у броју преживелих ћелија, како при примени најслабијих тако и при примени најјачих концентрација, што је и приказано на Графикону 37. Стога одређени IC_{50} преко *CalcuSyn* програма излази из опсега испитиваних концентрација.



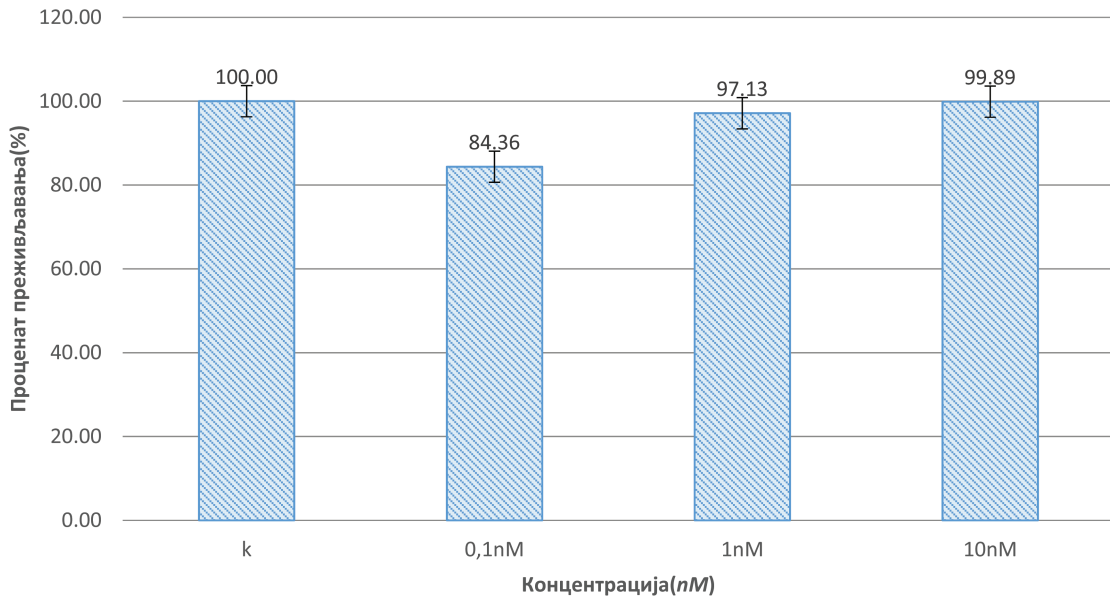
Графикон 37. Ефекат нитроглицерина након 24-часовног третмана на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) дејством наномолских концентрација

Сличан ефекат је постигнут и при микромолским концентрацијама, и 24-часовном третману нитроглицерином, показано на Графикону 38. При овом третману, најснажнији цитотоксичан ефекат је евидентиран дејству нитроглицерина од $1 \mu\text{M}$, те проценат преживелих ћелија износи 88,96 %.



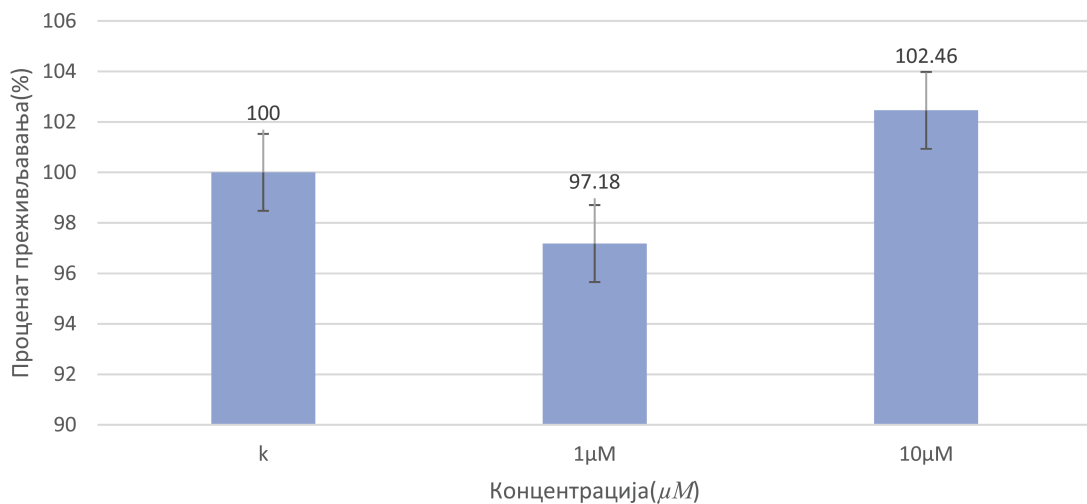
Графикон 38. Ефекат нитроглицерина након 24-часовног третмана на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) дејством микромолских концентрација

При временској инкубацији од 48 h, донекле се мења ситуација при дејству наномолских концентрација забележен је пад у броју преживелих ћелија, али без статистичке значајности, јер је опсег процента преживљавања између 99,89 % и 84,36 %, што је и показано на Графикону 39.



Графикон 39. Ефекат нитроглицерина након 48-часовног третмана на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) дејством наномолских концентрација

При дејству микромолских концентрација нитроглицерина и временској инкубацији од 48 h забележен је чак и благи пролиферативни ефекат на ћелијској култури аденокарцинома плућа при дози од 10 μM нитроглицерина (Графикон 40).



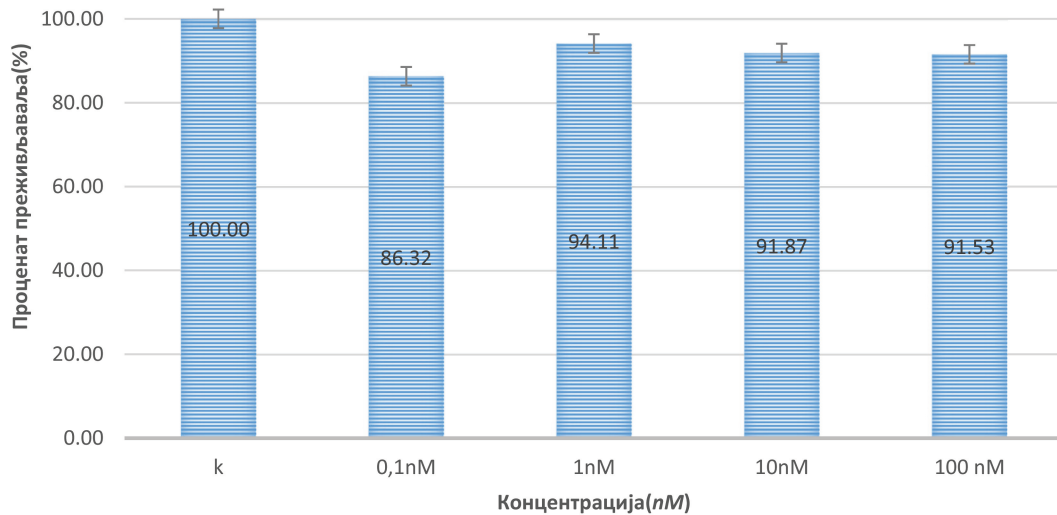
Графикон 40. Ефекат нитроглицерина након 48 h третмана на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) дејством микромолских концентрација

Програмом *CalcuSyn* није одређена IC_{50} .

4.4.3. Цитотоксичност нитроглицерина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29)

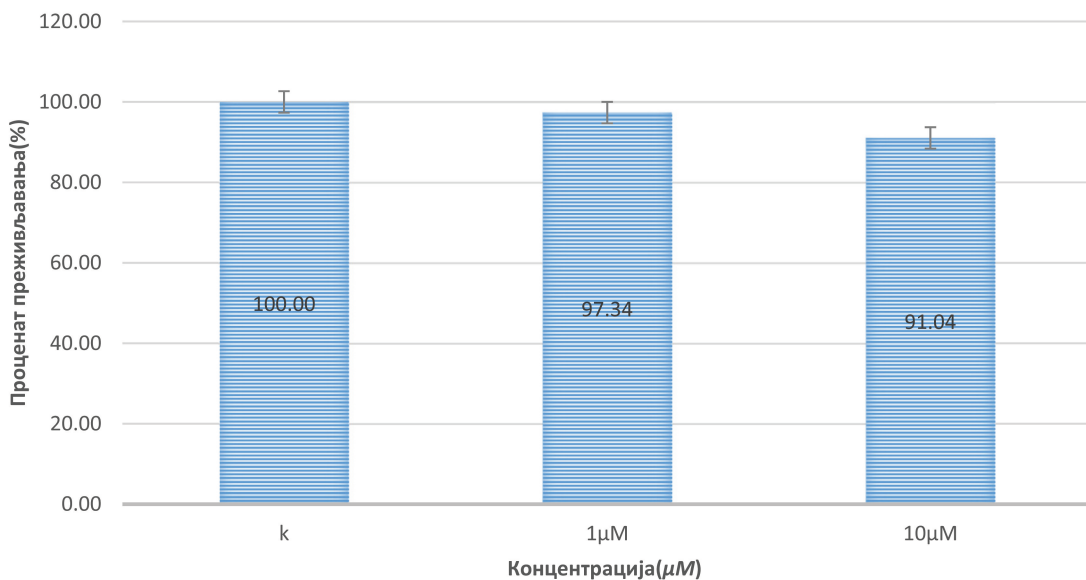
За испитивање цитотоксичности карцинома дебелог црева коришћен је широк опсег концентрација од 0,1 nM до 10 μM и то: 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM и 10 μM . Дејством нитроглицерина наномолским и микромолским концентрацијама при 24-

часовном третману добијен је практично исти ефекат. Процент преживљавања је у опсегу од 86,32 % до 94,11 % (графикони 41 и 42). Најзначајнији цитотоксични ефекат забележен је при дози нитроглицерина од 0,1 nM (Графикон 41).



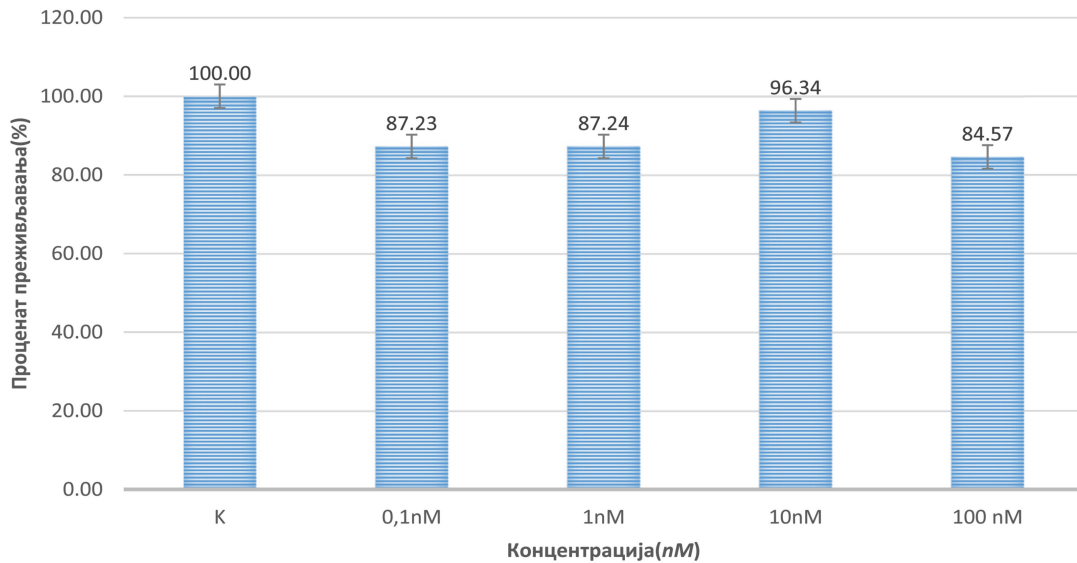
Графикон 41. Ефекат нитроглицерина након 24-часовног третмана на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) дејством наномолских концентрација

Дејством нитроглицерина у микромолским концентрацијама при 24-часовном третману евидентиран је тек благи цитотоксичан ефекат, тако да је дејством нитроглицерином у дози од 10 μM процент преживљавања 91,04 %, као што је приказано на Графикону 42.



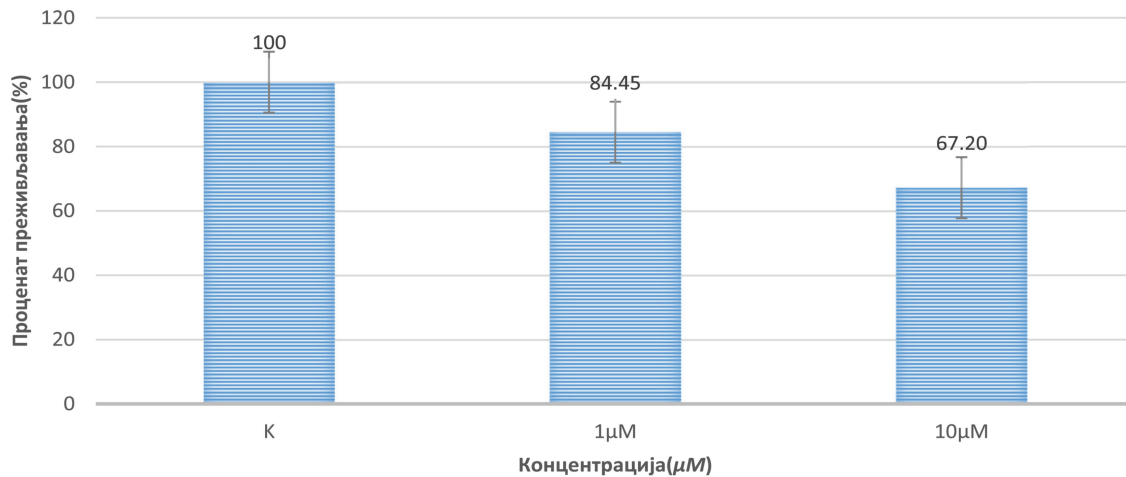
Графикон 42. Ефекат нитроглицерина након 24-часовног третмана на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) дејством микромолских концентрација

Значајнији пад у броју преживелих ћелија при деловању нитроглицерина у наномолским концентрацијама, након 48-часовног третмана евидентиран је код 100 nM , као што је показано на Графикону 43.



Графикон 43. Ефекат нитроглицерина након 48-часовне инкубације на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) дејством наномолских концентрација

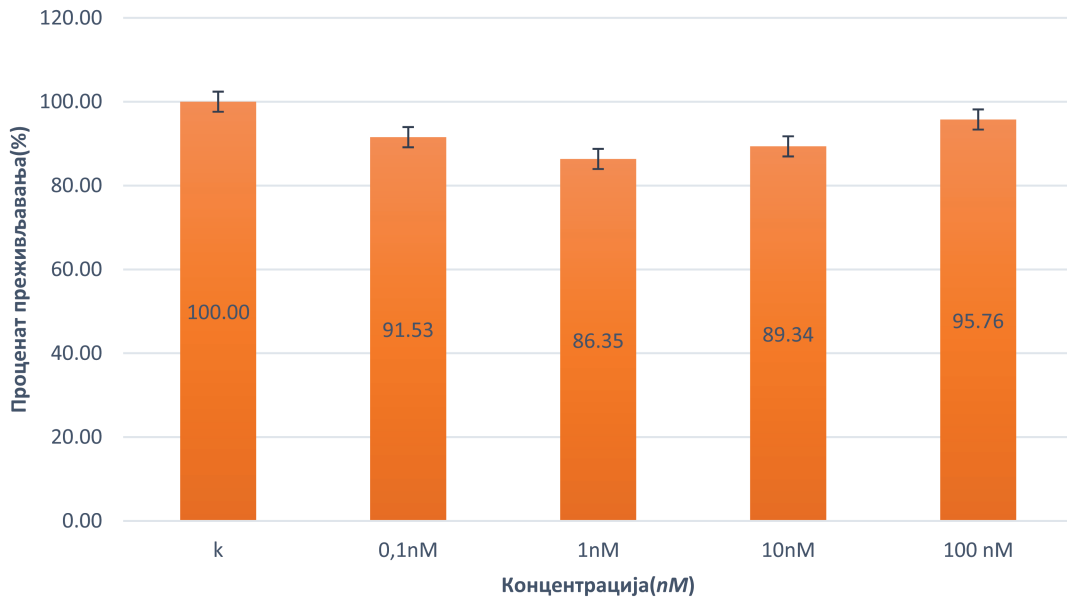
Временском инкубацијом за још 24 h значајније долази до смањења броја преживелих ћелија карцинома колоне, те је при дози од 10 μM забележен најјачи ефекат, а проценат преживелих ћелија је само 67,20% (приказано на Графикону 44).



Графикон 44. Ефекат нитроглицерина након 48-часовне инкубације на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) дејством микромолских концентрација

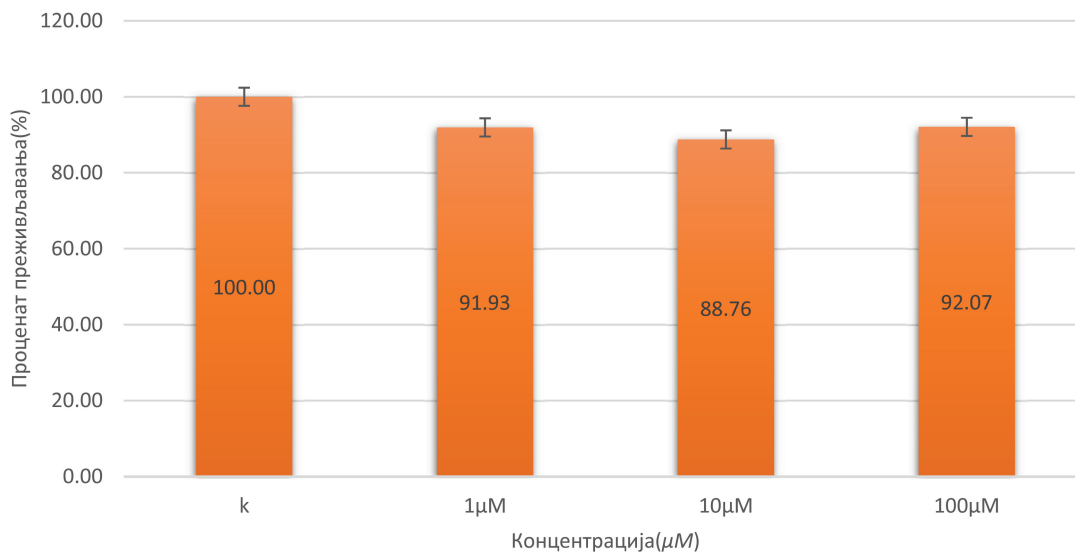
4.4.4. Цитотоксичност нитроглицерина праћена SRB тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (MRC5)

Испитивање цитотоксичности нитроглицерина код здравих фибробласта плућа, рађено је са опсегом концентрација у наномолским: 1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM али и у микромолским концентрацијама 1 μM , 10 μM и 100 μM . Испитивана је и временска зависност након 24 h и 48 h (графикони 45, 46, 47 и 48).



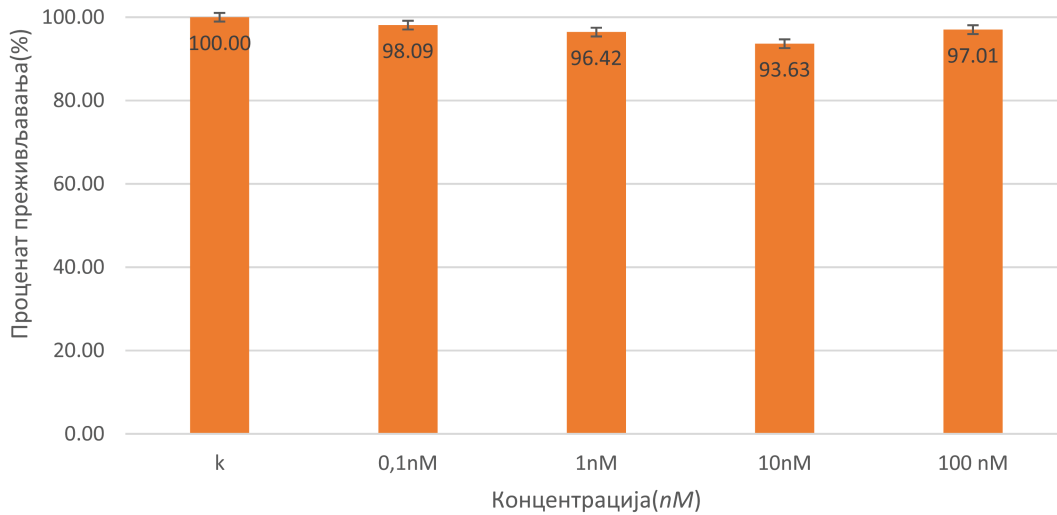
Графикон 45. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 24-часовног третмана дејством нитроглицерина у наномолским концентрацијама

Дејством нитроглицерина у микромолским концентрацијама при 24-часовном третману евидентиран је тек благи цитотоксичан ефекат, тако да је дејством нитроглицерином у дози од $10 \mu\text{M}$ проценат преживљавања $88,76\%$, као што је приказано на Графику 46. Програмом *CalcuSyn* одређена IC_{50} излазила је из опсега испитивања.

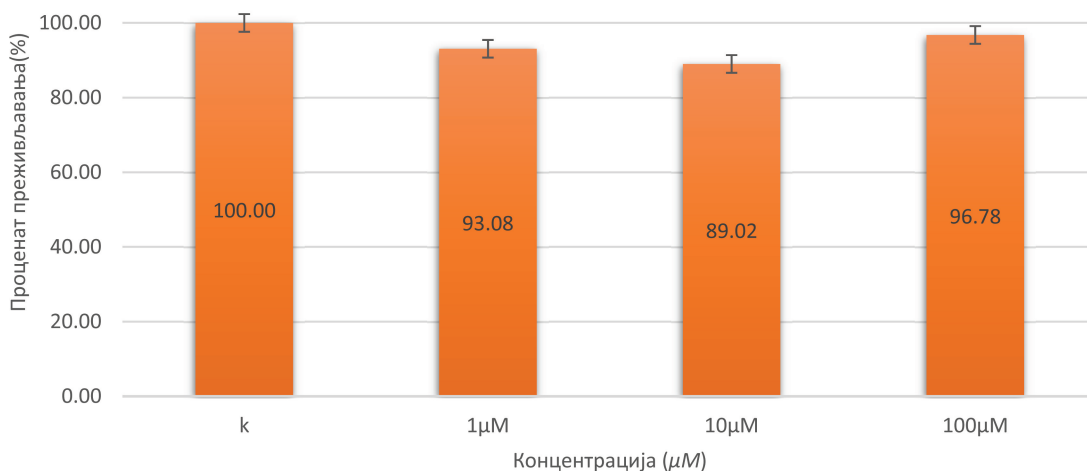


Графикон 46. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 24-часовног третмана дејством нитроглицерина у микромолским концентрацијама

Након $48 h$ третмана наномолских (Графикон 47) и након $48 h$ дејства микромолских концентрација (Графикон 48) нитроглицерина не постоји значајнији пад у броју преживелих ћелија, једина концентрација при којој је проценат прживелих здравих фибробласта плућа испод 90% је код $10 \mu\text{M}$.



Графикон 47. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 48-часовног третмана дејством нитроглицерина у наномолским концентрацијама



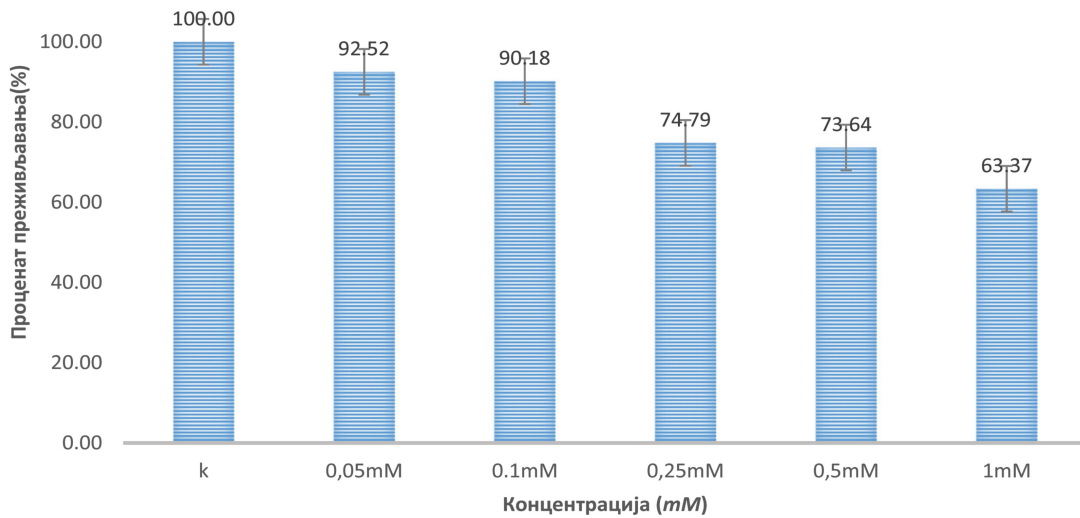
Графикон 48. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 48-часовног третмана дејством нитроглицерина у микромолским концентрацијама

4.5. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси-*D*-глукозе

4.5.1. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси-*D*-глукоза праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*)

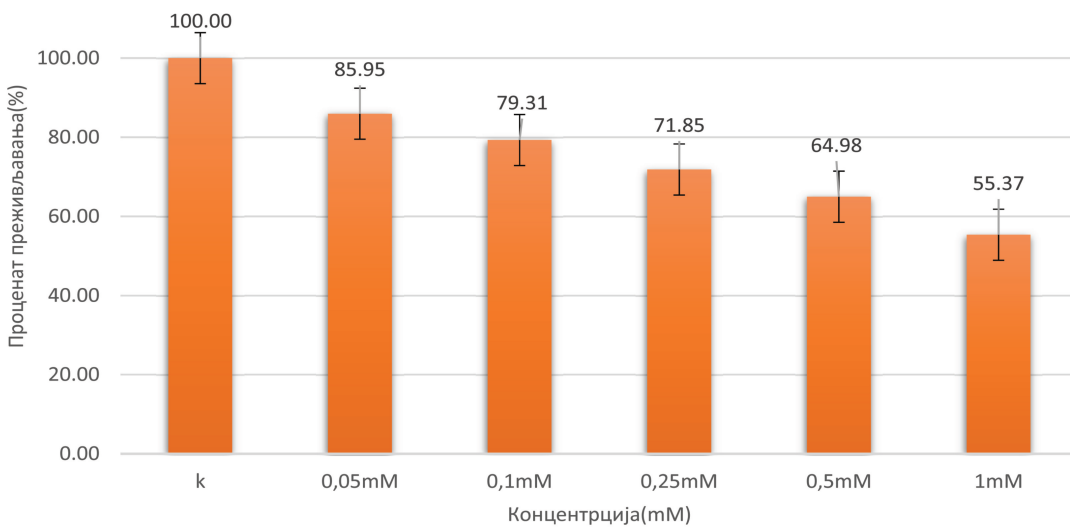
При испитивању цитотоксичног ефекта, при деловању метформина и 2-деокси-*D*-глукозе, дејствовано је метформиним у концентрацијама од 0,05 *mM*, 0,1 *mM*, 0,25 *mM*, 0,5 *mM* као и при дејству 1 *mM*, док је коришћена 2-деокси-*D*-глукоза у концентрацији од 1 *mM*. Деловањем метформина и 2-деокси-*D*-глукозе на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*), како при временској инкубацији од 24 *h*, тако и при инкубацији од 48 *h*, евидентиран је пад у броју преживелих ћелија, што је и показано на Графикону 49 и Графикону 50. Евидентиран је исти тренд, али ипак снажнији ефекат при временској инкубацији од 48 *h* (Графикон 50).

При испитивању цитотоксичног ефекта, при деловању метфотформина и 2-деокси-*D*-глюкозе, дејствовано је метформином у концентрацијама од 0,05 *mM*, 0,1 *mM*, 0,25 *mM*, 0,5 *mM* као и при дејству 1 *mM*, док је коришћена 2-Деокси-*D*-глюкоза у концентрацији од 1 *mM*. Након 24-часовног третмана метформином у микромољским концентрацијама и 2-деокси-*D*-глюкозом у микромољским концентрацијама најснажнији цитотоксичан ефекат забележен је дејством 1 *mM*, Графикон 49.



Графикон 49. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 24-часовног третмана дејством метформина и 2-деокси-*D*-глюкозе

Деловањем метформина и 2-Деокси-*D*-глюкозе на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*), при инкубацији од 48h, евидентиран је пад у броју преживелих ћелија, што је и показано на Графикону 50. Евидентиран је исти тренд, али ипак снажнији ефекат те је проценат преживелих ћелија при дози од 1 *mM* метформина и 1 *mM* 2-деокси-*D*-глюкозе, 55,37 % (Графикон 50).

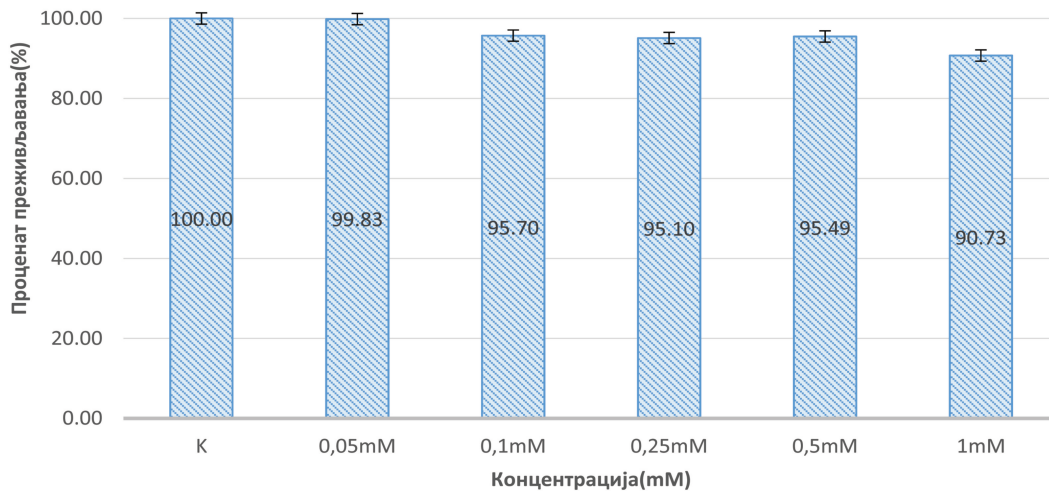


Графикон 50. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 48-часовног третмана дејством метформина и 2-Деокси-*D*-глюкоза

Одређен IC_{50} програмом CalcuSyn након 24 *h* је 2 *mM* док је IC_{50} након 48 *h* третмана 1,55 *mM*.

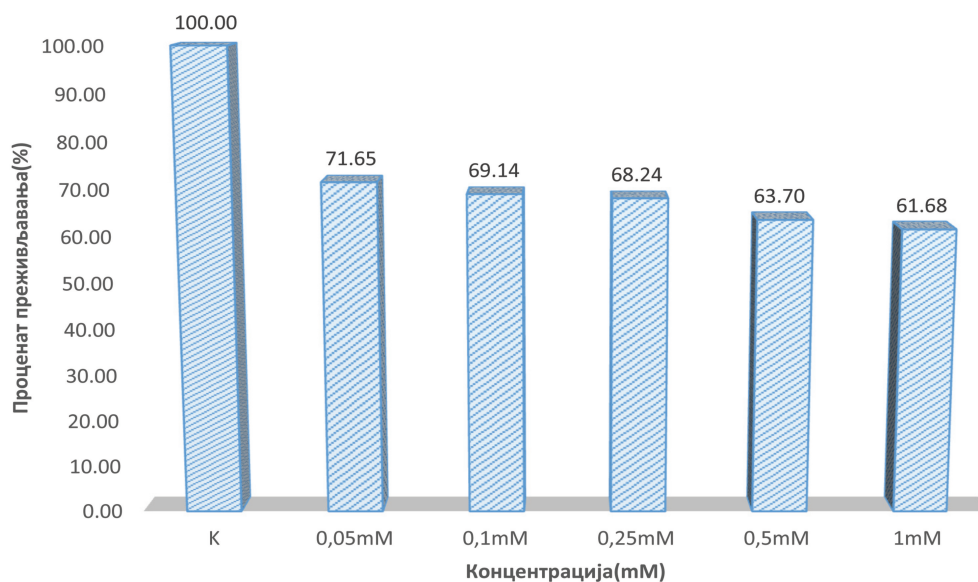
4.5.2. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси-*D*-глюкоза праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (*A549*)

При испитивању цитотоксичног ефекта, при деловању метформина и 2-Деокси-*D*-глюкозе, додаван је метформин у концентрацијама од 0,05 *mM*, 0,1 *mM*, 0,25 *mM*, 0,5 *mM* као и при дејству 1 *mM*, док је коришћена 2-Деокси-*D*-глюкоза у концентрацији од 1 *mM*. При кумулативном деловању метформина и 2-Деокси-*D*-глюкозе, при 24 *h* третману зебележена је слаба цитотоксичност, са најјачим евидентираним ефектом од 90,73% преживелих ћелија што је и приказано на графикаону 51. Одређена IC_{50} је 0,0006 *mM*.



Графикон 51. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (*A549*) након 24-часовног третмана дејством метформина и 2-Деокси-*D*-глюкоза.

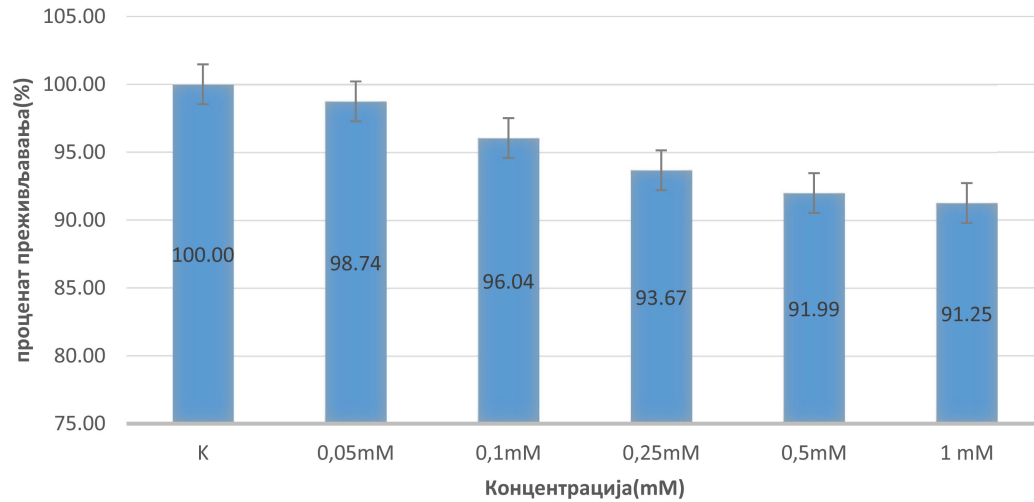
Продужењем инкубације на 48 сати је евидентиран исти тренд али са далеко јачим цитотоксичним ефектом (Графикон 52). Тако је већ при концентрацији од 0,05 *mM* метформина и 1 *mM* 2-Деокси-*D*-глюкозе, проценат преживелих ћелија 71,65%, док је при најјачој концентрацији тај проценат 61,68%. Одређена IC_{50} је 19,24 *mM*.



Графикон 52. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (*A549*) након 48-часовног третмана дејством метформина и 2-деокси-*D*-глюкозе

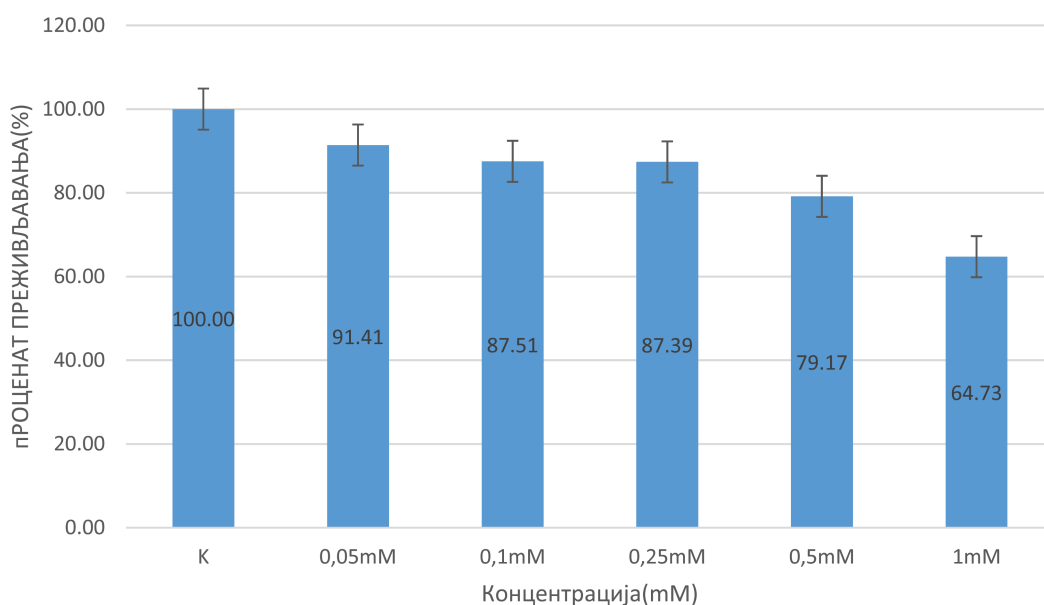
4.5.3. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси-*D*-глюкозе праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*)

Дејством комбинације метформина и 2-деокси-*D*-глюкозе на ћелијску културу хуманог карцинома дебелог црева при 24-часовном третману је забележен мали пад у броју преживелих ћелија и то у опсегу од 91,25% до 98,74%, што је и представљено на Графикону 53. Одређена IC_{50} је 4,26 *mM*.



Графикон 53. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*) након 24-часовног третмана дејством метформина и 2-деокси-*D*-глюкозе

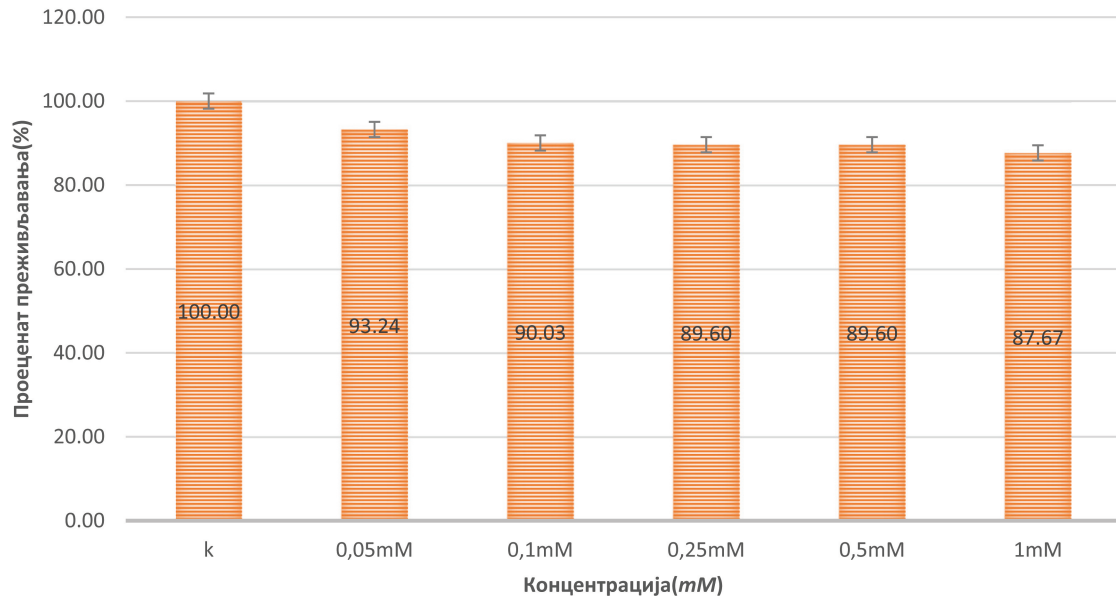
Продужењем инкубације на 48 *h* је забележен исти тренд али ипак снажнији ефекат, тако да је при дејству комбинације метформина (1*mM*) и 2-деокси-*D*-глюкозе (1*mM*), забележен проценат преживљавања од само 64,73%, што је показано на Графикону 54.



Графикон 54. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*) након 48-часовног третмана дејством метформина и 2-деокси-*D*-глюкозе

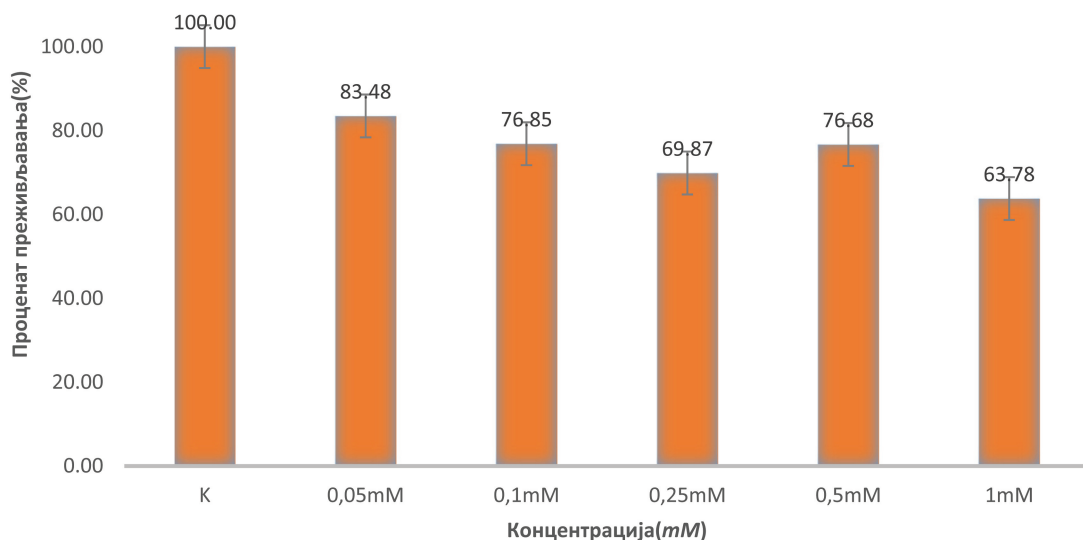
4.5.4. Цитотоксичност метформина и 2-Деокси-*D*-глюкоза праћена *SRB* тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*)

Цитотоксичност истовремене примене метформина и 2-деокси-*D*-глюкозе праћена је и на хуманој ћелијској култури нормалних фибробласта плућа (*MRC5*), у растућим концентрацијама метформина од 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM и 1 mM а 2-деокси-*D*-глюкоза у дози од 1 mM као што је приказано на Графикону 55.



Графикон 55. Ефекат на ћелијској линији хуманог нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 24-часовног третмана дејством метформина и 2-деокси-*D*-глюкозе

Значајнији пад броја преживелих ћелија евидентиран је при концентрацији од 1 mM метформина и 1 mM 2-деокси-*D*-глюкозе при којој је 63,78% ћелија преживело, што је и показано на Графикону 56.



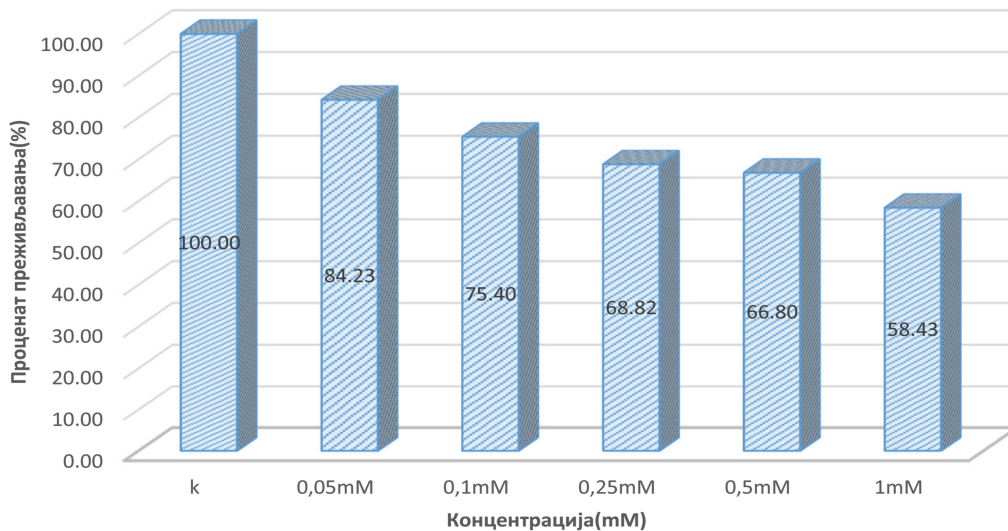
Графикон 56. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 48-часовног третмана дејством метформина и 2-Деокси-*D*-глюкозе

4.6. Цитотоксичност метформина и кофеина

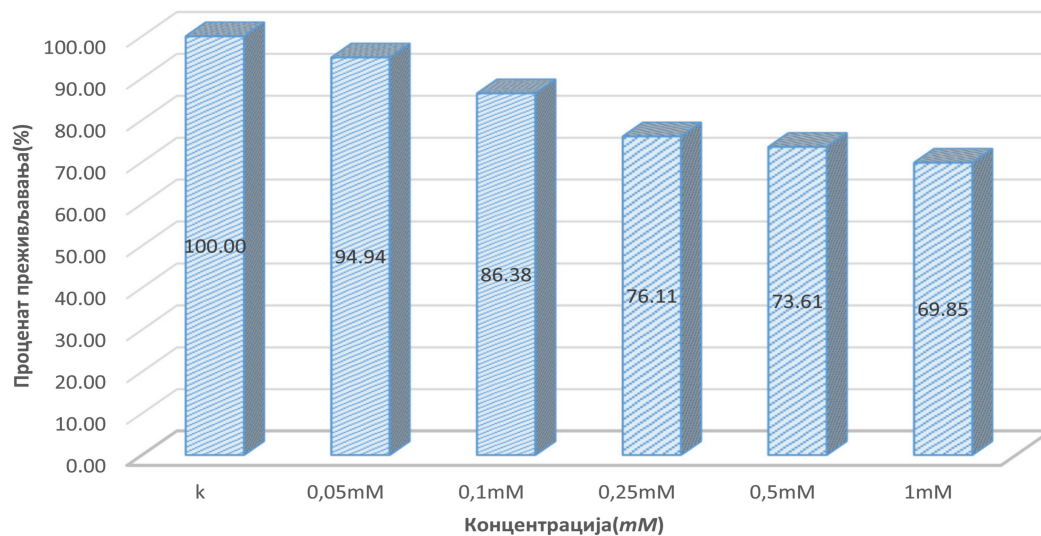
За испитивање цитотоксичности код истовремене примене кофеина и метформина, на основу података добијених индивидуалном применом метформина и кофеина, одлучено је да се ћелијске културе карцинома цервикса, аденокарцинома плућа и карцинома колона третирају метформином у дозама од: 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM и 1 mM и кофеином од 1 mM.

4.6.1. Цитотоксичност метформина и кофеина праћена SRB тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*)

Истовременом употребом метформина и кофеина, на ћелијској култури карцинома грлића материце, добијен је значајније нижи број преживелих ћелија него при



Графикон 57. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*) након 24-часовног третмана дејством метформина и кофеина



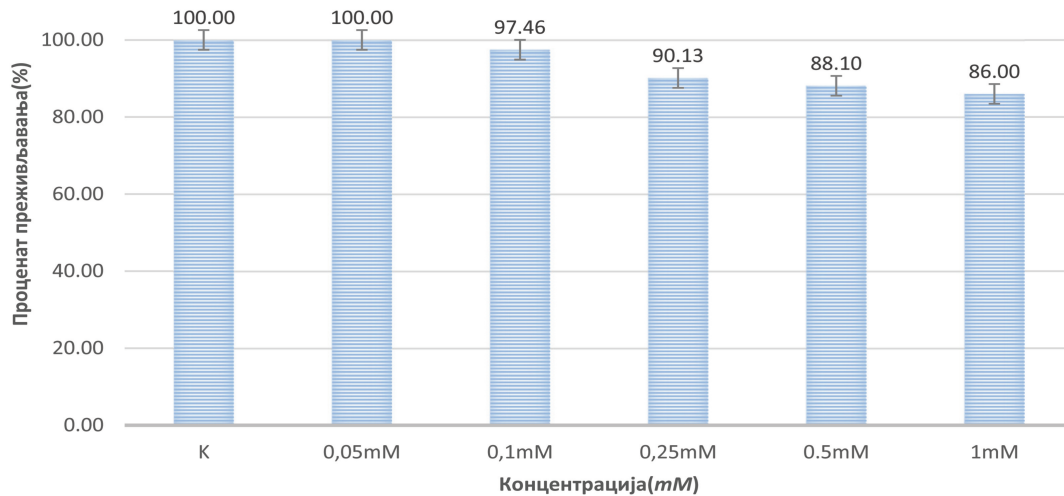
Графикон 58. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*) након 48-часовног третмана дејством метформина и кофеина

појединачном дејству метформина и кофеина. Тако одређена IC_{50} након комбиноване примене метформина и кофеина након 24 h је 2,23 mM а IC_{50} након 48 h је 2,4 mM (графикони 57 и 58, ретроградно).

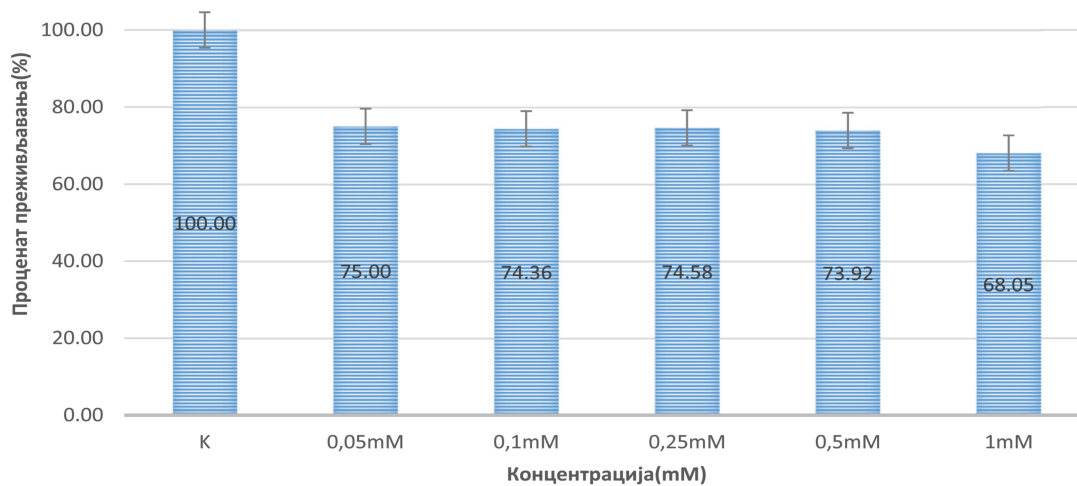
Након индивидуалног дејства метформина након 24 h IC_{50} 7,46 mM, док након истог временског интервала IC_{50} за кофеин је 2,44 mM, а након 48-часовног дејства метформина на ћелијској култури карцинома цервикса IC_{50} је 2,55 mM а након дејства кофеина IC_{50} је 2,03 mM.

4.6.2. Цитотоксичност метформина и кофеина праћена SRB тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549)

Дејство истовремене примене метформина и кофеина на аденокарциному плућа, показало је значајнији пад броја преживелих ћелија него код појединачне примене кофеина и метформина, што је и приказано на графиконима 59 и 60.



Графикон 59. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 24-часовног третмана дејством метформина и кофеина



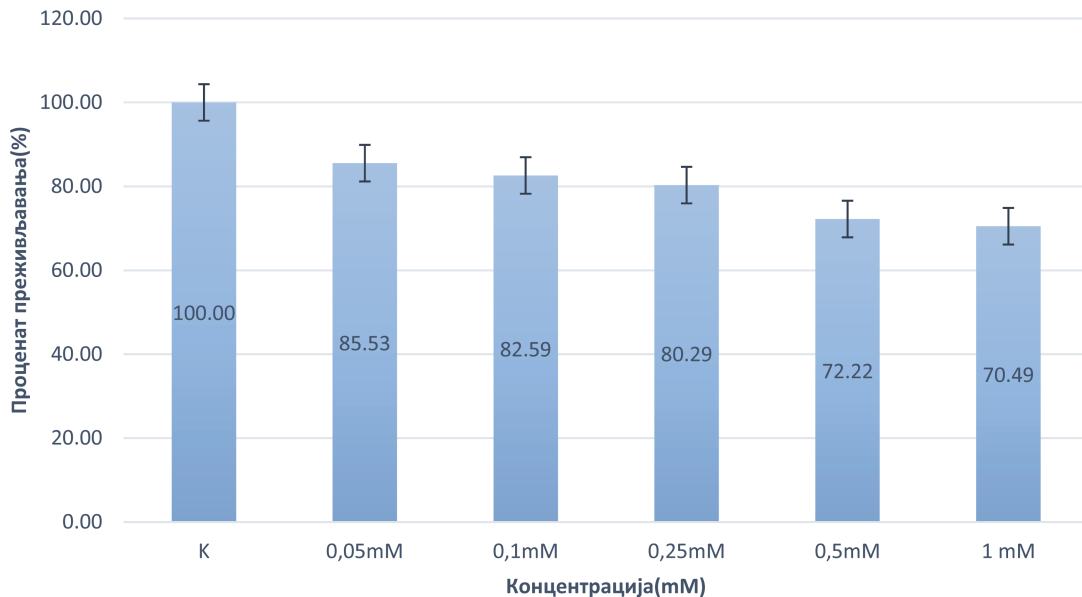
Графикон 60. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 48h третмана метформина и кофеином

Посебно снажно цитотоксично дејство је приказано након 48-часовног третмана, где се већ при првој комбинацији концентрација метформина 0,05 *mM* и кофеина од 1 *mM* евидентирао проценат преживелих ћелија *A549*, само 75% (Графикон 60).

Одређена IC_{50} након 24 *h* код комбиноване примене метформина и кофеина је 0,0002 *mM* док је након 48 *h* IC_{50} већа од 1 *mM*. Само да подсетимо, како смо описали у поглављу 4.1.2 и 4.3.2, добијене вредности IC_{50} након 24 *h* је 14,79 *mM* а након 48 *h* је 3,3 *mM*, док је IC_{50} за кофеин након 24 *h* 3,38 *mM* а IC_{50} након 48 *h* је 2,44 *mM*.

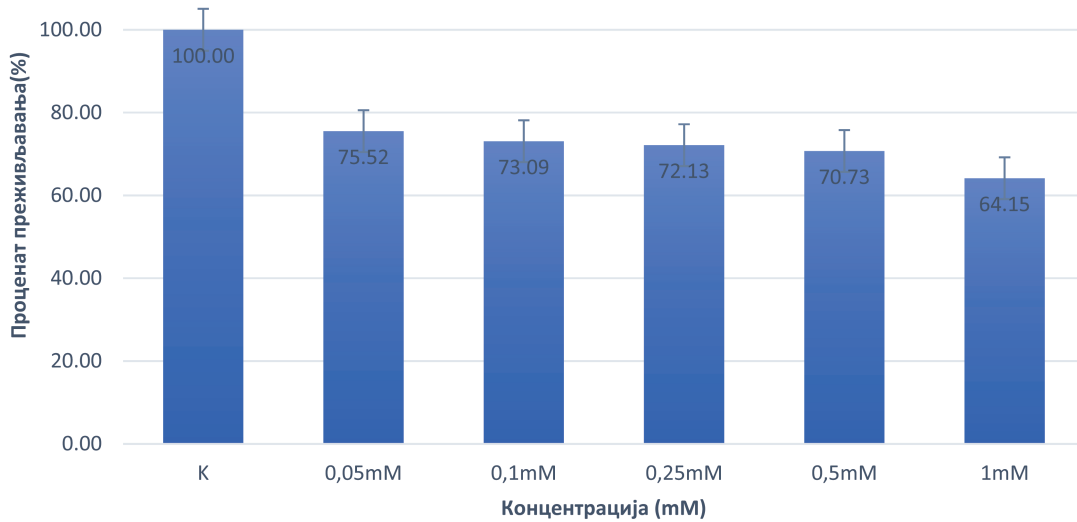
4.6.3. Цитотоксичност метформина и кофеина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*)

Истовременим третманом метформином и кофеином, на ћелијској култури карцинома колоне, добијен је значајније мањи број преживелих ћелија него при појединачном дејству метформина и кофеина. Тако одређена IC_{50} након комбиноване примене метформина и кофеина инкубацијом 24 *h* као и инкубацијом 48 *h* је 0,0006 *mM* што је и показано на графиконима 61 и 62. Иако на први поглед делује да је далеко снажнији ефекат постигнут временском инкубацијом, израчунавањем у *CalcuSyn* програму ипак је добијена иста вредност IC_{50} .



Графикон 61. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*) након 24-часовног третмана метформином и кофеином

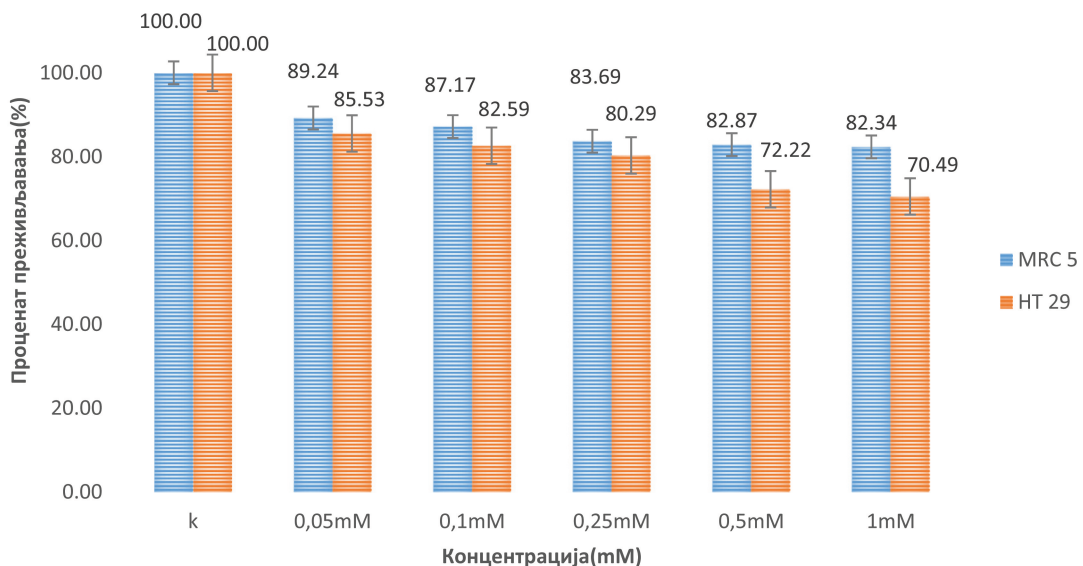
Дејством метформина и кофеина при временској инкубацији од 48 *h* као што је показано на графикону 62 евидентиран је проценат преживљавања мањи од 75.52%. Код овог третмана је једино при деловању кофеина од 1 *mM* и метформина од 1 *mM* евидентиран проценат преживљавања од 64.15%.



Графикон 62. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*) након 48-часовног третмана метформином и кофеином

4.6.4. Цитотоксичност метформина и кофеина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*)

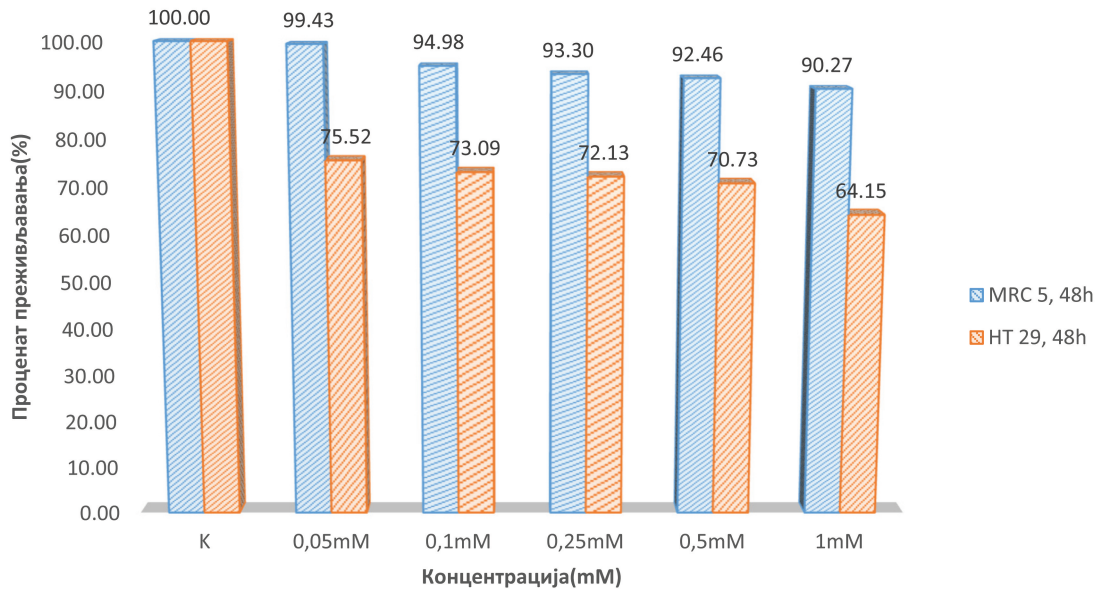
Цитотоксичност истовремене примене метформина и кофеина праћена је и на хуманој ћелијској култури нормалних фибробласта плућа (*MRC5*), у растућим концентрацијама метформина од 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM и 1 mM а кофеин у дози од 1 mM као што је приказано на графиконима 63 и 64. При 24-часовном третману, проценат преживелих ћелија нигде није мањи од 80,29% (Графикон 63).



Графикон 63.: Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома колона (*HT29*) и нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 24-часовног третмана метформином и кофеином

На графиконима 63 и 64 приказано је и дејство метформина и кофеина на ћелијској култури карцинома колона, да би се уочило снажно цитотоксично дејство које карактерише овај третман.

Цитотоксичност истовремене примене метформина и кофеина праћена је и на хуманој ћелијској култури нормалних фибробласта плућа (*MRC5*), у растућим концентрацијама метформина од $0,05\text{ mM}$, $0,1\text{ mM}$, $0,25\text{ mM}$, $0,5\text{ mM}$ и 1 mM а кофеин у дози од 1 mM као што је приказано на графиконима 63 и 64. При 24-часовном третману, проценат преживелих ћелија нигде није мањи од $80,29\%$ (Графикон 63).



Графикон 64. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома колона (*HT29*) нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 48-часовног третмана метформиним и кофеиним

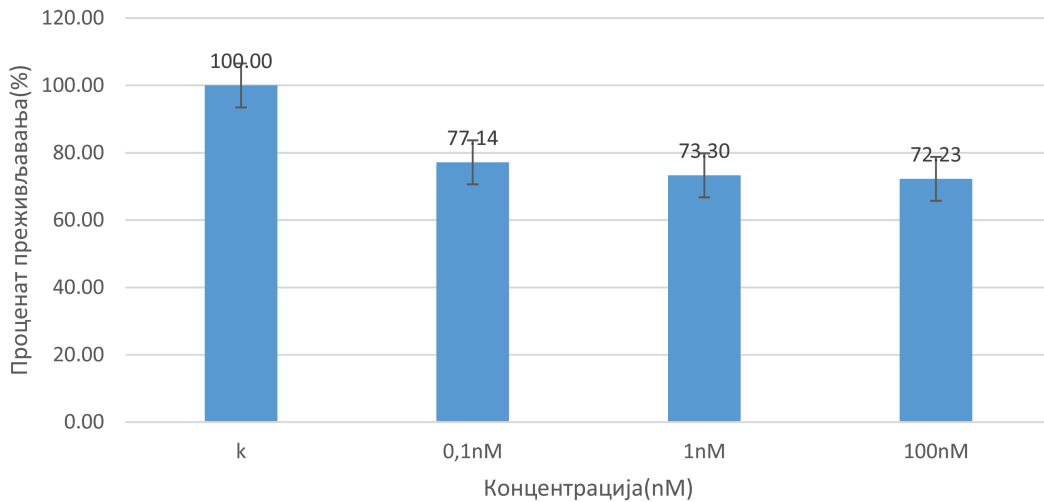
Одређена IC_{50} програмом *CalcuSyn* далеко је већа од опсега испитиваних концентрација и износи 1950 mM .

4.7. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси-*D*-глукоза

За испитивање цитотоксичности код истовремене примене нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе, на основу података добијених индивидуалном применом нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе, одлучено је да се ћелијске културе карцинома цервикса, аденокарцинома плућа и карцинома колона третирају нитроглицерином у дозама од: $0,1\text{ nM}$, 1 nM , 100 nM , $1\text{ }\mu\text{M}$ и $100\text{ }\mu\text{M}$ и 2-деокси-*D*-глукозом од 1 mM .

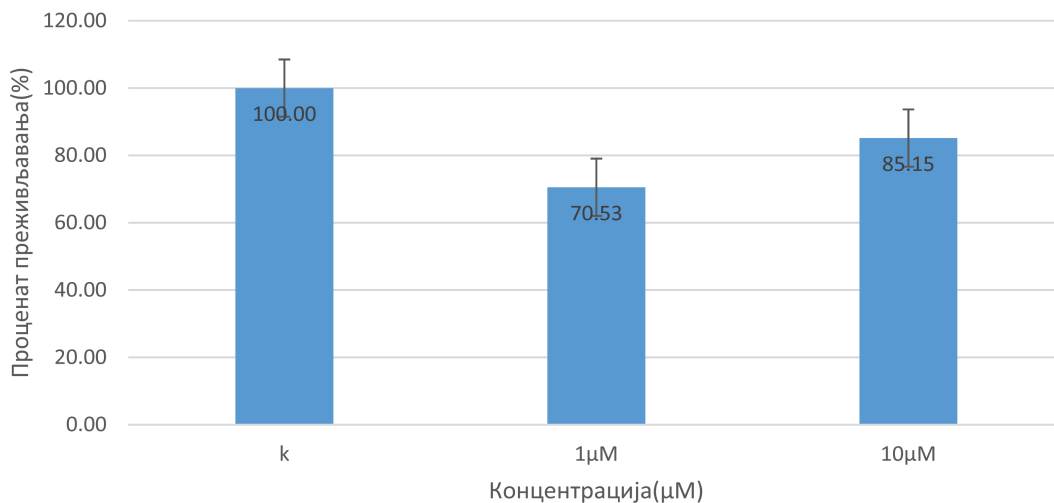
4.7.1. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси-*D*-глукоза праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*)

Комбинованом применом нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе најснажнији цитотоксичан ефекат на ћелијској култури карцинома грлића материце постигнут је при деловању 2-деокси-*D*-глукозе од 1 mM и нитроглицерина од $1\text{ }\mu\text{M}$. Процент преживелих ћелија овим треманом (нитроглицерин и 2-деокси-*D*-глукоза) је мањи него након самосталне примене нитроглицерина, као што је и показано на графиконима 33 и 34, као и на графиконима 65 и 66. Иако је евидентиран снажнији цитотоксични ефекат, путем програма *CalcuSyn* није било могуће одредити IC_{50} .



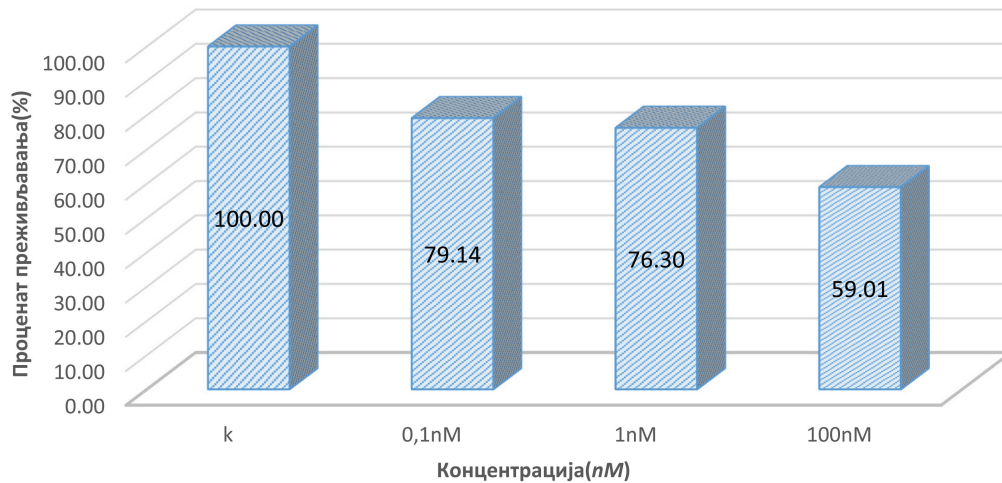
Графикон 65. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

Деловањем микромолских концентрација нитроглицерина и микромолске дозе 2-деокси-*D*-глукозе евидентирана је обрнута сразмера дозе у односу на број преживелих ћелија, као што је приказано на графикону 66.



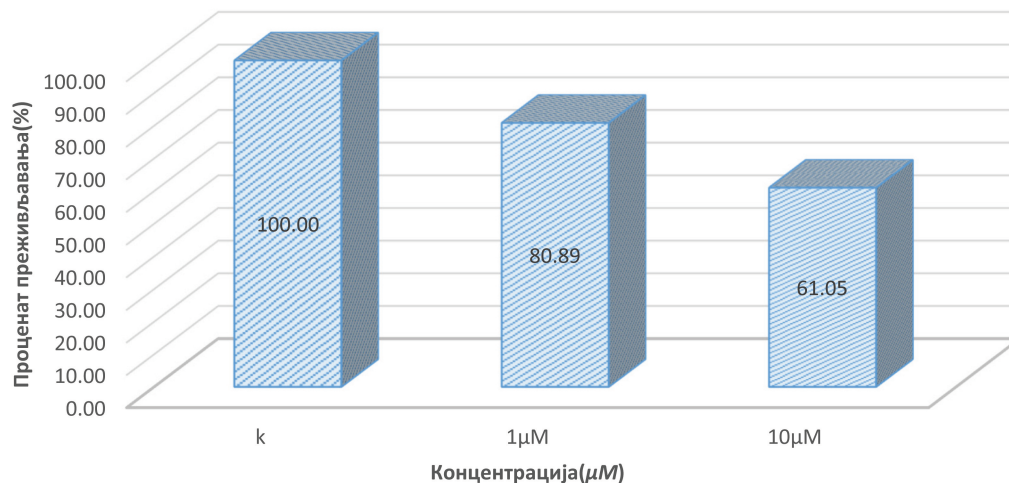
Графикон 66. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 24-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

Исти ефекат са далеко снажнијим цитотоксичним ефектом је добијен временском инкубацијом. Код истовремене примене 2-деокси-*D*-глукозе од 1 *mM* и нитроглицерина од 100 *nM* процента преживелих ћелија карцинома цервикса је само 59,01% (Графикон 67), поређења ради при самосталном дејству нитроглицерина од 100 *nM* проценат преживелих ћелија је 97,08% (Графикон 35).



Графикон 67. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 48-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

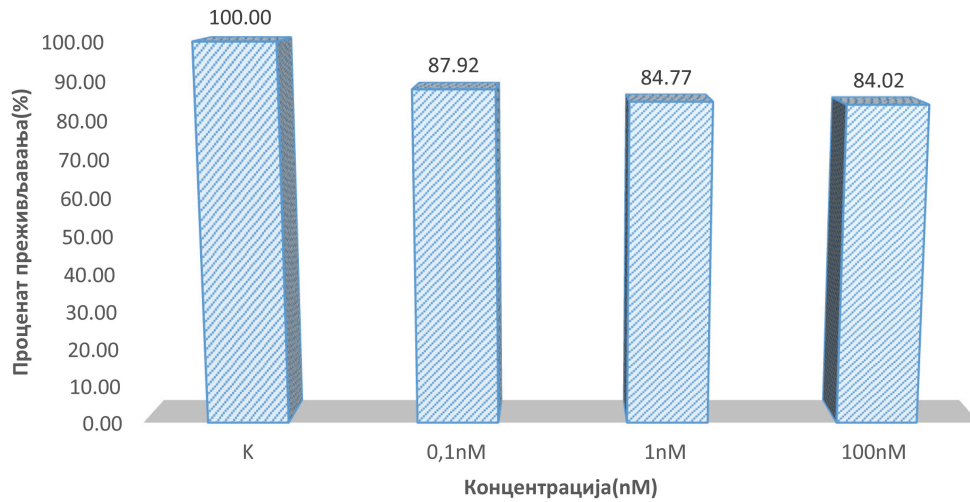
Такође комбинованом применом 2-деокси-*D*-глукозе од 1 *mM* и нитроглицерина од 10 μM , и инкубацијом 48 h евидентирано је само 61,05% преживелих ћелија (Графикон 68) у односу на 88,3% колико је преживелих ћелија након самосталне примене исте дозе нитроглицерина (Графикон 36).



Графикон 68. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 48-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

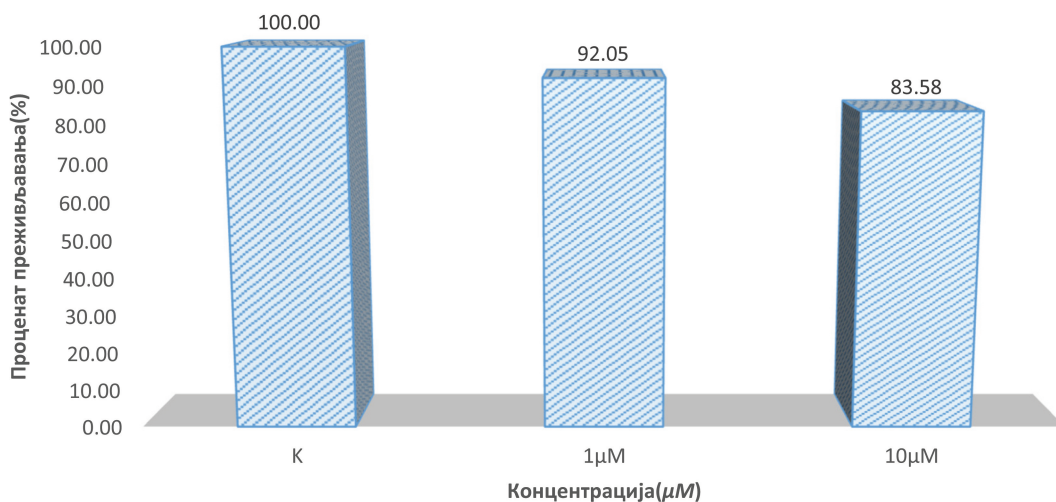
4.7.2. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси-*D*-глукоза праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (*A549*)

Комбинованом применом нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе испитиван је на ћелијској култури аденокарцинома плућа деловањем 2-деокси-*D*-глукозом од 1 *mM* и нитроглицерином у концентрацијама од 0,1 *nM*, 1 *nM*, 100 *nM*, 1 μM и 10 μM . Најснажнији цитотоксичан ефекат на ћелијској култури аденокарцинома плућа постигнут је при деловању 2-деокси-*D*-глукозе од 1 *mM* и нитроглицерина од 10 μM .



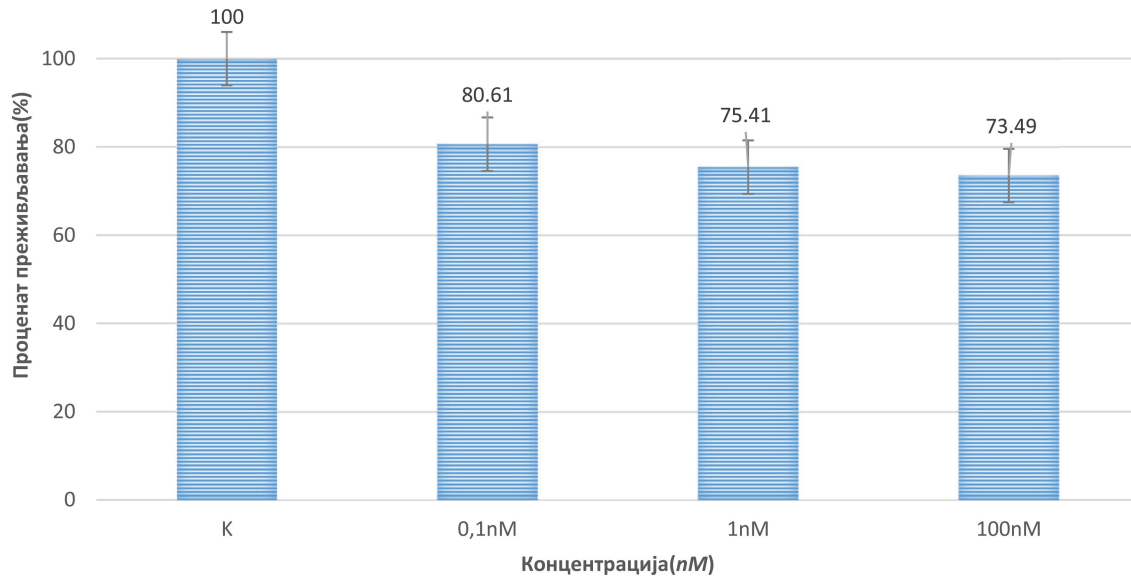
Графикон 69. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

Процент преживелих ћелија овим третманом (нитроглицерин и 2-деокси-*D*-глукоза) мањи је него након самосталне примене нитроглицерина, као што је и показано на графиконима 37 и 38, као и на графиконима 69 и 70. Иако је евидентиран снажнији цитотоксични ефекат, путем програма *CalcuSyn* није било могуће одредити IC_{50} .



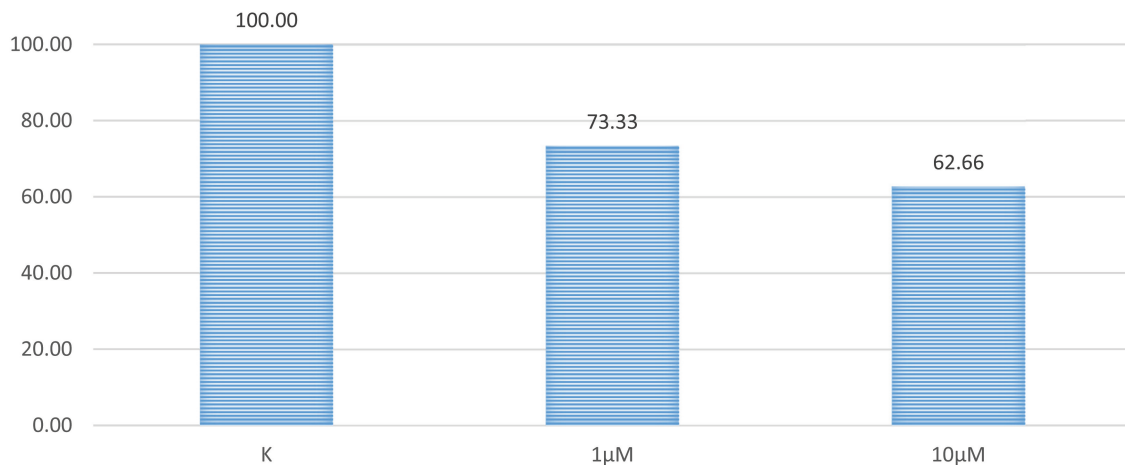
Графикон 70. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 24-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

Временском инкубацијом евидентира се снажнији цитотоксични ефекат, те је проценат преживелих ћелија деловањем 2-деокси-*D*-глукозом од 1 mM и нитроглицерином од 10 μM је само 62,66% (Графикон 72). Процент преживљавања код свих третмана је испод 81% (графикони 71, 72) што није био случај код индивидуалне примене нитроглицерина (графикони 39, 40).



Графикон 71. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 48-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

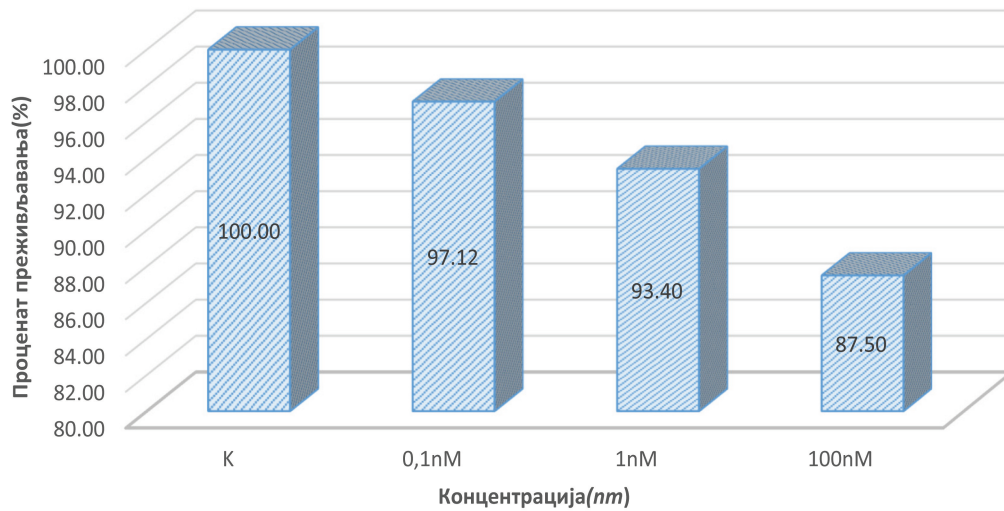
Одређена IC_{50} програмом *CalcuSyn* након 48-часовног третмана нитроглицерином наномолских концентрација је 0,143 *mM*, док IC_{50} за дејство 2-деокси-*D*-глукозе и нитроглицерина у милимолским концентрацијама није могуће одредити.



Графикон 72. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 48-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

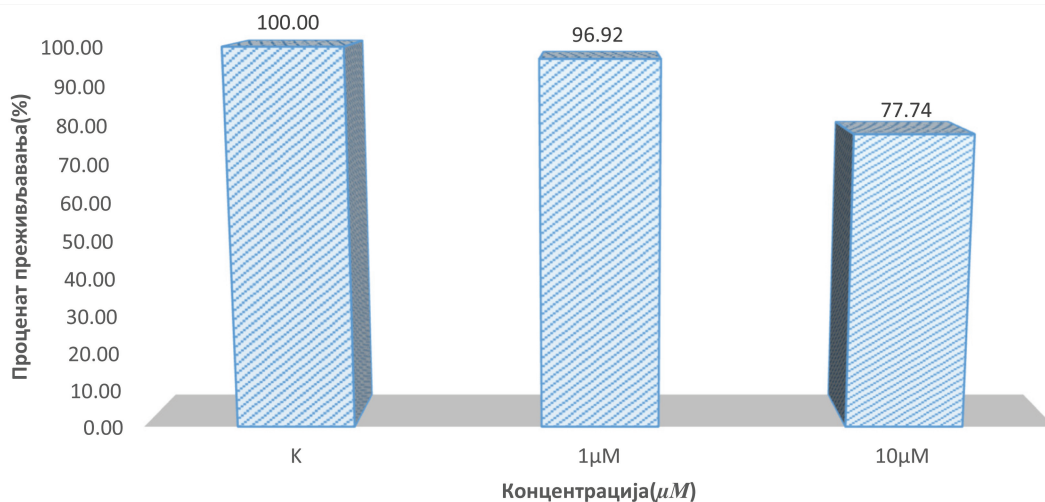
4.7.3. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси-*D*-глукоза праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (*HT29*)

Комбинована примена нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе на ћелијској култури карцинома дебелог црева, снажни цитотоксични ефекти су забележени након третмана са 100 *nM* и након 10 μM , где је проценат преживљавања био 87,5% и 77,74% (графикони 73 и 74).



Графикон 73. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

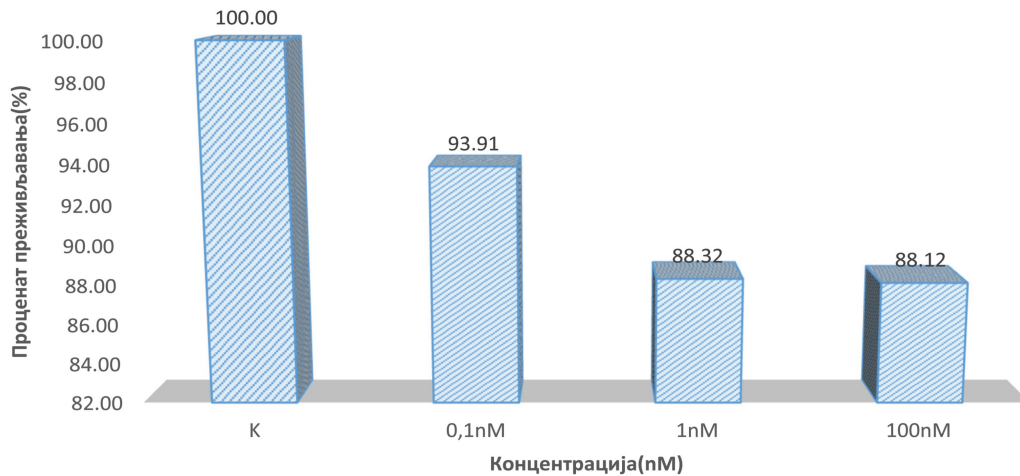
Комбинована примена нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе на ћелијској култури карцинома дебелог црева, најснажнији цитотоксични ефекти су забележени након третмана од 10 μ M, где је проценат преживљавања био 77,74% (Графикон 74).



Графикон 74. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) након 24-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

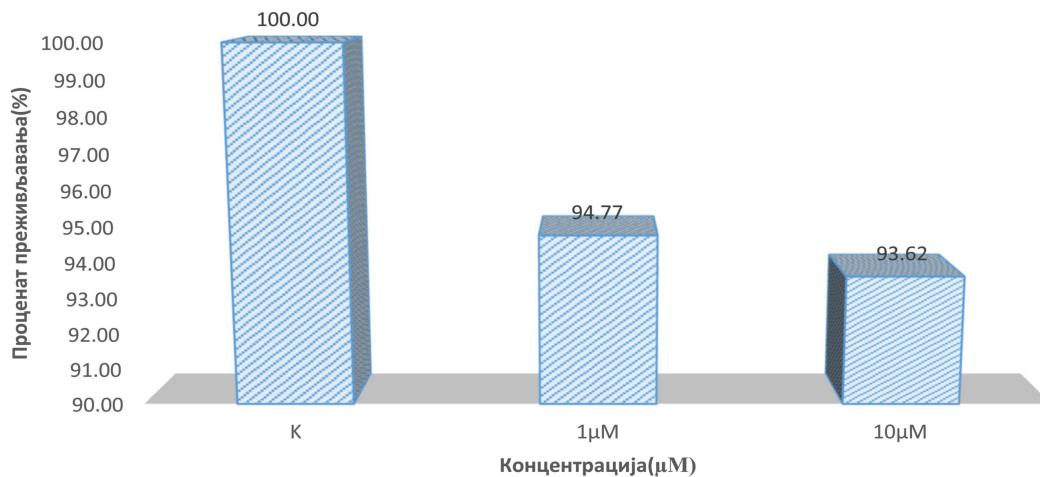
Временском инкубацијом, дејство комбиноване примене нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе забележен је тек мало снажнији цитотоксичан ефекат, код третмана 2-деокси-*D*-глукозом од 1 mM и нитроглицерином од 100 nM проценат преживелих ћелија је 88,12% (Графикон 75).

Временском инкубацијом, дејство комбиноване примене нитроглицерина у микромолским концентрацијама и 2-деокси-*D*-глукозе није забележено очекивано снажније цитотоксично дејство, чак је и код третмана 2-деокси-*D*-глукозом од 1 mM и



Графикон 75. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) након 48-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глюкозе

нитроглицерином од 10 μM забележено пролиферативно деловање те је проценат преживелих ћелија 93,63% (Графикони 76), наспрам 77,74% колико је било након 24-часовног третмана. (Графикони 74).

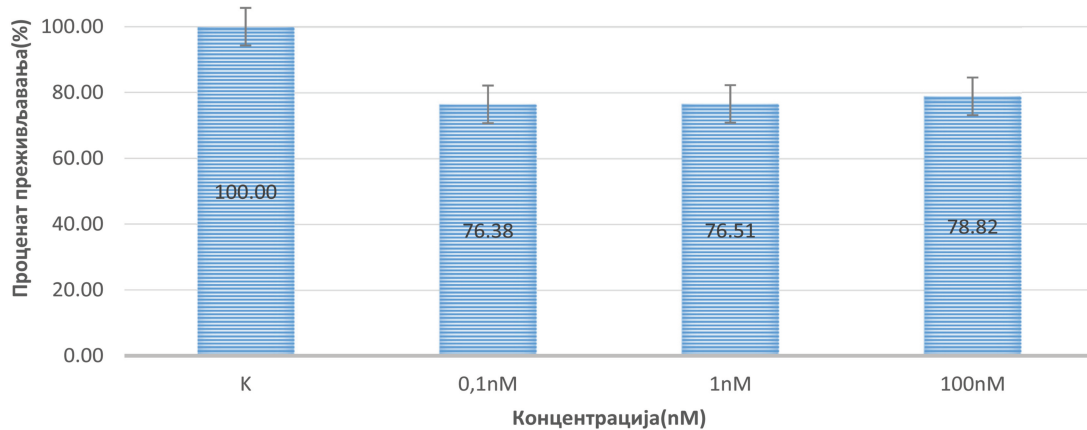


Графикон 76. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) након 48-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и микромолске концентрације 2-деокси-*D*-глюкозе

4.7.4. Цитотоксичност нитроглицерина и 2-Деокси-*D*-глюкоза праћена SRB тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (MRC5)

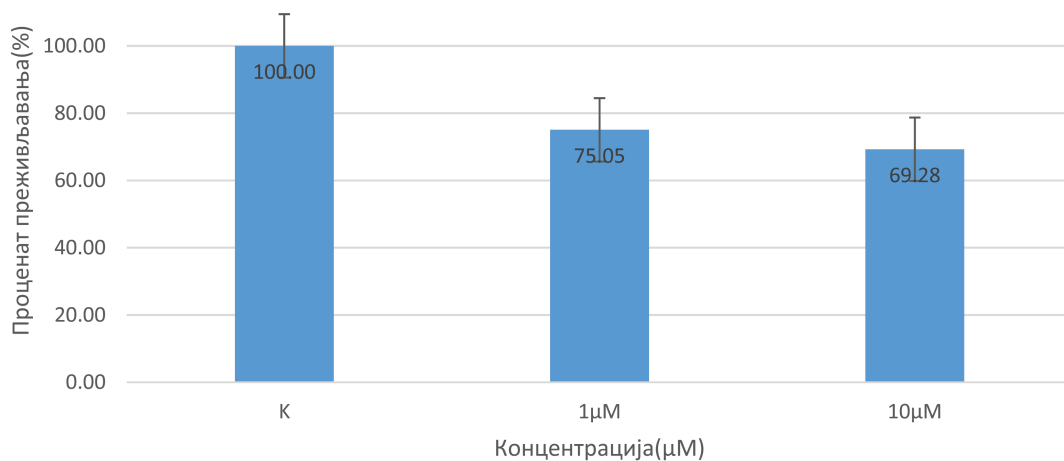
На здравим фибробластима плућа испитивана је комбинована примена нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глюкозе. Снажан цитотоксични ефекат забележен је применом 10 μM нитроглицерина и 1 $n\text{M}$ 2-деокси-*D*-глюкозе, а поготово је временском инкубацијом забележен мали проценат преживелих ћелија (графикони 78 и 80). Поредећи са ефектом који се постиже деловањем појединачно 2-деокси-*D*-глюкозе од 1 $m\text{M}$ (Графикон 24) као и нитроглицерином од 10 μM (Графикон 48) уочава се далеко снажнији ци-

тотоксични ефекат поготово након временске инкубације од 48 *h*. Како је показано на Графикону 77, након комбиноване примене 1 *mM* 2-деокси-*D*-глукозе и наномолских концентрација нитроглицерина, и 24-часовног третмана, проценат преживљавања је готово уједначен и износи 76,38%, 76,51% и 78,82%. Потврда да повећањем концентрације нитроглицерина не долази до смањења процента преживелих ћелија је и одређена IC_{50} која за овај третман износи 310 *mM*.



Графикон 77. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације 2-деокси-*D*-глукоза

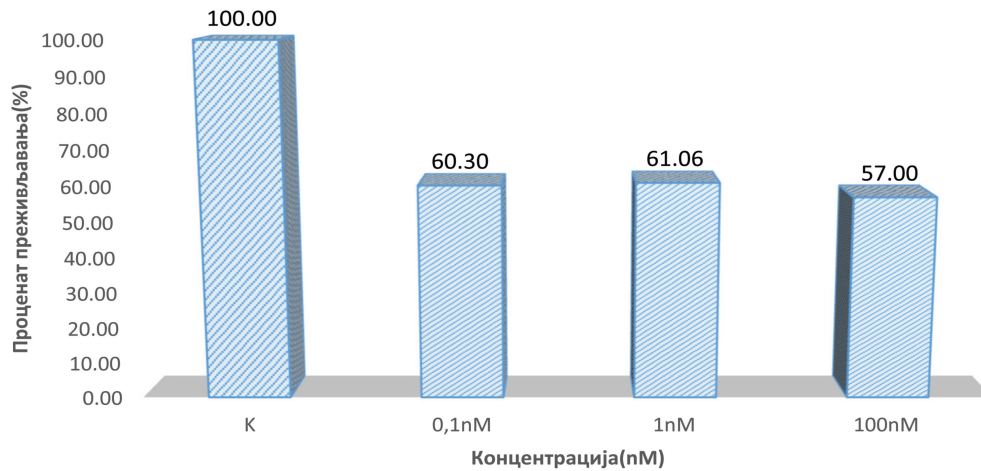
Дејством микромолских концентрација нитроглицерина у комбинацији са 1 *mM* 2-деокси-*D*-глукозе забележен је исти тренд са мало мањим процентом преживљавања, те при дози од 10 μ *M* нитроглицерина и 1 *mM* 2-деокси-*D*-глукозе је бип 69,28%. Одређена IC_{50} је изван опсега испитивања.



Графикон 78. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 24-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и микромолске концентрације 2-деокси-*D*-глукозе

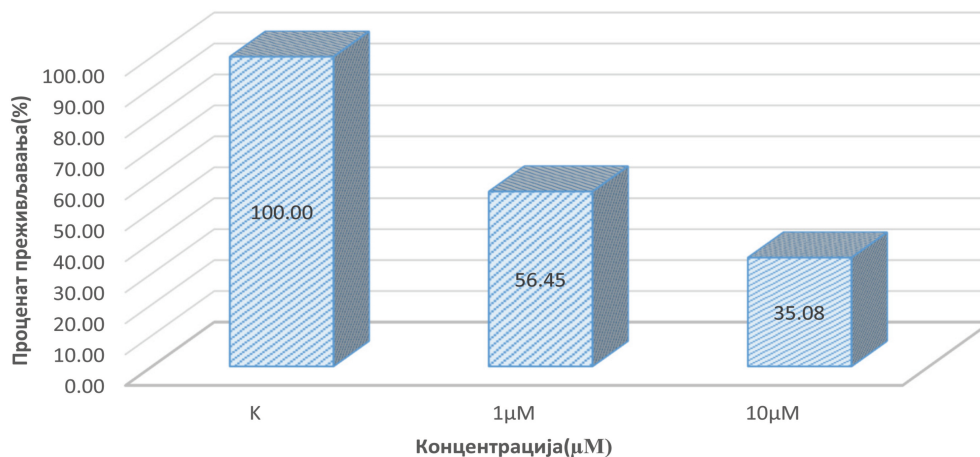
Исти тренд са ипак мањим процентом преживљавања добијен је и након 48-часовног третмана, дејством нитроглицерина у наномолским концентрацијама и 2-деокси-*D*-глукозе у милимолским концентрацијама, што је и показано на Графикону 79.

Добијени проценти преживљавања су 60,30%, 61,06% и 57% за дејство 1 *mM* 2-деокси-*D*-глюкозе и 0,1 *nM*, 1 *nM* и 100 *nM* нитроглицерина, ретроградно.



Графикон 79. Ефекат на хелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 48-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и микро-молске концентрације 2-деокси-*D*-глюкозе

Временском инкубацијом микро-молских концентрација нитроглицерина појачава се цитотоксичан ефекат, те је при дејству нитроглицерина у дози од 10 μM и 2-деокси-*D*-глюкозе од 1 *mM* проценат преживљавања 35,08%, као што је приказано на Графикону 80.



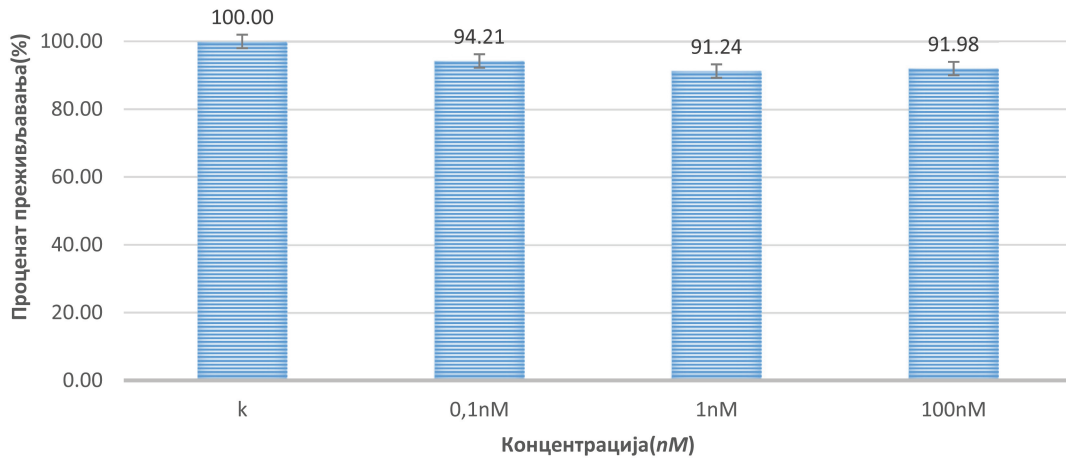
Графикон 80. Ефекат на хелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 48-часовног третмана дејством микро-молских концентрација нитроглицерина и микро-молске концентрације 2-деокси-*D*-глюкозе

4.8. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина

За испитивање цитотоксичности код истовремене примене нитроглицерина и кофеина, на основу података добијених индивидуалном применом нитроглицерина и кофеина, одлучено је да се хелијске културе карцинома цервикса, аденокарцинома плућа и карцинома колона третирају кофеином у дози од 1 *mM* и нитроглицерином у дозама од: 0,1 *nM*, 1 *nM*, 100 *nM*, 1 μM и 100 μM .

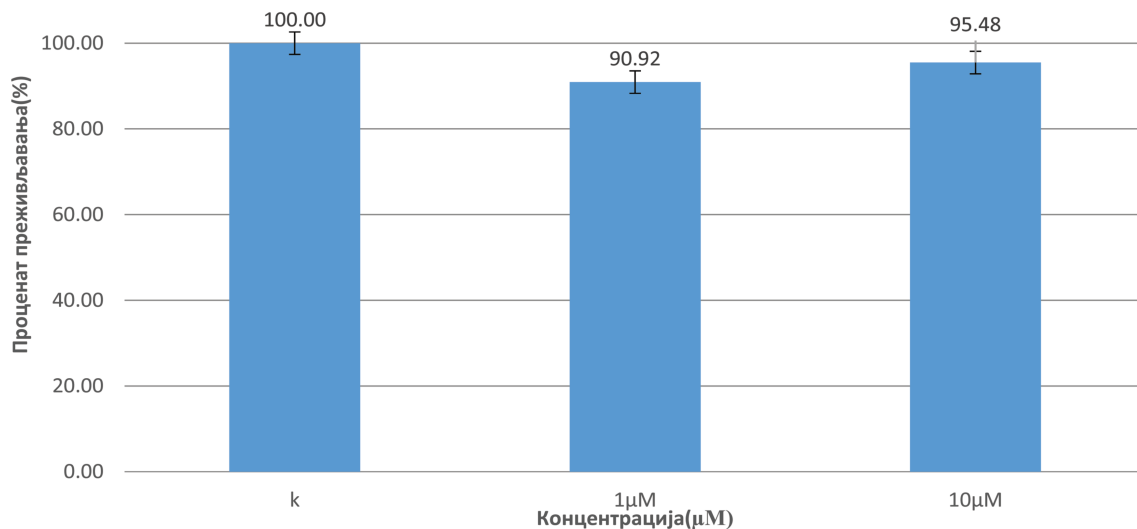
4.8.1. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце (*HeLa*)

Третмани ћелијске културе карцинома цервикса са кофеином и нитроглицерином временском инкубацијом од 24 *h*, није показао значајнији цитотоксични ефекат. Процент преживелих ћелија при микромолским као и наномолским третманом није био мањи од 90,92% (графикони 81 и 82).



Графикон 81. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације кофеина

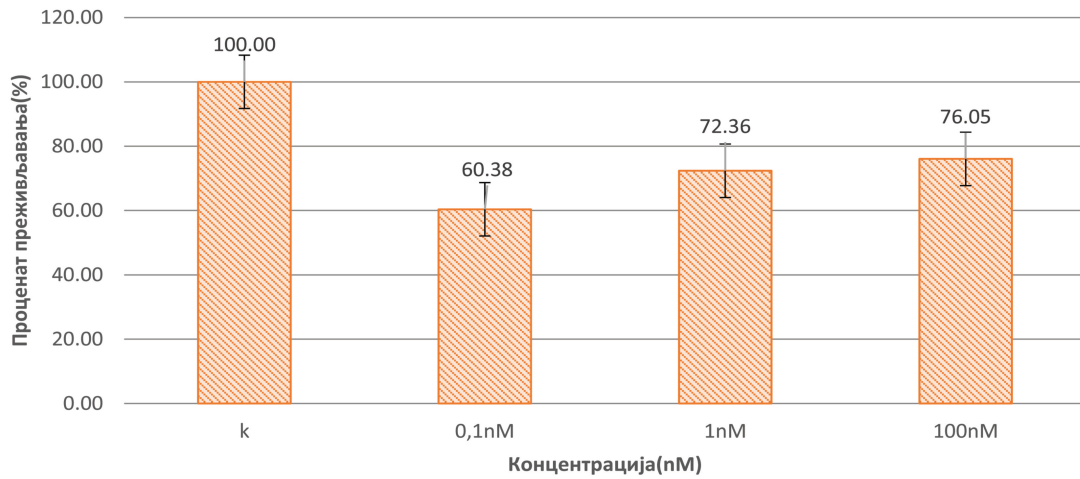
Најснажнији ефекат при 24-часовном третману постигнут је истовременом применом 1 *mM* кофеина и 1 μ M нитроглицерина и износи 90,92% (Графикон 82).



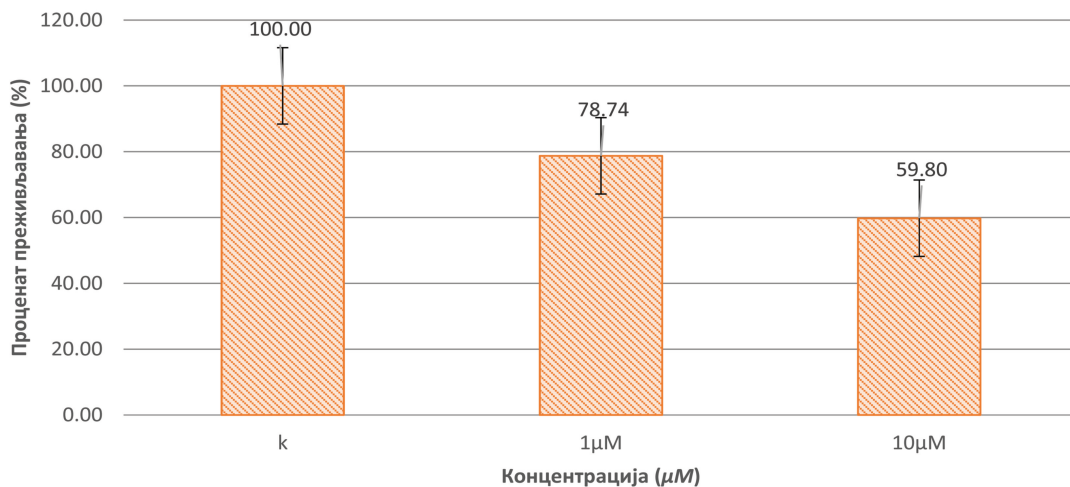
Графикон 82. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 48-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације кофеина

Комбинованом применом нитроглицерина и кофеина најснажнији цитотоксичан ефекат на ћелијској култури карцинома грлића материце постигнут је при деловању

кофеина од 1 mM и нитроглицерина од $0,1\text{ nM}$ $60,38\%$ (Графикон 83) као и при деловању кофеина од 1 mM и нитроглицерина од $10\text{ }\mu\text{M}$ $59,8\%$ (Графикон 84) при временској инкубацији од 48 h . Путем програма *CalcuSyn* није било могуће одредити IC_{50} ни у једном третману.



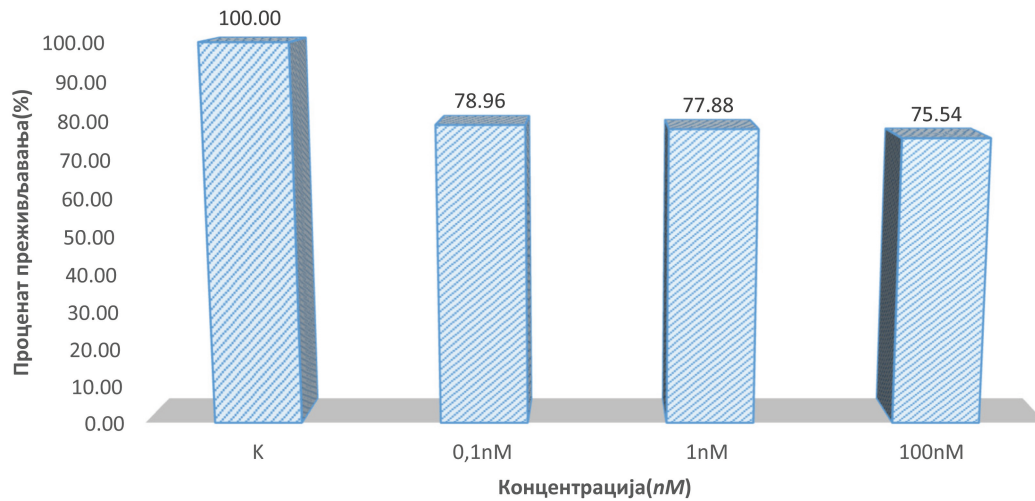
Графикон 83. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 48-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације кофеина



Графикон 84. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома грлића материце након 48-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације кофеина

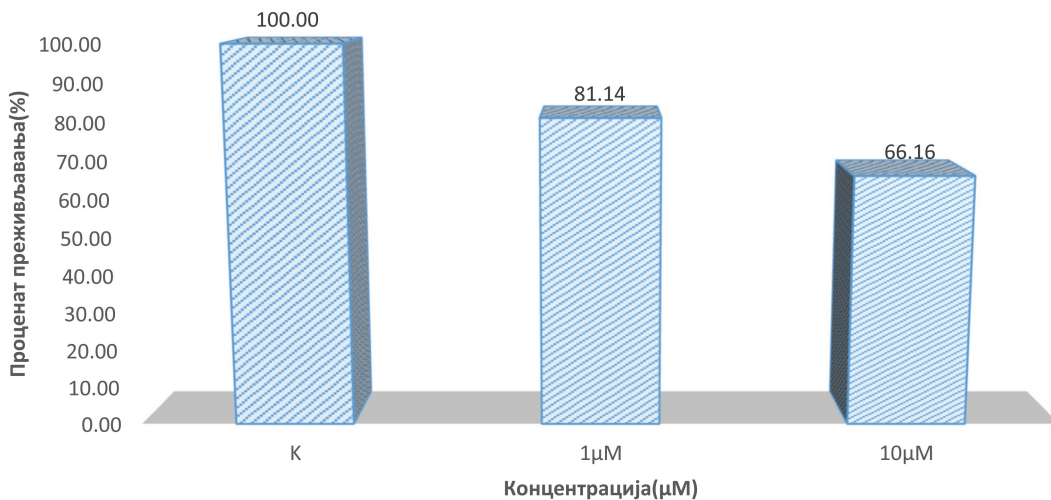
4.8.2. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина праћена *SRB* тестом на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549)

Дејством наномолских концентрација нитроглицерина и 1 mM кофеина, при 24-часовном третману, није забележен значајнији пад у проценту преживелих ћелија, те је он био $78,96\%$, $77,88\%$ и $75,54\%$ као што је показано на Графикону 85. Одређена IC_{50} је ван опсега испитивања.



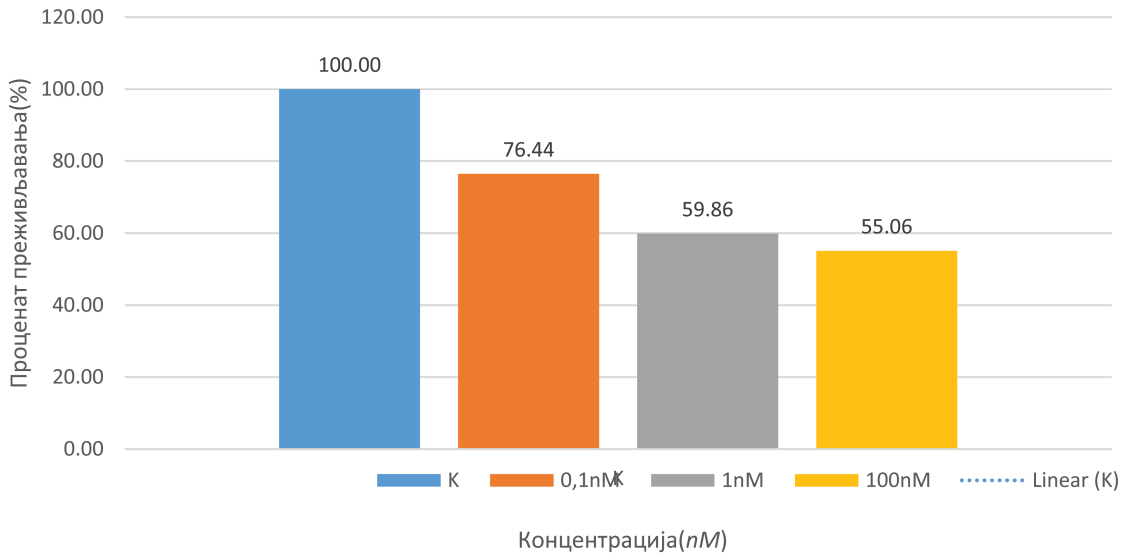
Графикон 85. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације кофеина

Дејством микромолских концентрација нитроглицерина и 1 mM кофеина, при 24-часовном третману, забележен је пад у проценту преживелих ћелија при дејству 10 μM те је он 66,16%, као што је показано на Графикону 86. Одређена IC_{50} је ван опсега испитивања и износи 0,0025 mM.

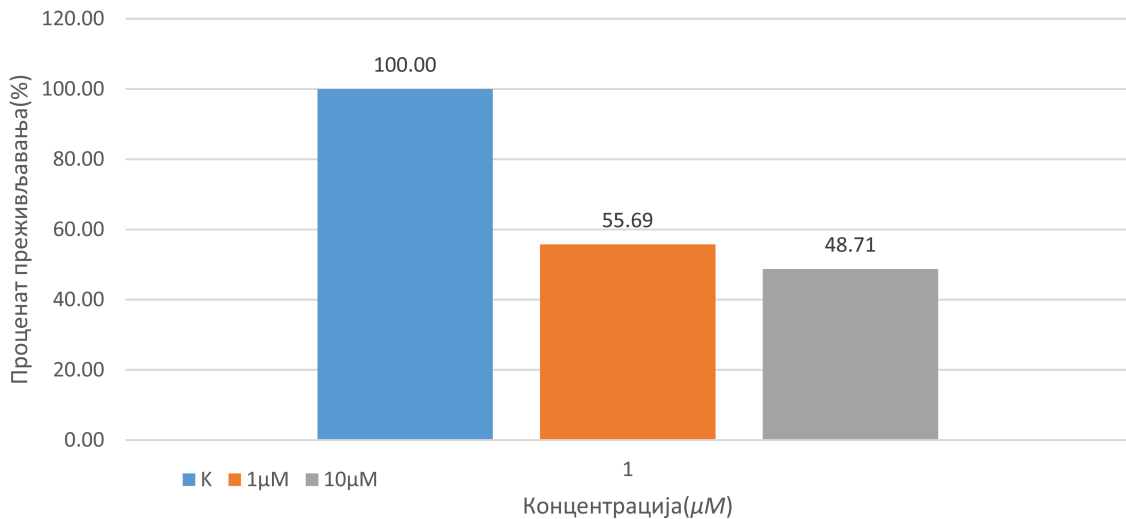


Графикон 86. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 24-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације кофеина

Исти тренд као при 24-часовном третману, у проценту преживелих ћелија, забележен је и након 48-часовне инкубације (графикони 87 и 88). На Графикону 87 се види да је мањи проценат преживелих након 48-часовног третмана наномолских концентрација те он износи 76,44%, 59,86% и 55,06% за третман кофеином од 1 mM и нитроглицерином од 0,1 nM, 1 nM и 100 nM. На Графикону 88 је показан проценат преживљавања након дејства 1 mM кофеина са 1 μM и 10 μM нитроглицерина и он износи 55,69% односно 48,71%.



Графикон 87. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 48-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације кофеина

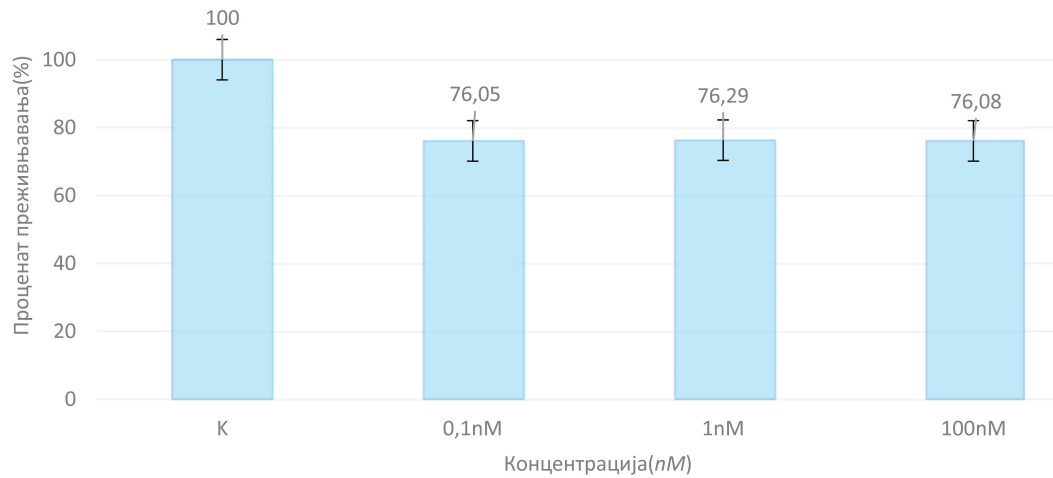


Графикон 88. Ефекат на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (A549) након 48-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и милимолске концентрације и кофеина

4.8.3. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина праћена SRB тестом на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29)

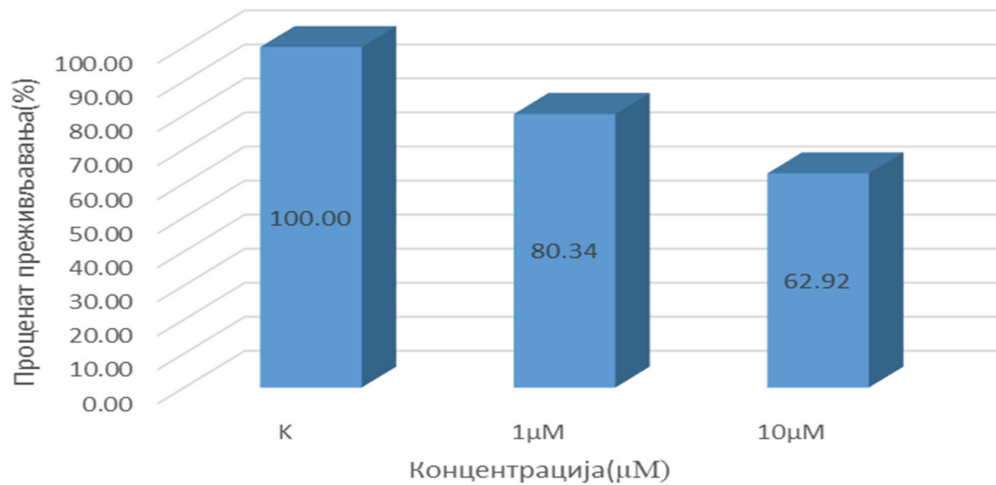
Третмани ћелијске културе карцинома дебелог црева са кофеином и нитроглицерином временском инкубацијом од 24 h, није показао значајнији цитотоксични ефекат. Процент преживелих ћелија при наномолским концентрацијама није био мањи од 76,29% што је и приказано на Графикону 89.

Одређена IC_{50} потврдила је још једном стабилност карцинома колона на овај третман и она је изван опсега испитивања.



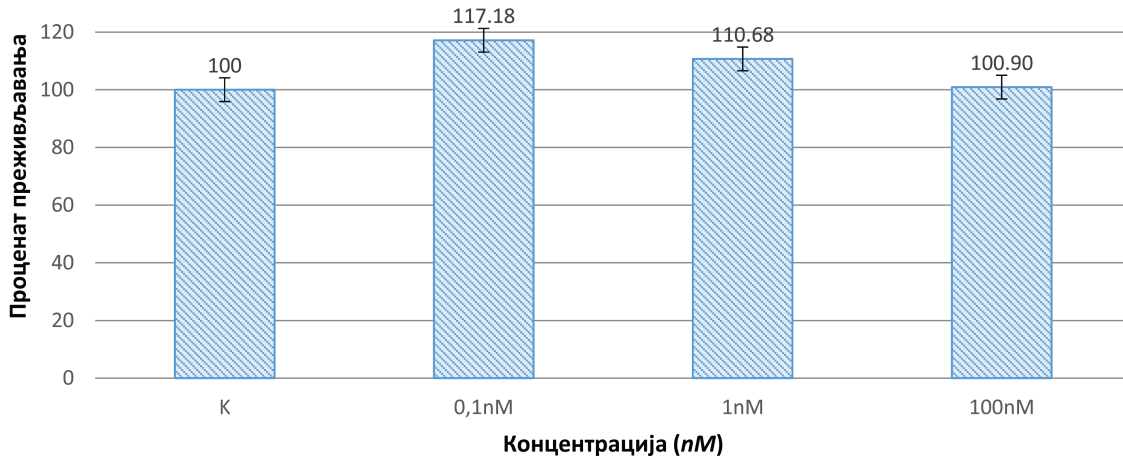
Графикон 89. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и микромолске концентрације кофеина

Значајнији пад у проценту преживелих ћелија је забележен при микромолском третману нитроглицерином у дози од $10 \mu\text{M}$ и милимолском третману кофеином и износи 62,92% (Графикон 90).



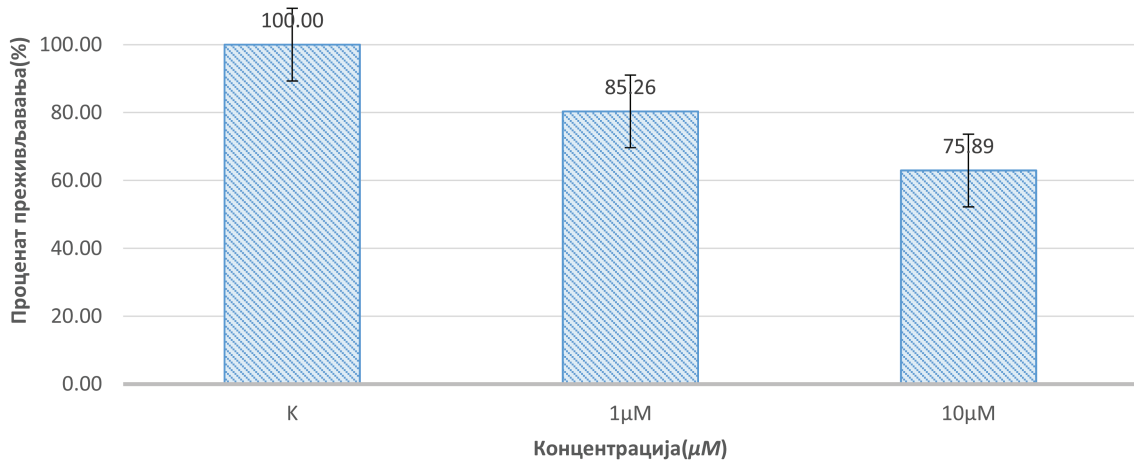
Графикон 90. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и микромолске концентрације кофеина

При заједничком дејству 1 mM кофеина и наномолским концентрацијама нитроглицерина од $0,1 \text{ nM}$, 1 nM и 100 nM , забележен је чак и пролиферативни ефекат, те су при свим концентрацијама нитроглицерина били проценти преживљавања изнад 100%, као што је показано на Графикону 91.



Графикон 91. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) након 48-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и микромолске концентрације кофеина

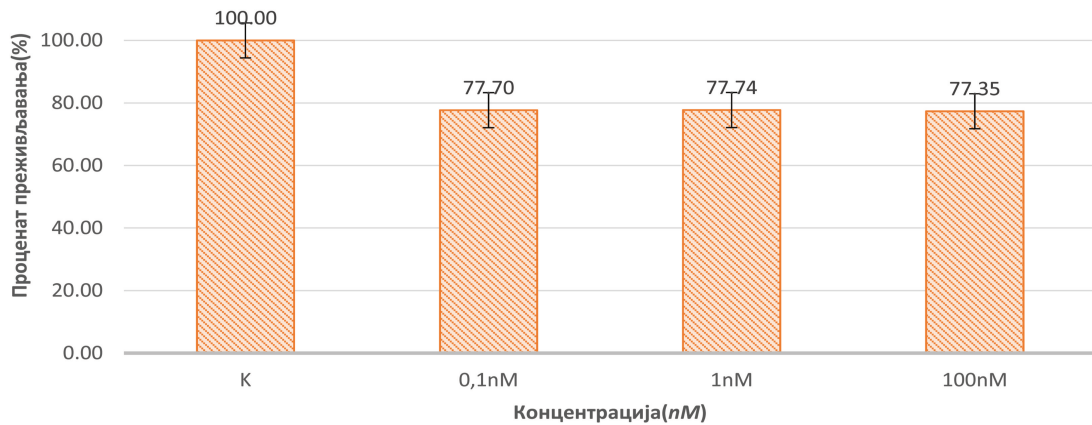
Инкубацијом временом евидентран је цитотоксични ефекат, те су проценти преживљавања 85,26% и 75,89%, након дејства кофеина од 1 mM и нитроглицерина од 1 μM односно 10 μM, ретроградно (Графикон 92).



Графикон 92. Ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева (HT29) након 48-часовног третмана дејством микромолских концентрација нитроглицерина и микромолске концентрације кофеина

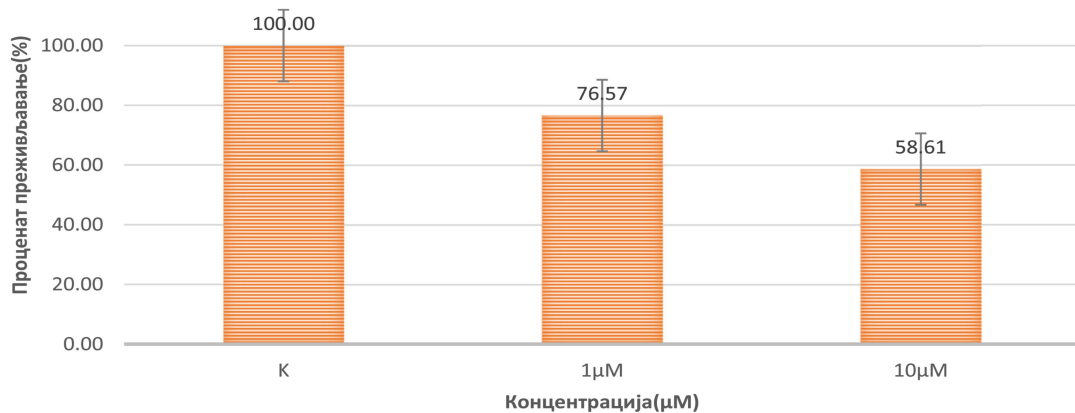
4.8.4. Цитотоксичност нитроглицерина и кофеина праћена SRB тестом на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (MRC5)

Цитотоксичност истовремене примене нитроглицерина и кофеина праћена је и на хуманој ћелијској култури нормалних фибробласта плућа (MRC5), у растућим концентрацијама нитроглицерина од 0,1 nM, 1 nM, 100 nM, 1 μM и 10 μM а кофеин у дози од 1 mM као што је приказано на графиконима 93, 94, 95 и 96. При 24-часовном третману наномолских концентрација нитроглицерина проценат преживелих ћелија MRC5 нигде није мањи од 77,35% што је и показано на Графикону 93.

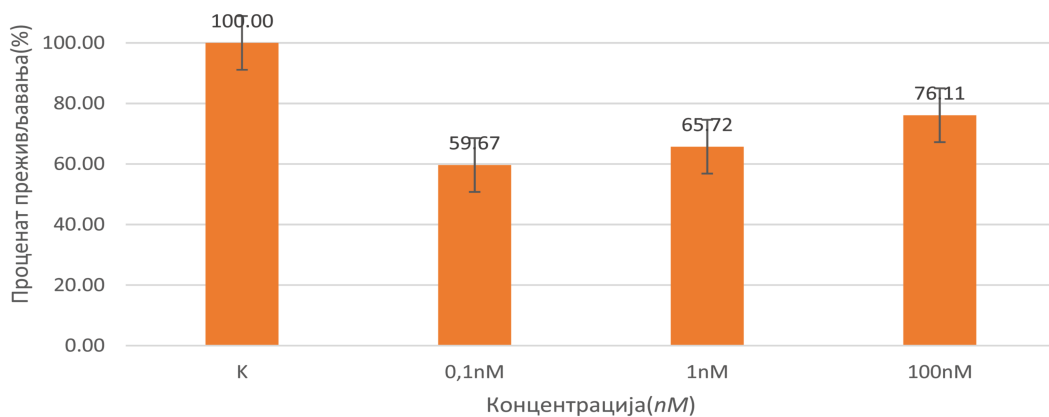


Графикон 93. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 24-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и микро-молске концентрације кофеина

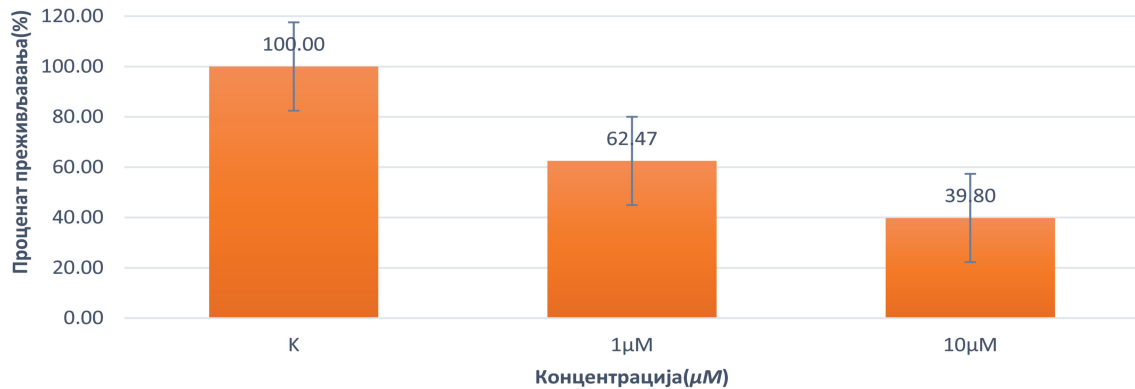
Повећањем концентрације нитроглицерина на $10 \mu\text{M}$ забележен је значајнији пад процента преживелих ћелија 58,61%, као што је и показано на Графикону 94. Ипак програмом *CalcuSyn* није било могуће одредити IC_{50} .



Графикон 94. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 24-часовног третмана дејством микро-молских концентрација нитроглицерина и микро-молске концентрације кофеина



Графикон 95. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 48-часовног третмана дејством наномолских концентрација нитроглицерина и микро-молске концентрације кофеина



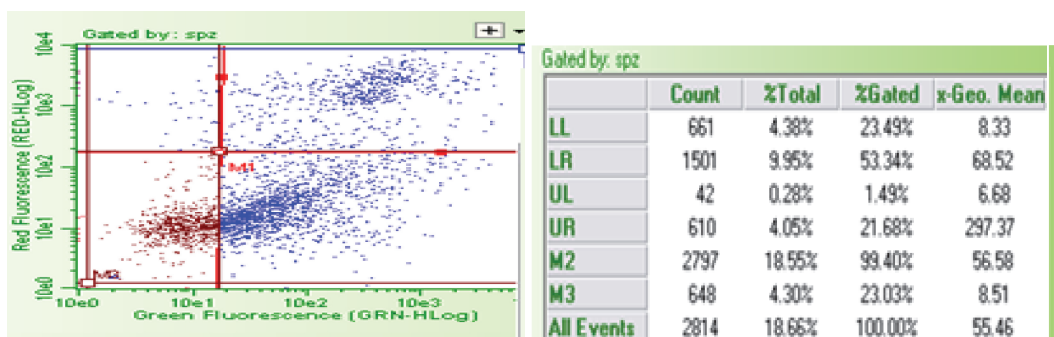
Графикон 96. Ефекат на ћелијској линији нормалних фибробласта плућа (*MRC5*) након 48-часовног третмана дејством микромољских концентрација нитроглицерина и микромољске концентрације кофеина

4.9. Апоптоза ћелија карцинома цервикса (*HeLa*) потенцирана дејством метформина

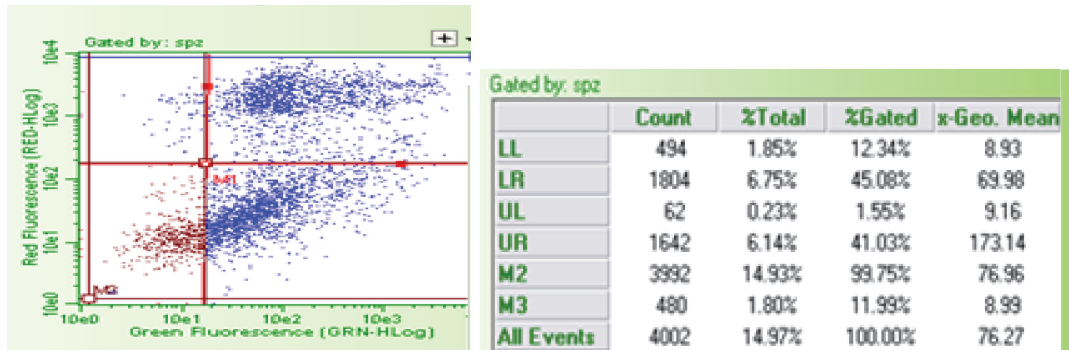
Апоптоза ћелија је одређивана проточном флоуроцитометријом, а приказани су репрезентативни хистограми и њима припадајућа читавања. На хистограму се на ординати налази апсорбанца зелене боје док је на апсциси флуоресценција црвене боје. У првом квадранту се налазе ћелије у касној апоптози (анексин V⁺/PI⁺), у другом квадранту се налазе мртве – некротичне ћелије (PI⁺/анексин-V⁻), у трећем квадранту се налазе живе ћелије (анексин V⁻/PI⁻), а у четвртом квадранту се налазе ћелије у раној апоптози (анексин V⁺/PI⁻). Први квадрант је представљен у табели са UR, други квадрант са UL, трећи квадрант са LL док је четврти квадрант приказан у припадајућој табели са LR.

Приказан је репрезентативни хистограм и припадајућа читавања из репрезентативног од најмање три одвојена експеримента.

Дејством метформина на ћелијској култури аденокарцинома цервикса и временском инкубацијом од 24 часа забележен је пад у броју живих ћелија и истовремени пораст у броју рано и касно апоптотичних ћелија (слика 15 и слика 16).

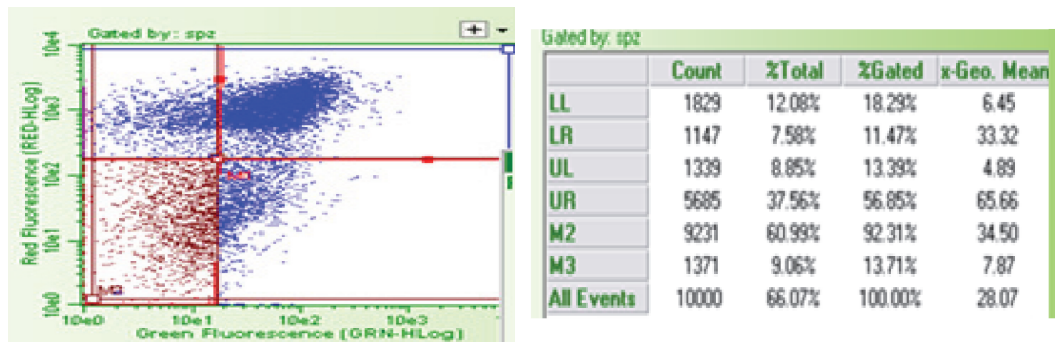


Слика 15. Анализа културе ћелија аденокарцинома цервикса (*HeLa*) без адјуваната након 24 часа.



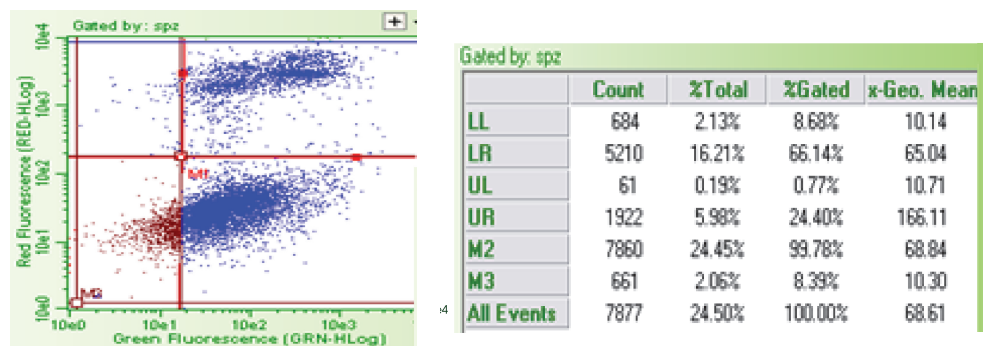
Слика 16. Метформин индукује заустављање ћелијског циклуса и апоптозу на ћелијама аденокарцинома цервикса (*HeLa*) дејством метформина након 24 сата.

HeLa ћелије су инкубиране са метформином (1 mM) и анализиране су проточном цитофлуориметријом након 24 сата. Приказани су репрезентативни хистограми и припадајућа читавања из репрезентативног од најмање три одвојена експеримента (слике 16 и 17).

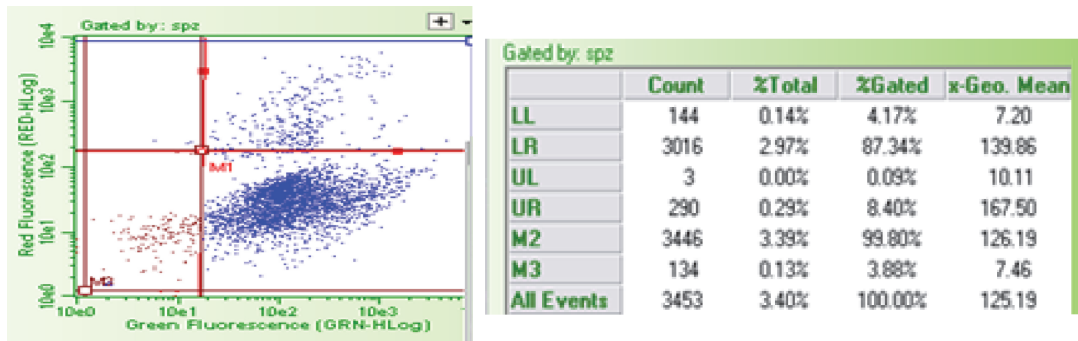


Слика 17. Метформин индукује заустављање ћелијског циклуса и апоптозу на ћелијама аденокарцинома цервикса (*HeLa*) дејством метформина након 48 сати

MRC5 ћелије су инкубиране метформином (1 mM) и анализиране су проточном цитофлуориметријом након 24 и 48 сати. Приказани су репрезентативни хистограми и припадајућа читавања из репрезентативног од најмање три одвојена експеримента (слике 18 и 19).



Слика 18. Анализа проточном цитометријом, на здравим фибробластима плућа без адјуваната, након 24 сата



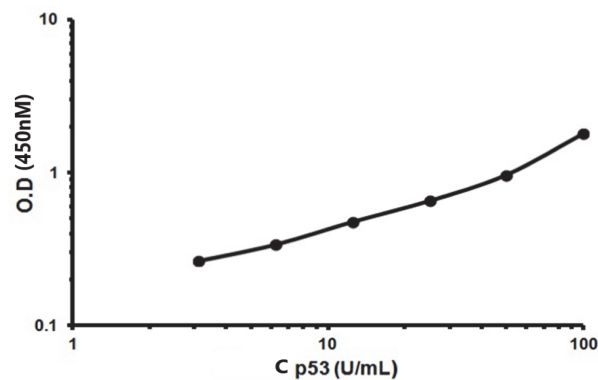
Слика 19. Дејство метформина на здравим фибробластима плућа, након 48 сати

4.10. Експресија *p53* на ћелијама карцинома цервикса (*HeLa*) потенцирана дејством метформина

Одређивање концентрације *p53* испитивањем на ћелијској култури аденокарцинома цервикса и здравим фибробластима плућа, вршено је *ELISA* тестом. *ELISA* тест је спроведен по протоколу произвођача *ABCAM*-а. Испитивање експресије тумор-супресорског гена *p53*, одређивано је на ћелијској култури карцинома цервикса, након третмана метформином, и након комбиноване примене метформина и кофеина, док се као контрола испитивање вршило здравим фибробластима плућа *MRC5*. У наставку следе подаци за стандардну калибрациону криву (Табела 3), приликом читавања на 450 nm (Табела 4) као и изглед типичне калибрационе криве (Графикон 96).

CONC(U/ml)	O.D.(450nm)
100	1.788
50	0.965
25	0.654
12.5	0.478
6.25	0.340
3.12	0.266
0	0.141

Табела 3. Стандарди за калибрациону криву



Графикон 97. Стандардна калибрациона крива за *p53*

Извор: <https://www.abcam.com/>

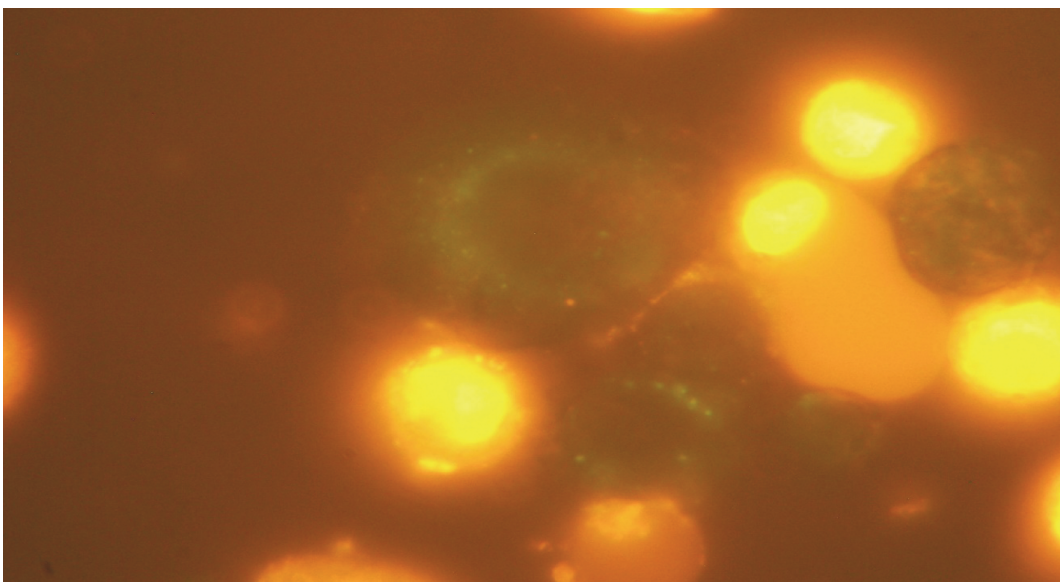
	24h O.D. (450nm) OČITANO	C(U/mL) p53	48h O.D. (450nm) OČITANO	C(U/mL) p53
Standard (S)	0.3	5.51	0.504	28.19
Kontrola (K)	1.344	75.16	0.623	34.84
Hela	1.371	76.67	0.518	28.97
Hela Met	0.755	42.23	0.583	32.60
Hela Met+Kof	0.572	31.99	0.464	25.95
MRC5	0.412	23.04	0.511	28.58
MRC5 MET	0.385	21.53	0.415	23.21
MRC 5 MET+KOF	0.365	20.41	0.395	22.09

Табела 4. Очитане вредности на *Hela* и *MRC5*, након 24-часовне и 48-часовне инкубације

Друга и четврта колона су очитане вредности, док су трећа и пета колона вредности добијене на основу вредности стандарда и калибрационе криве, где је O.D. апсорпција на мереној таласној дужини (450 nm) а *C* концентрација изражена по интернационалној јединици по милилитру *U/mL*.

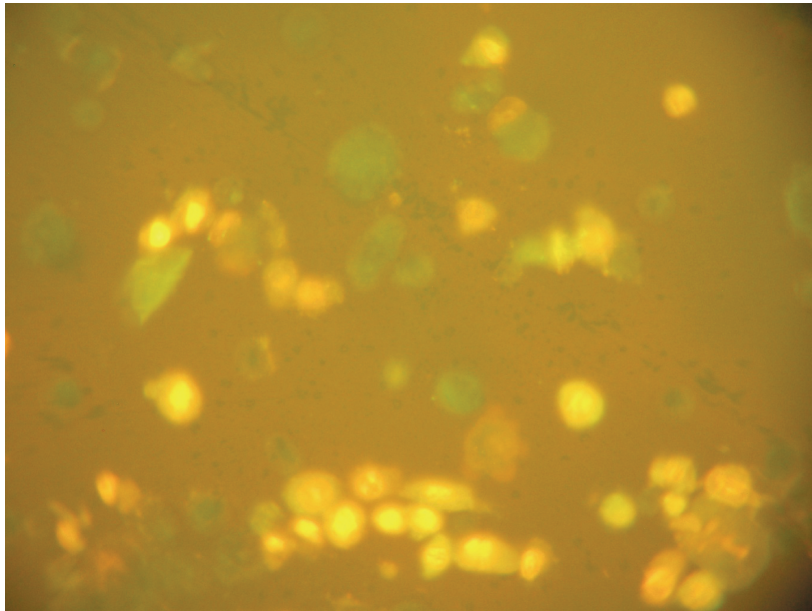
4.11. Апоптоза и некроза имунофлуоресцентним микроскопом

За испитивање ране, касне апоптозе и некрозе коришћен је анаксин *V*-тест и очитивање је вршено на имунофлуоресцентном микроскопу. На Слици 20 је приказана рана апоптоза, где се још увек види велики број живих ћелија карцинома цервикса које су обојене црвеном. Почетак апоптозе, везивањем анексина за своје рецепторе приказан је зеленом бојом.



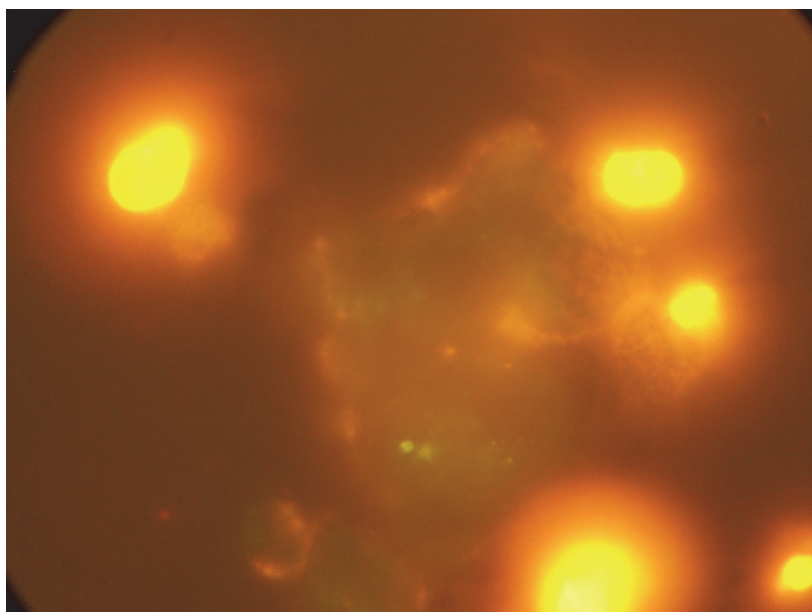
Слика 20. Рана апоптоза, дејством метформина на ћелијама карцинома цервикса (*HeLa*), имунофлуоресцентним микроскопом са великим увећањем (1.000 x)

На слици 21 се види велик број ћелија аденокарцинома цервикса које су већ везале анексин-*V* и обојене су зеленом бојом. Приказана је касна апоптоза.



Слика 21. Касна апоптоза, дејством метформина на ћелијама аденокарцинома цервикса (*HeLa*), имунофлуоресцентним микроскопом са великим увећањем (400x)

Лепо приказано везивање анексина-*V* за рецепторе на ћелијама аденокарцинома цервикса обојене интензивно зеленом бојом, Слика 22.



Слика 22. Рана апоптоза на ћелијама аденокарцинома цервикса (*HeLa*) дејством метформина, фотографисана под микроскопом са великим увећањем 1.000x.

5. ДИСКУСИЈА

Током протеклих 60 година дошло је до огромног напретка у многим научним и технолошким факторима који би требало да повећају ефикасност комерцијалног истраживања и развоја лекова (*RD*). Ипак, број нових лекова одобрених по милијарду долара потрошених на *RD* се преполовио на отприлике сваких девет година од 1950. године до данас [116]. Напредак у разумевању молекуларне основе болести проширио је број могућих терапијских решења за развој иновативних лекова у последњих неколико деценија [116]. Како Памоли (*Pammolli*) са сарадницима наводи, користећи велику базу података која садржи информације о истраживачко-развојним пројектима за више од 28.000 једињења испитиваних од 1990. године, забележен је пад истраживачко-развојне продуктивности у фармацеутским производима у протекле две деценије. Показано је да је тај пад повезан са повећаним улагањем у истраживање и развој лекова (*RD*) у секторима у којима је ризик од неуспеха висок [117]. Криза је нарочито присутна у онкологији, где је стопа успеха за нове лекове из фазе I које су одобрене од стране Америчке агенције за храну и лекове (*FDA*) у периоду од 2003. до 2011. године била око 6,7%, што је само око половине стопе за не-онколошке лекове [118]. Просечно време развоја антинеопластичних лекова, од тренутка првог подношења нове истраживачке апликације за лечење до добијања одобрења процењује се на 8,3 године [119]. У ери прецизне медицине, антиканцерска терапија прилагођена је појединачном пацијенту и заснована је на геномском профилу карцинома. Упркос све већем обиму генетских података о карциномима, повезивање профила мутације са ефикасношћу лекова и даље остаје изазов. Делимично одговор на ово нам даје и теза да су тумори еволутивно адаптивни системи, који показују висок степен интратуморске генетске хетерогености [120-121]. Алтернативна стратегија за развој нових лекова је испитати неко ново дејство већ постојећих регистрованих лекова, плејотропан ефекат. Типичан пример је лек *силденафил* који је оригинално развијен за терапију ангине пекторис и хипертензију, али који се сада успешно користи за терапију еректилне дисфункције [122].

У овој дисертацији показана је цитотоксичност метфомина, кофеина и 2-деокси-*D*-глукозе, на ћелијским линијама хуманог карцинома цервикса (*HeLa*), на ћелијској линији хуманог карцинома колона (*HT29*) и аденокарциному плућа (*A549*). Интересантно је истаћи да је у дисертацији показан и снажан цитотоксични ефекат при истовременој примени кофеина и метформина као и при истовременом применом метформина и 2-деокси-*D*-глукозе. Први део дискусије ће се бавити цитотоксичним деловањем метформина, на ћелијским културама карцинома цервикса (*HeLa*), карцинома колона (*HT29*) и аденокарцинома плућа (*A549*), а у другом делу ће се дискутовати резултат синергистичног ефекта.

Метформин је још од како је Evans (*Evans*) са сарадницима 2005. године показао да има снажан антитуморски ефекат постао предмет бројних истраживања [55]. Нашао

се у фокусу истраживања бројних *in vitro* и *in vivo* студија. Једно од главних ограничења у тумачењу многих претклиничких студија је висока концентрација метформина која се користи *in vitro* у односу на концентрацију која се може безбедно добити у клиничком окружењу. Већина *in vitro* студија наводила је дозу метформина између 1 и 40 mM (165–6.600 mg/l), што је знатно изнад могућих терапијских нивоа у плазми (0,465–2,5 mg/l или 2,8–15 μ M) код људи [123]. Да бисмо добили најадекватнију дозу која изазива цитотоксични ефекат, а која се може користити и за даља клиничка испитивања, метформином су све испитиване ћелијске културе третиране у широком опсегу, (од 0,05 mM до 50 mM) баш као што је Стамболић са сар. 2011. [61] навео, те смо се трудили да и потврдимо ефикасност метформина у дозама које су иначе уобичајне терапијске и та претпоставка је потврђена.

Испитивање утицаја метформина на ћелијску пролиферацију и апоптозу, раније је урађено на хуманим ћелијским културама, мијелоидне леукемије [69, 78], хепатоцелуларног карцинома [71], ћелијске културе карцинома простате [72, 77, 124], желуца [73], панкреаса [74, 79], јајника [75], глиома [80] и здравим ћелијама бубрега [81]. До сада је у неколико *in vitro* студија (Xiao са сар., 2012; Abd-Rabou са сар., 2017) потврђен је цитотоксични ефекат метформина за лечење карцинома грлића материце, што се подудара са подацима које смо и ми добили. Сјао (Xiao) са сарадницима 2012., потврдио да метформин снажно инхибира раст ћелијских линија карцинома грлића материце C33A, Me180 и CaSki, али је показао смањену ефикасност метформина у односу на ћелије HeLa, HT-3 и MS751 [125], док је у испитивању које је Абд Рабу (Abd-Rabou) са сар., 2017. спровео, дошло до значајног смањења ћелијске пролиферације ћелијских линија цервикалног карцинома, HeLa и Hep2, зависних од дозе. Abd-Rabou са сар., 2017) је испитивао пролиферацију на две ћелијске линије HeLa и Hep2 (хумане епителне ћелије које садрже HeLa хромозом) а третман је вршен метформином и ралоксифеном, појединачно као и у комбинацији доза од: 0, 20, 40, 60, 80 и 100 μ M. У студији је при истовременој примени метформина и ралоксифена од 100 μ M постигнут снажан цитотоксични ефекат где је забележена цитотоксичност у 80% ћелија. Сјао са сар. 2012. је испитивао утицај метформина на различите ћелијске културе карцинома грлића материце, дејствујући метформином у опсегу 0-20 mM и то при концентрацијама: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 и 20 mM. Испитујући дозну зависност истовремено се испитивала и временска зависност, након 24, 48 и 72 сата од додавања метформина. За испитивање вијабилности ћелија коришћен је MTT тест, док смо ми користили SRB есеј. Утицај метформина на апоптозу, одређиван је тако што су ћелије бојене пропидијум јодидом и испитиване на проточном цитометру. За испитивање на проточном цитометру HeLa ћелијска култура је третирана метформином концентрације 5 mM и након периода инкубације од 24 и 48 сати извршено је читавање. У нашем испитивању смо потврдили снажан цитотоксични ефекат дејством метформина на HeLa ћелијској култури, подједнако ефикасно и након 24 h и 48 h третмана. Утицај метформина на HeLa ћелијској култури, испитивали смо дејством тринаест различитих концентрација и то: 50 μ , 100 μ M, 250 μ M, 350 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM и 50 mM. Добијена IC₅₀ након 24 часа од 7,46 mM се временском инкубацијом за још 24 часа драстично смањује на 2,28 mM. Готово троструко снижење минималне концентрације при којој је само 50% ћелијске културе преживело, говори о веома снажном цитотоксичном

ефекту метформина који је подједнако и дозно и временски зависан. Поредили наше резултате IC_{50} са студијом коју је извео Сјао (*Xiao*) са сар. 2012, који су добили за ћелијске линије *C33A*, *CaSki* и *Me180* IC_{50} између 2,5 mM и 10 mM, док је IC_{50} за *HeLa*, *MS751*, и *HT-3* више од 20 mM, запажамо да је снажнији цитотоксични ефекат добијен у нашем испитивању. Један од разлога овако снажног цитотоксичног дејства које смо потврдили се може наћи у чињеници да су наше ћелијске културе карцинома грлића материце биле осетљивије на метформин у односу на ону коју су Сјао и сарадници користили. Занимљиво је истаћи да је Абд Рабу (*Abd-Rabou*) са сар., 2017, испитујући самостални утицај метформина при микромољским концентрацијама на ћелијским културама (*HeLa* и *Hep2*) није добио IC_{50} у опсегу испитивања (до 100 μ M), али постоји и временски и концентрацијски тренд који говори о смањењу броја преживелих ћелија. Закључак је да се испитивање вршило са сувише малим дозама метформина, док је при комбинованој примени метформина и ролаксифена добијена IC_{50} око 46 μ M, што иде у прилог синергистичном цитотоксичном ефекту код комбиноване примене.

Утицај на апоптозу и на аутофагију испитивао је *Xiao* са сар., 2012. Они су идентификовали испитујући *LKB1* / *eAMPK* / *mTOR* сигнализације, да метформин осетљиве ћелије карцинома грлића материце активирају *AMPK* преко *LKB1* и инхибирају *mTOR* [125]. Како су утврдили, присуство *LKB1* и очуваност стабилним трансмембранским системом у ендогеним *LKB1* дефицијентним ћелијама побољшала је активацију *AMPK*-а, која је промовисала инхибицију *mTOR*-а и изазвала сензитивност ћелија на метформин. Насупрот томе, осетљивост на метформин је изгубљена у ћелијским културама где је *LKB1* блокиран, док у ћелијама карцинома грлића материце код којих је експониран *LKB1*, метформин индукује апоптозу и аутофагију [125]. Ови резултати указују на перспективност метформина у лечењу карцинома грлића материце, нарочито у туморским ћелијама које поседују *LKB1*, повећавајући *LKB1* активност и активирајући *AMPK* [125].

Утицај на апоптозу након 24 h третмана метформином не можемо директно поредити са њиховим резултатом, јер су они испитивали само проценат ћелија који се налази у *G1/G0* фази ћелијског циклуса, што не мора директно водити у апоптозу (ћелија у *G1* фази се налази и фази одмора и ћелија користи време да исправи грешке у *DNK*), у односу на наш експеримент, где смо испитивали проценат ћелија у раној и касној апоптози, односно некрози. Утицај на рану и касну апоптозу, односно некрозу је испитивао и Сје (*Hsieh*) са сарадницима [127]. Сје са сарадницима је испитивао утицај метформина на ћелијској култури карцинома цервикса (*HeLa*) и карцинома дојке (*ZR-75-1*), пратећи вијабиност ћелија, утицај на апоптозу као и утицај на експресију *p53*. Сје са сарадницима 2018. је испитивао утицај метформина при дози од 0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM и 5 mM, а за испитивање ћелијске вијабилности употребљен је *MTT* тест, док је посматрана временска зависност те је читавање вршено након 30 h и 70 h. Добијена IC_{50} за *HeLa*, од 1,6 mM након 70 h третмана метформином може се поредити са нашом вредношћу IC_{50} за *HeLa*, од 2,28 mM након 48 h, али се ради о скоро двоструко дужој временској инкубацији, 70 h сати наспрам 48 h, тако да је и очекивана мања вредност IC_{50} . Поредили утицај на експресију *p53*, дошли смо до истог закључка, као и Сјао (*Xiao*), Сје, Спангл (*Spangle*) и Мингер (*Münger*) да се након третмана смањује експе-

сија. У испитивању смо потврдили, да проценат и рано и касно апоптоточних ћелија након дејства метформина од 5 mM и временске инкубације од 48 h, подстиче апоптозу, што је и Hsieh са сарадницима потврдио [127].

Према подацима сајта клиничких студија (енгл. *clinical trials*), до сада је завршено 118 студија, а у току је тренутно 55 студија у којима се метформин користи као анти-туморски агенс. Од тога се у 11 студија метформин користи као монотерапија, док се у 42 студије користи у комбинацији [123, 128]. Метформин се у 36 студија употребљава заједно са цитостатикима а у 6 студија метформин се користи као додатак радиотерапији. Испитивање дејства метформина на карциному плућа завршено је на пет клиничких студија, док су испитивања у току у још 7 студија [128].

У бројним епидемиолошким студијама потврђено је да метформин има снажан утицај на туморе дебелог црева [129–131]. У студијама је испитивање спроведено на одређеним групацијама становништва, било по полу или по националној припадности. Као што су и Mogavero са сар. 2017. и Ким (Kim) са сар. 2018. [132–133], навели у својим истраживањима, метформин значајно инхибира раст и пролиферацију ћелијских култура карцинома дебелог црева. Mogavero са сарадницима 2017. испитивао је утицај метформина на ћелијским културама карцинома колона и то: HT29, HCT116 и HCT116 p53 $-/-$, а читавање је вршено након инкубације од 24, 48 и 72 сата. За испитивање процента преживљавања коришћен је MTT тест, где је потврђено да постоји како дозна тако и временска зависност. Ћелијске културе су третиране метформином у опсегу од 1,25 mM до 80 mM. Како даље наводи, смањење пролиферације након континуираног излагања метформину током 24, 48 и 72 сата је детектовано у свим ћелијским линијама већ након 24 сата, а значајније изражено је након 72 сата [132], те је проценат са 54% пао на 48%, након 48 сата за HT29, при третману метформина од 5 mM. У нашем испитивању смо одређивали утицај метформина на ћелијској култури карцинома колона (HT29). Процент пролиферације након инкубације од 48 сати и дејства метформина од 5 mM пао је на 51%, што је у складу са истраживањем Могавера (Mogavero) који је потврдио да при овим дозама и при овим временским интервалима нема значајнијег утицаја на инхибицију апоптозе.

Утицај метформина, на различитим ћелијским културама карцинома дебелог црева као и одређивање разлога за сензитивност односно за резистенцију на метформин, испитавао је Ким (Kim) са сарадницима 2018. године. У експерименту су коришћене следеће ћелијске културе: HT29, DLD-1, LoVo и HCT116, а дејство метформина је испитивано након 48 сати, при третману од 5 mM, 10 mM и 20 mM. У експерименту је потврђено да је HT29 ћелијска култура карцинома дебелог црева осетљива на метформин. За израженији цитотоксичан ефекат потребно је дуже временско излагање метформину, као и излагање дозама од 10 mM и већим [133], тако је Kim део ћелијских култура инкубирао чак 18 дана. Ким са сарадницима је, ради потенцирања дејства метформина и испитивања ефекта метформина на метаболизам глутамата, додавао и инхибиторе глутаминазе (супстанца 968).

У испитивању које смо ми урадили, при комбинованој примени метформина и кофеина, као и метформина и 2-деокси-D-глюкозе, доказали да се значајно потенцира цитотоксични ефекат на ћелијској култури аденокарцинома колона. Тако је IC₅₀ за трет-

ман *HT29* само са метформином пала са 26,53 *mM* након 24-часовног третмана, односно IC_{50} 10,54 *mM* након 48-часовног третмана, на IC_{50} 3,4 *mM* након дејства метформина и 2-деокси-*D*-глукозе и временске инкубације од 24 сата, и IC_{50} 4,25 *mM* након дејства метформина и 2-деокси-*D*-глукозе и читавања након 48 сати. Док је истовременом применом метформина и кофеина, цитотоксични ефекат био још снажнији и то је IC_{50} пала са 24,53 *mM* (24 *h*), односно 10,54 *mM* (48 *h*) на IC_{50} 0,0006 *mM* и након 24-часовног и 48-часовног третмана. Можемо рећи да дејство метформина на *HT29* ћелијској култури код самосталне примене метформина показује и дозну и временску зависност. Такође самостална примена кофеина на *HT29* ћелијској култури показује и дозну и временску зависност, међутим као што смо већ навели код комбиноване примене метформина и кофеина, губи се временска зависност. Дејство метформина и кофеина при комбинованој примени представљено је графицима 61 и 62. Евидентно је да цитотоксични ефекат постоји али је ипак при дејству кофеина од 1 *mM* и метформина у дози до 1 *mM* (што је максимална примењена доза метформина код комбиноване примене) преживело 70,49% ћелија *HT29* након временске инкубације од 24 сата, док је након 48 сати преживело 64,15%. Постоји исти тренд и након 24 сата и након 48 сати, са снажним цитотоксичним ефектом (70,49% наспрам 64,15%) ипак израчунавањем у програму *CalcuSyn* добијене су исте вредности IC_{50} .

Закључак испитивања које је обавио Закијани (*Zakikhani*) са сар. 2008. год. потврдио је наше истраживање, да метформин само привремено зауставља раст ћелијских култура карцинома колоне, те да би требало уложити напоре да би се идентификовала једињења која у комбинацији са метформином могу деловати синергистички да индукују иреверзибилну ћелијску смрт [124].

Последње деценије се велика пажња поклања и дејству метформина на карцином плућа. У прилог томе иду и многе епидемиолошке студије које потврђују ефикасност метформина [123, 128, 134-139]. Којл (*Coyle*) са сар. 2016, своје испитивање засновао је на претраживању истраживачке базе података, сажетке конференција и пробних регистара за било које студије које су пријавиле резултате за одређене типове карцинома код пацијената на метформину у поређењу са оним који не користе метформин. Све студије су процењене у погледу дизајна и квалитета, и спроведена је мета-анализа за квантификацију адјувантног ефекта метформина на преживљавање без рецидива (*RFS*), укупног преживљавања (*OS*) и преживљавање специфично за рак (*CSS*). Код карцинома колоне *RFS* процењен је у две студије (623 пацијента), *OS* у пет студија (1.936 пацијената) и *CSS* у две студије [134]. Морђило (*Morgillo*) са сар. 2017. испитивао је утицај метформина на способност метформина да обнови отпорност на gefitinib, инхибитор селективног рецептора епидермални фактор раста (*EGFR*) тирозин киназе, *EGFR/LKB1*, код пацијената са немикроцелуларним карциномом плућа (*NSCLC*). Фаза I–II испитивања метформина у напредном карциному плућа (*METAL*) дизајнирана је да идентификује максимално толерисану дозу и да процени безбедност и активност метформина у комбинацији са ерлотинибом у третману друге линије, болесника са IV стадијумом немикроцелуларног карцинома плућа, чије ћелије носе *VT EGFR* ген, и као резултат добијено је да се након третмана од 30 недеља метформином у дози од 1.500 *mg* и ерлотинибом од 150 *mg* код 50% пацијената је болест била под контролом [135].

Чуанг (*Chuang*) са сар. 2018. је вршио испитивање утицаја метформина на пацијенте са иноперабилним немикроцелуларним карциномом плућа. Да би дошли до података о пацијентима који имају дијабетес и немикроцелуларни карцином плућа коришћена је Национална база података здравственог осигурања Тајвана.

Испитивање је обухватило укупно 7.620 пацијената од којих је 3.578 потреба метформина повезана са дужином укупним преживљавањем пацијената са неоперабилним немикроцелуларним карциномом плућа [136].

Слично испитивање је спровео и Смјечовски (*Smiechowski*) са сар. 2012. год., али су добијени подаци потпуно другачији. Они су испитивали да ли пацијенти са дијабетесом мелитус тип 2 који користе метформин имају мањи ризик од настанка карцинома плућа. Користећи британску базу података породичне медицине, за период 1998-2009. године, дошли су до података о пацијентима код којих су недавно уведени орални хипогликемијски агенси (*ОНА*). Спроведена је укрштена анализа, где је код испитаника са карциномом плућа праћено још 10 контролних фактора за старост, пол, дужину трајања болести и време употребе оралних хипогликемика. Условна регресија је коришћена за процену односа између карцинома плућа и употребе метформина, заједно са дужином трајања терапије као и са укупном употребљеном (кумулятивном) дозом. Студија је обухватила 115.923 пацијената код којих је уведен нови орални хипогликемик, од тога 1.061 пацијент са дијагнозом карцинома плућа [137]. Смјечовски је са сар. 2012. год., закључио да употреба метформина није повезана са смањеним ризиком од карцинома плућа код пацијената са дијабетесом типа 2, иако је мањи ризик пријављен у другим опсервационим студијама вероватно као последица различите методологије.

Управо због неконзистентности објављених података о примени метформина код пацијената који имају карцином плућа, Цао (*Cao*) са сарадницима 2017. год., урадио је систематски преглед и метаанализу који су имали су за циљ да сумирају најновије ефекте метформина код дијабетичара са карциномом плућа. У студији су обухваћени сви објављени радови и сажети до априла 2017. године, који су садржали један од термина, метформин, карцином плућа, дијабетес мелитус, смртност, преживљавање и прогноза. Збирне процене ризика за асоцијације третмана метформином са укупним преживљавањем (*OS*) и преживљавањем без прогресије (*PFS*) анализиране су помоћу модела случајних/ фиксних ефеката [138]. На основу 10 студија укључених у анализу, Цао са сарадницима 2017. год., утврдио је да третман метформином значајно побољшава како укупно преживљавање, за 23% а преживљавање без прогресије за 47%. Поред тога, значајна побољшања у укупном преживљавању немикроцелуларног карцинома плућа (*NSCLC*), али и микроцелуларног карцинома плућа (*SCLC*) су уочени у вези са третманом метформином у квантификованој анализи по хистолошком типу [138]. Закључак спроведене метаанализе јесте да третман метформином значајно побољшава и укупно преживљавање и преживљавање без регресије код пацијената са дијабетесом мелитус тип 2 оболелих од карцинома плућа, те налази указују на то да метформин може бити ефикасна опција за лечење карцинома плућа код дијабетичара.

У првој студији утицаја метформина на пацијенте „недијабетичаре“ са немикроцелуларним карциномом плућа и његовим метастазама, коју су реализовали Мароне (*Marrone*) и сар. 2018. год., спроведено је испитивање утицаја метформина на пацијенте

који су били на хемотерапији и примали карбоплатин, паклитаксел и бевацизумаб, четири до шест циклуса [139]. Након тога уследила је терапија одржавања бевацизумаб-метформин, све до прогресије болести, неподношљиве токсичности или искључења из студије. Примарни исход био је једногодишње преживљавање без прогресије болести, док је секундарни циљ био укупно преживљавање као и одговор на терапију и токсичност. Закључак који је Мароне са сар. 2018 год. донео слаже се испитивањем Цаоа и сарадника 2017. год. као и са нашом хипотезом и испитивањем да се метформин може веома ефикасно користити код пацијената са дијабетесом у терапији карцинома плућа.

Испитивање дејства метформина на ћелијским културама плућа најчешће је додаток примени или хемотерапије или зрачења, тако се и радови које ћемо продискутовати тичу управо комбиноване примене. Китацона (*Kitazono*) са сарадницима 2013. год., испитивао је утицај метформина на резидуалне ћелије после хемотерапије. Испитивање је обухватило *in vitro* испитивање цитотоксичности метформина на ћелијској култури аденокарцинома плућа *PC9*, као и *in vivo* испитивање на мишјем моделу. Ћелијска култура *PC9* је *A570* ћелијској линији аденокарцинома плућа која има активну делецију *EGFP* гена. Ћелијска линије је била третирана појединачно метформин у дози од 10 mM, гефитинибом у дози од 0,03 μM и дисплатином у дози од 1,5 μg/ml, при чему је забележен снажан цитотоксичан ефекат, те је након 72 сата забележено чак смањење броја ћелија за 90% [140]. Закључак студије Китацона и сарадника из 2013. год. да метформин није потиснуо раст већ успостављених тумора, нити је метформин повећао скупљање тумора гефитинибом, али је метформин значајно потиснуо поновни раст тумора након ефикасног лечења гефитинибом, указујући на специфичан ефекат метформина на резидуалне ћелије. *In vitro* цитотоксичност метформина карактерише одсуство индукције апоптозе и немерљива промена ћелијског циклуса – слично како смо ми добили у нашем испитивању. Такође циљање резидуалних ћелија након хемотерапије може представљати ефикасну нову стратегију за лечење карцинома плућа [140]. Резултати цитотоксичности код нашег испитивања иду у прилог комбинованој примени метформина са неким од адјуваната, било кофеином или 2-деокси-*D*-глукозом. Добијена IC_{50} код самосталне примене метформина на ћелијској култури *A549*, након 24-часовног третмана је 14,79 mM; док се већ временском инкубацијом још 24 сата, IC_{50} смањује на 3,30 mM (графикони 10 и 11).

Шеклфорд (*Shackelford*) са сар. 2013. год. је испитивао утицај бигванидина на ћелијским културама карцинома плућа: *H460*, *H157*, *A549*, *H838* и *A427*; као и на ћелијској култури карцинома цервикса *HeLa*. У експерименту је коришћен метформин у дозама од 2 mM и 20 mM, фенформин у дози од 2 mM, 2-деокси-*D*-глукоза у дози од 10 mM а троглитазон у дози од 25 μM. Поред испитивања на ћелијским културама испитивање је вршено и *in vivo* на мишјем моделу за карцином плућа који носи *LKB1* мутацију. Добијени резултати указују на потентност аналога метформина, фетформина, који селективно изазива апоптозу и то у *LKB1* дефицијентним ћелијама. Како смо већ навели *LKB1* је главна узводна киназа која активира киназу *AMPK*, чинећи *LKB1* дефицијентне ћелије неспособним да на одговарајући начин осете метаболички стрес [141].

Како је Цанг (*Zhang*) са сарадницима 2017. год. утврдио, у свом истраживању на ћелијским културама немикроцелуларних карцинома плућа *A549*, *HCC827* и *H1975*

потврђено је антипролиферативно дејство метформина при истовременој примени са пеметрекседом. Ћелијске културе су третиране метформином: 2 mM, 4 mM, 8 mM, 10 mM и 20 mM и пеметрекседом у дози од: 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5.0 μ M и 10 μ M. За одређивање пролиферације ћелија, након 24-часовног и 48-часовног третмана метформином и пеметрекседом коришћен је CCK-8 тест. Добијени резултати говоре о далеко већој осетљивости ћелијских култура HCC827 и H1975, у односу на A549, а добијене IC_{50} након 48 сати су 12 mM за ћелијску културу A549, 5 mM за HCC827 и H1975, као и о чињеници да се IC_{50} драстично повећава временском инкубацијом као и додатком пеметрекседом [142]. Утицај на рану и касну апоптозу је одређиван проточном цитометријом, где је утврђено да је метформин у комбинацији са пеметрекседом показао већи проценат апоптозе, потврђено смањеном експресијом *Bcl 2* а повећана експресија *Bax*-а. Добијена вредност IC_{50} у нашем експерименту за A549, као што смо навели, је 3,3 mM, и вишеструко је мања од вредности коју су добили Џанг и сар. 2017. год. Ово можемо тумачити већом осетљивошћу наше ћелијске културе, али и различитом методологијом за испитивање, ћелијске цитотоксичности.

У истраживању које је спровео Џао (*Zhao*) са сар. 2014. испитиван је утицај метформина на *IL-6* и даље његов утицај на епителијално-мезенхималну транзицију (*EMT*), која игра важну улогу у туморогенези карцинома. Потврђено је *MTT* тестом да метформин у дозама од: 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM; 10 mM и 12,5 mM на ћелијским културама аденокарцинома плућа: A549 и HCC827, и након инкубације од 48 сати, инхибише интерлеукином 6 (*IL-6*) индуковану епителијално-мезенхималну транзицију [143]. Даљи утицај метформина на *EMT*, аутори су потврдили и *in vivo* на мишјем моделу. Испитивање утицаја метформина на модулаторе прогресије *EMT* од великог је значаја јер управо су мезенхимске ћелије код аденокарцинома плућа одговорне за отпорност и резистенцију на хемотерапију и инхибиторе тирозин киназе [143]. Испитивање синергистичког ефекта метформина и цисплатина и етопозидна на ћелијској линији карцинома немикроцелуларног карцинома плућа *NCI-H460* испитивао је и Теишеира (*Teixeira*) са сар. 2013. Они су користили третман како метформином тако и цисплатином и етопозидом у различитим концентрацијама и при временској инкубацији од 24 сата. Највећу IC_{50} око 60 mM управо је имао метформин, док су IC_{50} за цисплатин и етопозид вишеструко мање, 0,19 mM и 0,37 mM, ретроспективно. Код комбиноване примене метформина са цисплатином евидентиран је далеко јачи синергистички ефекат него код примене метформина и етопозидна или при монотерапији цисплатином [144].

Морђило (*Morgillo*) са сарадницима 2013. год. на немикроцелуларним ћелијским културама карцинома плућа: H1299, H1975, A549, H460, GLC82, H460 и CALU-3, вршио је испитивање дејства метформина и селективног инхибитора тирозин киназе гефитиниба. Метформином су наведене ћелијске линије карцинома плућа третиране у дозама од 0,1 mM до 20 mM а читавање је вршено након 72 сата. Добијени подаци IC_{50} за H1299, GLC82, H1975, CALU-3 је између 2 mM и 2,5 mM; док је на ћелијским културама H460 и A549 IC_{50} добијена изван опсега испитивања, више од 20 mM [145].

Морђило са сарадницима је 2013. године за одређивање цитотоксичности метформина користио *MTT* тест. Познато је да метформин утиче на ћелијско дисање, те може доћи до утицаја на резултате *MTT* теста, те смо управо из овог разлога за испи-

тивање цитотоксичности метформина користили *SRB* есеј. Закључак је да метформин и гефитиниб синергистички делују на *LKB1* ћелијске културе карцинома плућа, али да су потребне даље студије да би се боље истражио ефекат дејства метформина на пут *Ras/Raf/MAK*, као и са којим адјувантима би била оптимална примена [145]. С друге стране, синергистички ефекат код комбиноване примене метформина и јонизујућег зрачења је испитивао Сторозук (*Storozhuk*) са сар. 2013. На ћелијским културама аденокарцинома плућа *A549*, *H1299* и на сквамозној ћелијској линији карцинома плућа *SK-MES1*, дејствовано је метформином у дозама од $5\ \mu\text{M}$ до $5\ \text{mM}$ самостално и у комбинацији са зрачењем од 2 до 8 Gy [146]. У испитивању је закључено да метформин у дози која се безбедно примењује инхибира пролиферацију и радиосензитивну немикроцелуларну ћелијску културу. Метформин инхибира раст тумора и побољшава одговор тумора и проапоптотичне и антиангиогене ефекте јонизујућег зрачења [146]. Као здраву ћелијску културу Сторозук са сарадницима 2013. год. је, као и ми, употребио *MRC5* и добили су резултат да примена метформина на здравим фибробластима плућа, у дози од $1\ \mu\text{M}$ до $25\ \mu\text{M}$, не показује цитотоксични ефекат, чак има и благи пролиферативни ефекат.

Даље испитивање у правцу потврде утицаја метформина на инхибире *EGF* рецептор тирозин киназе (*EGF-TKI*) како на културама ћелија аденокарцинома плућа тако и *in vivo* на мишјем моделу спровео је Ли (*Li*) са сарадницима 2014. год. Потврдили су да метформин надвладава резистенцију над *PC-9GR* (*PC* ћелијска линија високо резистентан на гефитиниб) и *H1650-M3* (*H1650* ћелијска линија високо резистентна на ерлотиниб). У испитивању је коришћен метформин од $5\ \text{mM}$, а читавање *MTT* тестом ћелијска пролиферација је мерена након 48 сати. Утицај на апоптозу је потврђен проточном цитометријом [147].

2-DG је структурни аналог глукози, који се разликује од глукозе само одсуством једног атома кисеоника на положају *C2* (хидроксидна група је замењена водоником). Због поменуте супституције гликолиза је блокирана након интрацелуларне фосфорилације *2-DG* хексокиназом, што доводи до осиромашења *ATP* и активације *АМП*-активирани протеин киназе (*AMPK*) [88, 148, 149]. Ефекат *2-DG* појачан је код хипоксије, што је уобичајена појава у глиобласту [150]. Даље, *2-DG* индукује неуронску посвећеност ћелија тумора [151], инхибира *HIF-1 α* [152] као и *N*-везану гликозилацију [86, 153] и сензибилизира ћелије тумора за зрачење и хемотерапију [154]. Интересовање за 2-деокси-*D*-глукозе (*2DG*), метаболита глукозе почело је још педесетих година прошлог века и даље је веома актуелно. Прва документација о примени *2DG* у хуманом третману је забележена 1958. године код пет пацијената оболелих од различитих типова малигнитета (акутне мијелоидне леукемије, акутне и хроничне лимфоцитне леукемије, карцинома плућа) [148]. *2DG* је био апликован интравенски и орално у дозама које се крећу од 50 до 200 mg/kg. Ландау (*Landau*) са сар. 1958. је описао да су пацијенти добро подносили третман са спорадичним епизодама поспаности, црвенила лица и хиперхидрозом, која су брзо пролазила након третмана инфузијом глукозе.

Прво испитивање дејства 2-деокси-*D*-глукозе на ћелијским културама урадили су Брбан (*Brban*) и Шулц (*Schulze*), 1961. год. У свом испитивању показали су да *2DG* спречава раст ћелијских култура инхибирањем метаболизма и коришћења глукозе у ћелијама.

лији, на ћелијској култури карцинома цервикса (*HeLa*) као и ћелијској култури црева из здравог ембриона. Открили су да еквимолекуларне количине глукозе и 2-деокси-*D*-глукозе инхибирају раст тестираних хуманих ћелијских линија [155]. Смањена производња млечне киселине због недовољног искориштења глукозе и смањеног стварања интрацелуларног *ATP*-а, као разлог цитотоксичног ефекта 2-деокси-*D*-глукозе, потврдили су у свом испитивању и Kang и Hwang, 2006. [156]. Цитотоксичан ефекат који је настао је био реверзибилан те, чим је *2DG* уклоњен из медијума, наставила се ћелијска пролиферација. Ипак када су ћелијске културе третиране *2DG*-ом дуже од 72 сата драстично се повећао цитотоксични ефекат, који је у овом случају био иреверзибилан. Даље су утврдили да уколико се глукоза замени фруктозом, ћелијске културе су биле осетљивије на деловање *2DG*-ом [156].

До сада је потврђено да 2-деокси-*D*-глукоза инхибира раст малигних ћелија у различитим врстама тумора *in vitro*, и то карцином дојке [157-159], карцином простате [160], карцином дебелог црева [161], панкреаса [162] као и карцинома јајника, глиобластома, карцинома врата и главе, и хепатоцелуларног карцинома [157, 163].

У клиничким студијама које су спроведене у последњих десетак година потврђена је безбедност примене *2DG*-а код људи. Раез (*Raez*) са сарадницима 2013., као и Двараканати (*Dwarakanathy*) са сарадницима 2009., потврдио је да је у клиничким студијама за хуману употребу, *2DG* крајње безбедна. Раез са сарадницима је потврдио цитотоксичан ефекат применом 63 mg/kg *2DG*-а, свакодневно, сваке друге недеље, док је доцетаксел примењиван у дози од 30 mg/m² интравенски, сваке 3-4 недеље [164]. Двараканати са сарадницима 2009. је потврдио позитиван синергистичан цитотоксичан утицај *2DG* са зрачењем на ћелије глиобластома. *2DG* је примењена у дози 250-300 mg/kg *TT*, а зрачење у дози од 5 Gy [154]. Џанг са сарадницима 2006. [89] потврдио је утицај *2DG* на ћелијске културе колоректалног карцинома колона: *HCT116* и *LoVo*. Антипролиферативно дејство *2DG*-а је потврђено *CCK-8* тестом, где је *2DG* апликована у дозама: 2,5 mM; 5 mM; 10 mM; 20 mM и 40 mM а читавање је вршено након 24, 48 и 72 сата. Као адјувант се користио инсулин, који је драстично појачавао антипролиферативни ефекат *2DG*-а. У испитивање које је Џанг са сарадницима 2006. спровео користио је другу ћелијску културу карцинома дебелог црева као и далеко веће дозе од *2DG* у односу на наше (0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM; 3 mM и 5 mM) као што смо описали у поглављу 4.2.3. Он је потврдио антипролиферативне ефекте на ћелијским културама карцинома оваријума *SKOV3*, *IGROV1*, *IGROV1-R10*, на ћелијским линијама карцинома главе и врата *SCC61*, *SQ2OB*, *SCC12B2*, на ћелијским линијама глиобластома *U251*, *GL15* хепатоцелуларној ћелијској линији *HepG2* и ћелијској култури карцинома дебелог црева *HT29D4*. Утицај *2DG* у дози од 5 mM на ћелијским културама одређиван је након 2, 4 и 7 дана [163]. На ћелијској култури, *MSTO211H*, антипролиферативно дејство показало се видљиво након два дана излагања дози од 5 mM, за разлику од ћелијских култура *HepG2* и *HT29D4* на којима је забележен само пролазни цитотоксични ефекат и ћелијске културе су се у потпуности опоравиле након четири дана.

Ћелијске културе карцинома колона (*HCT116*, *LoVo*) самостално као и заједно са инсулином, испитивао је Џанг са сарадницима 2016. Поменуте ћелијске културе су третирали *2DG*-ом у дози од 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM и 40 mM, и инсулином у до-

зама од $0.2 \mu U/ml$, $2 \mu U/ml$, $20 \mu U/ml$, $200 \mu U/ml$, $2.000 \mu U/ml$ и $20.000 \mu U/ml$ [165]. Утицај на ћелијску пролиферацију је испитиван након 24, 48 и 72 сата. Цитотоксичан ефекат *2DG*-а је био и временски и дозно зависан, док је инсулин показао далеко слабији цитотоксични ефекат који се практично није повећавао са повећањем дозе. Најснажнији ефекат био је код комбиноване примене инсулина и *2DG*-а. Утицај на ћелијску пролиферацију је испитиван *ССК8* тестом. Такође је Џанг са сарадницима 2016. потврдио да *2DG* индукује апоптозу и заустављање ћелијског циклуса, али и да инхибира пролиферацију, миграцију и инвазију малигнућ ћелија. Пошто инсулин може стимулирати ћелијски унос хексозе, те на тај начин стимулирати и унос *2DG*, комбинована примена *2DG* и инсулина побољшала је цитотоксичност *2DG* и у међувремену надвладала учинке инсулина који потпомогу настанак карцинома [165]. Као закључак Џанг је са сарадницима 2016. истакао да се *2DG* може посматрати као потенцијално терапијско средство против колоректалног карцинома, посебно код оних пацијената са хиперинсулинемијом или којима је био добар егзогени инсулин. Мули (*Muley*) са сарадницима 2015. је показао на ћелијској култури карцинома колоне (*SW620*) да *2DG* индукује пролазну експресију *p21* и континуирану експресију *p53*. Третман је такође изазвао застој ћелијског циклуса у *G0/G1* фази и индуковао апоптозу кроз митохондријски пут. Ефекти *2DG* на нивое *p21* и *p53* протеина били су потпуно независни од његовог инхибиторног ефекта на нивое хексокиназе или *ATP* [166].

Синтупибулаки (*Sinthupibulyakit*) са сарадницима 2010. испитивао је утицај *2DG*-а на немикроцелуларним карцином плућа. У испитивању које су спровели је утврђено да *2DG* има снажно цитотоксично дејство путем инхибиције производње *ATP*-а на ћелијској култури карцинома плућа са дефицитом *p53* (*H358*) али не толико на оним ћелијским културама где је присутан *p53* (*A549*) [167]. Ћелијске културе карцинома плућа су третиране са *2DG*-ом у концентрацији од 20 mM , а цитотоксичан ефекат читаван је након: 3, 6, 12, 24 и 48 сати. За разлику од *A549* ћелија, *H358* ћелије карцинома плућа нису у стању да компензују своју потребу за енергијом преко оксидативне фосфорилације (*OXPPOS*) када је гликолиза инхибирана, у присуству *p53*, повећани *ROS* из *OXPPOS*-а повећава експресију *p53* циљних гена за које се зна да модулирају метаболизам, укључујући синтезу цитохром *c* оксидазе 2 (*CCO2*) и регулатора гликолизе и апоптозе индуковане са *TP53* (*TIGAR*) [167]. Управо је Хеј (*Hay*) 2016. навео да потенцијално ограничење репрограмираниог метаболизма глукозе за индивидуални приступ циљаној терапији за лечење карцинома јесте постојање више различитих изоформи гликолитичких ензима и чињеницу да инхибитори малих молекула не могу разликовати доминантну изоформу коју експримирају малигне ћелије у односу на оне које експримирају нормалне ћелије. Такође вероватно је да ће у многим случајевима у којима је гликолиза инхибирана, ћелије одговорити повећањем *OXPPO* [168].

У нашем испитивању је коришћена далеко мања концентрација *2DG*-а тако да је и очекивано добијен и далеко слабији ефекат. Иако се ради о истој ћелијској култури *A549*, не можемо у потпуности упоредити резултате јер је коришћена друга методологија, те је Синтупибукалит (*Sinthupibulyakit*) са сарад. 2010, више истраживао преузимање глукозе, и посредно мерио цитотоксични ефекат одређивањем реактивних кисеоничних врста, него директним одређивањем цитотоксичности путем *SRB* есеја као што смо ми радили у нашем експерименту.

Комбиновану примену метформина и *2DG*-а, испитивао је и Џу (*Zhu*) са сарадницима 2016. У свом испитивању су ћелијске културе карцинома јајника *SKOV3* и *Hey* третирали метформином и *2DG*-ом у дози од по 10 *mM*. *Hey* ћелијска линија је карциномом јајника изведена из људског ксенографта карцинома јајника (*HX-62*) првобитно узгајаног из перитонеалног депозита пацијента са умерено диференцираном папиларном цистом аденокарцинома јајника. Потврдили су да метформин у комбинацији са *2DG* инхибира раст, миграцију, инвазију и индукован застој ћелијског циклуса. Метформин и *2DG* могу ефикасно да индукују апоптозу у ћелијама рака јајника, што је постигнуто активирањем *p38 MAPK* и *JNK* путева [169]. Веома слично испитивање цитотоксичности на ћелијским културама карцинома простате је урадио Бен Сахра (*Ben Sahra*) са сарадницима 2010. године. Испитивање је обухватило и здраве епителне ћелије простате, као и појединачну употребу метформина и *2DG*-а. Потврђено је да је додавање метформина 2-деокси-*D*-глукози (*2DG*) инхибирало је митохондријално дисање и гликолизу у ћелијама карцинома простате, што је довело до озбиљног осиромашења *ATP*-а. Комбинација ова два лека била је драстично токсичнија за малигне ћелије од третмана само метформином или *2DG*, што је довело до 96% инхибиције ћелијске пролиферације код *LNCaP* ћелија карцинома простате. Насупрот томе, уочен је умерен утицај на виталност ћелија код нормалних епителних ћелија простате [170].

Ху (*Hou*) са сарадницима 2016. испитивао је комбиновано дејство метформина и *2DG*-а на ћелијској култури аденокарцинома плућа. Показали су да је IC_{25} код комбиноване примене *Met* и *2DG* била нижа него у поређењу са појединачним агенсима на ћелијској линији, *A549*. Потврдили су да је повећана токсичност повезана са повећаном липидном пероксидацијом и смањеним нивоом глутатиона, као и смањењем активности супероксидне дисмутазе и каталазе. Комбинација *Met* и *2DG* такође је показала појачано оштећење *DNK*, формирање *DNK* адукта, повишење нивоа интрацелуларне реактивне врсте кисеоника (*ROS*) и промену потенцијала митохондријске мембране, као и повећану апоптозу, активност каспазе-3, *p38* и *AMP* нивоа протеинске киназе (*AMPK*). Такође је показано да је инхибиција каспазе-3 и *p38* киназе делимично (75-87%) обрнула *Met* и *2DG* индуковану ћелијску смрт, без утицаја на нивое *ROS*-а. С друге стране, претретман ћелија са *N*-ацетил цистеином (*NAC*) је преокренуо *Met* и *2DG* индуковану ћелијску смрт у преко 90% [171]. Како је потврдио Ху (*Hou*) са сарадницима 2016. године, резултати ове студије су показали да комбинована примена *Met* и *2DG* показује бољу цитотоксичност од појединачних једињења а ћелијска смрт је посредована *ROS*, *p38* и каспаза-3 сигналним путевима.

У нашем експерименту је такође евидентиран далеко снажнији цитотоксични ефекат код комбиноване примене метформина са *2DG*-ом на ћелијској култури аденокарцинома плућа него код појединачне примене (поглавље 4.5.2). Тако је добијена IC_{50} код комбиноване примене метформина и *2DG*-а на ћелијској култури *A549* након 24 сата је 0,0006 *mM*, наспрам IC_{50} од 14,79 *mM* после самосталне апликације метформина или IC_{50} 4,97 *mM* код самосталне примене *2DG*-а. С друге стране, временском инкубацијом након 48 сати и самосталном апликацијом метформина IC_{50} је 3,3 *mM* и *2DG*-а је IC_{50} је 5,44 *mM*, док је IC_{50} је 19,24 *mM*. Овакав ефекат код комбиноване примене можемо донекле објаснити реверзибилним ефектом *2DG*-а, који су описали Канг (*Kang*)

и Хванг (*Hwang*), 2006., и који су истакли да се иреверзибилност постиже након временске инкубације од 72 сата [156]. Поредећи наш резултат са резултатом који је описао Ху са сарадницима 2016., можемо рећи да се у потпуности поклапа, те је IC_{25} код комбиноване примене *Met* и *2DG* била нижа него у поређењу са појединачним агенсима на ћелијској линији.

Комбиновану примену метформина са *2DG*-ом на ћелијској култури карцинома колона нисам нашла међу доступним подацима из литературе, те резултате студије немамо са чим да упоредимо. Ефекат да се код комбиноване примене метформина и *2DG*-а IC_{50} драстично смањује, како је описано на ћелијској култури карцинома плућа и овде је потврђен. IC_{50} након самосталне примене метформина и временске инкубације од 24 h је 26,53 mM док је IC_{50} након самосталне апликације *2DG*-а 3,4 mM. С друге стране код комбиноване примене метформина и *2DG*-а је IC_{50} драстично се смањује на 0,0006 mM. Даљом временском инкубацијом инхибиторна концентрација се смањује код индивидуалне примене метформина (IC_{50}) 10,54 mM док је након 48-часовне инкубације са *2DG*-а IC_{50} 4,25 mM, што опет иде у прилог чињеници да је ефекат који се постиже са *2DG*-ом реверзибилан, и да је потребна дужа инкубација да би се постигла иреверзибилност. Код комбиноване примене метформина и *2DG*-а применом *CalcSyn*-ом не може се одредити IC_{50} , као што смо описали у поглављу 4.6.3.

Како смо већ описали у поглављу 1.5. и у неколико епидемиолошких и експерименталних студија показано је да кофеин може бити интересантан као антиканцерогени агенс због своје способности да супримира ћелијску пролиферацију и индукује апоптозу у више различитих карцинома, укључујући карцином једњака [172], дојке [173-174], панкреаса [175], карцинома дебелог црева [176-79], јетре [180], желуца [181], карцинома мозга [182], као и у неколико ћелијских култура хумане леукемије [183], ћелијама глиома [184], саркома [185] и лимфома [186] и на ћелијској култури карцинома цервикса [187-189]. Различити механизми су укључени и постизање цитотоксичног ефекта, укључујући фосфатазу и тензин хомолог (*PTEN*), *PI3K/Akt*, *p53* и и *mTOR*-а [172-184]. Беслер (*Bessler*) са сарадницима 2012. испитивао је антитуморску активност кофеина на две ћелијске културе карцинома колона *HT-29* и *RKO*. Аутори су приметили да кофеин инхибира секрецију проинфламаторних цитокина *TNF* и *IFN* помоћу мононуклеарних ћелија периферне крви (*RBMS*) стимулираних за производњу цитокина преко директног контакта са ћелијама рака. Утицај на производњу цитокина је евидентиран у присуству и у одсуству кофеина, на обе ћелијске културе карцинома колона. Инхибиција *TNF*-а и *IFN*-а зависна је од концентрације *RBMS* и уочена је тек након њихове стимулације ћелијама рака. Смањење продукције антиинфламаторних цитокина *IL-1* и *IL-10* забележено је дејством кофеина и вишим концентрацијама [176]. Саито (*Saito*) са сарадницима је још 2002. године потврдио синергистички ефекат кофеина са аденовирусом посредованог преноса *PTEN* (*Ad-PTEN*) који индукује апоптозу на свим ћелијским културама карцинома дебелог црева као и карцинома простате, али не у нормалним ћелијама колоректалних фибробласта. У испитивању су коришћене ћелијске линије карцинома колона *SW480* и *DLD-1*, као и ћелијске линије карцинома простате *DUI45* и *LNCaP* и здрави фибробласти колона *CCD-18Co*. Овај синергистички ефекат је индукован укидањем *G2/M* фазе ћелијског циклуса, и смањеном експресијом

Акт пута и модулацијом *p44/42 MAPK* пута. Кофеином су ћелије третиране у дози од 2 *mM* и инкубиране 72 сата, након чега је вршено читавање [177].

Шмит (*Schmit*) са сарадницима 2016. је потврдио обрнуту сразмеру између конзумирања кафе и ризика од настанка колоректалног карцинома [178]. Испитивана је повезаност између потрошње кафе и ризика од колоректалног карцинома на 5.145 случајева док је контролно испитивање спроведено на 4.097 контролних случајева. У испитивању је утврђено да је за 26% мањи ризик од настанка колоректалног карцинома у испитиваној групи у односу на контролну групу. Приликом испитивања у обзир је узета врста кафе, локализација карцинома (дебело црево или ректум) и етничка подгрупа (Јевреји Ашкенази, Јевреји Сефарди и Арапи). Утицај кофеина на ћелијску културу колоректалног карцинома је испитивао и Низарка (*Nizarca*) са сарадницима 2014. године. Ћелијске културе *Colo205* су најпре третиране са паклитакселом и инкубиране 48 сати да би потом биле третиране кофеином у дозама од 0 до 20 μM , 2 сата. Закључак овог испитивања је био да се истовременом применом паклитаксела и кофеина смањује хемотерапијски одговор код пацијената са колоректалним карциномом [179].

Како смо описали у поглављима 4.1.3. и 4.6.3. кофеин драстично појачава цитотоксични ефекат метформина, тако да је минимална инхибиторна концентрација при којој је 50% ћелија вијабилно, IC_{50} око 100 пута мања при комбинованој примени у односу на индивидуалну примену. Истовремено је потврђена вишеструка отпорност здравих фибробласта плућа код комбиноване примене у односу на појединачну примену метформина и кофеина, како смо описали у поглављу 4.6.3, где је IC_{50} за здраве фибробласте плућа вишеструко повећана у односу на IC_{50} код појединачне примене метформина и кофеина или пак метформина и нитроглицерина, као што је описано у поглављима 4.1.4 и 4.8.4. Лију (*Liu*) је са сарадницима 2017. потврдио да кофеин индукује апоптозу на ћелијској култури карцинома желуца, активирајући сигнални пут каспазе-9/ каспазе -3 [181].

Још крајем седамдесетих година прошлог века, Толмач (*Tolmach*) са сарадницима 1977. год. први је испитивао утицај кофеина на *HeLa* ћелијску културу, као и његов утицај након зрачења од 220 *kV X*-зрацима [187]. У испитивању при дози кофеина од 1 *mM* утврђено да се успорава ћелијска пролиферација за 1,5 сат, али без икаквог већег учинка на инхибицију ћелијског циклуса. Даље је примењена иста доза кофеина на *HeLa* ћелијску културу која је претходно зрачена са 220 *kV X*-зрацима, и утврђено је да кофеин доводи до инхибиције синтезе *DNK*-а, и заустављање у G_2 фази ћелијског циклуса, која би иначе настала као последица зрачења саме ћелије [187]. Толмач са сарадницима 1977. год. је закључио да кофеин ипак има свој утицај на ћелијску пролиферацију јер уколико је кофеин присутан на почетку зрачења и то у првих 6 сати, а након тога се уклони из система, утврђено је да долази до брзе инхибиције синтезе *DNK*-а. Аливаини (*Aliwaini*) са сарадницима 2017. испитивао је дејство кофеина самостално али и у комбинацији са цисплатином на ћелијској култури карцинома цервикса. *HeLa* ћелијска култура је третирана кофеином у дозама од 0 *mM* до 10 *mM*, док се цисплатином деловало са дозама од 0 μM до 15 μM , и периодом инкубације од 48 сати. За испитивање цитотоксичног ефекта на ћелијским културама коришћен је *MTT* тест. Добијена код само-

сталне примене IC_{50} за кофеин је $7,18 \text{ mM}$, а за цисплатин је $8,93 \mu\text{M}$, док се IC_{50} драстично смањује код комбиноване примене, те дејством кофеином од 1 mM и временском инкубацијом од 48 сати IC_{50} је $6,24 \mu\text{M}$, а дејством кофеином од 2 mM IC_{50} пада на $2,75 \mu\text{M}$ [188]. Уколико упоредимо са нашим резултатима видећемо велику сличност, с тим да код индивидуалне апликације кофеина у нашој студији на *HeLa* ћелијску културу долази до пада у вредности IC_{50} са $2,44 \text{ mM}$ на $2,03 \text{ mM}$, након 24-часовног односно 48-часовног третмана. Далеко снажнији цитотоксични ефекат се види након истовремене примене са метформином, те IC_{50} пада са $7,46 \text{ mM}$, након 24-часовне инкубације *HeLa* ћелијске културе само са метформином, на $2,23 \text{ mM}$, након исте инкубације али са истовременом применом 1 mM кофеина и метформина у дозама од $0,05 \text{ mM}$, $0,1 \text{ mM}$, $0,25 \text{ mM}$, $0,5 \text{ mM}$ и 1 mM . Даљом инкубацијом уочава се пад у вредности IC_{50} са $2,55 \text{ mM}$, колико је након самосталног третмана метформином, на $IC_{50} 2,4 \text{ mM}$ након истовремене примене метформина (у претходно наведеним дозама) и кофеина у дози од 1 mM .

Испитивање утицаја кофеина на *HeLa* ћелијску културу као и на *MCF7*, *OVGI* малигним ћелијским културама карцинома дојке и јајника као и на здравим ћелијама: *GM2149*, *GM4626*, *AG1522* вршио је Џа (*Jha*) са сарадницима 2002. год. У истраживању је испитивано излагање гама зрацима, при различитим концентрацијама кофеина. Индуковане гама зрацима *G2* фазе је елиминисана дејством кофеина у малигним ћелијским линијама. Насупрот томе кофеин није елиминисао или значајно смањио одлагање *G2* индуковане фазе у било којој здравој ћелијској линији [189]. У нашем испитивању је коришћена ћелијска култура нормалних фибробласта плућа. Резултати које смо добили су у складу са описаним резултатима *Jha* са сарадницима 2002. год. Самосталним дејством кофеина и метформина на *MRC5* добијена IC_{50} је далеко мања чак него након истовремене примене кофеина и метформина, те са $IC_{50} 33,46 \text{ mM}$ и $IC_{50} 32,09 \text{ mM}$, које су минималне инхибиторне концентрације након 24 сата односно након 48 сати након дејства само метформином, вредност IC_{50} се пење на 1.596 mM (након 24 сата), односно $IC_{50} 1.956 \text{ mM}$ (након 48 сати) истовременим дејством метформина и кофеина. Када обратимо пажњу на вредности, види се пораст у броју ћелија истовременим дејством метформина и кофеина, те се намеће претпоставка да ли можда ова комбинација делује на неки начин и протективно. Такође чињеница да је при комбинованој примени кофеина и метформина, практично направљена селекција између здравих ћелија и малигних ћелија, указује на то да би у будућности требало испитати ову претпоставку на неким другим здравим ћелијским културама.

Постоје бројне студије које сведоче о значајном цитотоксичном утицају кофеина на ћелијске линије аденокарцинома плућа. У већини је испитиван утицај кофеина као адјуванта уз друге хемотерапеутике или пак уз јонизујуће зрачење. Осаки *Ohaki* са сарадницима је још 1990. год. потврдио цитотоксични ефекат кофеина на ћелијској линији аденокарцинома плућа *PC9/R*, али није евидентирао значајнији ефекат код комбиноване примене са цисплатином [190]. Ћи (*Qi*) са сарадницима 2002, год. испитао на ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа утицај различитих концентрација кофеина, од $0,5 \text{ mM}$ до 5 mM , на ћелијски циклус и апоптозу [191]. Открили су да концентрација кофеина од $0,5 \text{ mM}$ може прекинути застој *G2* фазе који нормално настаје након излагања јонизујућем зрачењу. Насупрот томе при концентрацији од 5 mM , кофеин не само

да индукује апоптозу него делује синергистички са примењеним зрачењем. Како је Ћи са сарадницима 2002. навео, ефекат кофеина на контролне тачке ћелијског циклуса и апоптозу зависи од дозе а да дејство остварује делујући на регулаторни механизам активности циклин-зависне киназе. Ванг (*Wang*) са сарадницима 2015. год. је наставио даље испитивање комбиноване примене цисплатина и кофеина, као и ефекат кофеина на апоптозу ћелијских култура карцинома плућа изазвану цисплатином. У испитивању су коришћене *HTB182* сквамозне ћелије карцинома плућа и *CRL598* ћелије аденокарцинома плућа, а кофеин у дози од 2 mM и цисплатин у дози од 10 μ M, а време инкубације је било од 24, 48, 72 и 96 сати. Добијени резултати показују да присуство кофеина потенцира апоптозу инхибицијом *ATP*, али изазивајући *ATM* активацију, што резултира повећањем експресије *PUMA* протеина [192]. *PUMA* протеин је модулатор апоптозе који је под утицајем *p53* тумор-супресорског гена.

Испитивањем цитотоксичности кофеина на ћелијској култури аденокарцинома плућа *A549*, добијени су резултати који су у складу и са описаним резултатима Ћија и сарадника 2002, као и са резултатима Ванга (*Wang*) и сарадника 2015. год. Дејством кофеина на ћелијској култури *A549* након 24-часовног третмана добијена IC_{50} је 3,38 mM, док већ инкубацијом још за 24 часа IC_{50} пада на 2,44 mM, како је описано и поглављима 4.1.2, 4.3.2. Драстично смањење минималне инхибиторне концентрације IC_{50} при истовременој примени метформина и кофеина, евидентирано је и добијена IC_{50} је 0,0002 mM након инкубације од 24 сата. У нашем експерименту ћелијска култура аденокарцинома плућа *A549* је третирана 1 mM кофеином а метформином у дозама од 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM и 1 mM (као што је описано у поглављу 4.6.2). Даљом временском инкубацијом и читавањем након 48 сати, евидентиран је пад у броју преживелих ћелија аденокарцинома плућа, али програмом *CalcuSyn* није одређена IC_{50} (Графикон 60).

Нитроглицерин као што смо већ навели у уводу показује двојни ефекат на малигним ћелијама, у зависности од примењене концентрације, проканцерогене и цитотоксичне, у зависности од концентрације, микроокружења и типа ћелије. Посебно, ниске концентрације *NO* (< 100 nM) повезане су са повећањем ангиогенезе, пролиферације и резистенције на апоптозу, док су високе концентрације *NO* (> 500 nM) повезане са повећаном цитотоксичношћу и апоптозом [92, 93, 102, 103]. Као што је познато, *NO*, азотни оксид је сигнални молекул који је укључен у велики број физиолошких процеса као што су: вазодилатација, релаксација глатких мишића, неуротрансмисија, агрегација тромбоцита и имуноодговор организма. Међутим, тачан механизам његовог дејства и даље није познат. Зна се да физиолошки ефекат *NO* зависи од његове концентрације у циљаном ткиву као и од дужине његовог дејства. *NO* има веома значајну улогу у кардиоваскуларном систему где учествује у одржавању хомеостазе, укључујући вазодилатацију и инхибицију агрегације тромбоцита. У централном нервном систему игра кључну улогу у процесу учења и памћења, и ту може бити присутан у наномолским концентрацијама. У периферном нервном систему делује као неуротрансмитер. У микромолским концентрацијама може бити присутан у макрофагима и у другим ћелијама имунолошког система, као део одбрамбеног система, испољавајући цитотоксичан ефекат формирањем реактивних азотних врста *RNS* [193, 194]. Худахари (*Choudhari*) са са-

радницима 2013. наводи да је *NO* повезан са проканцерогеним процесима ангиогенезе, апоптозе, ћелијског циклуса, процеса инвазије и метастазирања, док са друге стране показује антиканцерску активност путем супресије ћелијског дисања, изменом метаболизма гвожђа, супресијом синтезе *DNK*, активацијом проапоптотичких протеаза породице каспаза, повећаном експресијом *p53* [92]. Ендогени *NO* поспешује проток крви кроз дилатацију крвних судова. Смањује леукоцитне ендотелне адхезивне интеракције и повећава васкуларну пермеабилност [195]. Истраживања су показала да *VEGF* ослобођен као прочишћени протеин или произведен од туморских ћелија захтева функционални пут *NO/cGMP* у крајњем делу да би се подстакао не васкуларни раст. Други механизам којим *NO* поспешује ангиогенезу је активација *COX-2* која стимулише производњу проангиогених фактора и простагландина. *NO* такође има стимулативни ефекат инвазије који је посредован појачаном регулацијом *MMP-2* и *MMP-9* (матричне металопротеиназе) и смањењем *TIMP-2* и могуће *TIMP-3* (инхибитори ткива *MMP*) [196]. Истраживања су показала да *NO* ограничава пролиферацију леукоцитних ћелија што има негативне последице на антитуморски одговор домаћина [197].

До сада је утицај азотног оксида као и његових активних метаболита потврђен на више различитих малигних ћелијских култура *in vitro*, и то на ћелијским културама карцинома дојке, главе и врата, цервикса, простате, желуца, дебелог црева и карциному плућа [193]. За разлику од тако опсежних и детаљних испитивања *NO*, нитроглицерин је далеко мање био у фокусу истраживача. До сада је *in vitro* испитивање нитроглицерина обухватило ћелијске културе карцинома дојке [198], простате [199, 200], карцинома дебелог црева [201, 202] као и карцинома коже [198]. Испитивање дејства нитроглицерина на ћелијским културама карцинома плућа није евидентирано, али је урађено клиничко испитивање комбиноване примене нитроглицерина са бевацизумабом и карбоплатином и палитакселом [203].

Испитивањем цитотоксичности нитроглицерина на ћелијској култури аденокарцинома плућа *A549*, добијени су резултати који су у складу и са описаним резултатима Дицменса (*Dingemans*) и сарадника 2002. Дејством нитроглицерина на ћелијској култури *A549* након 24-часовног и 48-часовног третмана IC_{50} није могла да се одреди, како је описано и поглављима 4.4.2. Третмани код комбиноване примене нитроглицерина и кофеина, као и нитроглицерина и 2-деокси-*D*-глукозе евидентирају снажнији ефекат, са мањим процентом преживелих ћелија аденокарцинома плућа. При 24-часовном третману код комбиноване примене нитроглицерина и кофеина одређена је и минималне инхибиторне концентрације IC_{50} добијена IC_{50} је $0,0025 \text{ mM}$. У нашем експерименту ћелијска култура аденокарцинома плућа *A549* је третирана 1 mM кофеином а нитроглицерином у дозама од $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ (Графикон 86). Даљом временском инкубацијом и читавањем након 48 сати, евидентиран је пад у броју преживелих ћелија аденокарцинома плућа, али програмом *CalcuSyn* није одређена IC_{50} (Графикон 88).

На ћелијским културама карцинома колоне, Миле (*Millet*) са сарадницима 2002, испитивао је утицај нитроглицерина на апоптозу. У испитивању су коришћене *SW480*, *SW620* и *HCT-116* ћелијске културе карцинома колоне, за испитивање апоптозе коришћена је *TUNEL* анализа, нитроглицерин је апликован у дозама од $250 \mu\text{mol/L}$ и 500

$\mu\text{mol/L}$, а читавање је извршено након 24 и 48 сати [201]. TUNEL (Терминална деоксинуклеотидул трансфераза (*TdT*) *dUTP* *Nic-End Labeling*) анализа се базира на чињеници да се, приликом апоптозе, молекула *DNK* сече на мање дволанчане олигонуклеотидне фрагменте величине 180–200 базних парова. Миле са сарадницима 2002. потврдио је да нитроглицерин индукује апоптозу ћелија карцинома дебелог црева зависно од дозе и од времена. У овај процес укључене су и митохондрије и каспазе, углавном каспаза-1 и каспаза-10. Рецептори задужени за ћелијску смрт нису укључени у нитроглицерином посредовану смрт ћелије, док нитроглицерин сензитивише туморске ћелије на *Fas-ligand* и на тај начин индукувану апоптозу [201]. У нашем испитивању дејство нитроглицерина на ћелијској култури карцинома колоне, показало је и дозну и временску зависност, те се резултати подударају са резултатима Миле са сарадницима 2002. Најснажнији цитотоксичан ефекат, третманом нитроглицерина на ћелијској култури карцинома колоне забележен је деловањем дозом од $10 \mu\text{M}$ те се добијени резултати у потпуности слажу и са закључком који је Котиер (*Cortier*) са сарадницима добио [202]. У експерименту који су спровели потврдили су да додатком супстанце *H89* (инхибитором протеин киназе) микромолским концентрацијама нитроглицерина ($10\text{--}200 \mu\text{M}$) долази до убрзане апоптозе ћелијских култура карцинома колоне (*SW480*, *CT26*, *C51*, *T47D*). Интересантно је истаћи да је *Cortier* доказао да синергистички цитотоксичан ефекат супстанце *H89* не зависи од инхибиције протеин киназе већ индукује производњу реактивних кисеоничних врста (*ROS*) који у комбинацији са *NO*, активирају пут *cGMP/PKG* и индукује ћелијску смрт зависну од каспазе [202].

Студија коју је спровео Леон Болоте (*Leon-Bollotte*) са сарадницима 2011. потврђује два извора настанка *NO*. Егзогено ослобођен из нитроглицерина или ендогено произведен активацијом *NOS II*. *S* нитрозилује апоптотични рецептор *Fas* на два цистеинска остатка у цитоплазматском ретикулуму. Посттранслацијска модификација рецепторских протеина је свеprisутна карактеристика преноса сигнала. У испитивању Леон Болоте са сарадницима 2011. на хуманој ћелијској култури колоне *SW480* и на *C51* ћелијској култури карцинома колоне миша, инкубирао је ћелије 18, 24 и 48 часова нитроглицерином у дози од $500 \mu\text{mol/L}$ са / или без липидним А-донором [204]. Снажан одговор који су добили, у малом броју преживелих ћелија карцинома колоне, пропорционалан је и примењеној дози нитроглицерина.

Резултати нашег испитивања на свим ћелијским културама, карциному цервикса, карциному дебелог црева, као и аденокарциному плућа, код комбиноване примене нитроглицерина и кофеина потврђују далеко снажнији ефекат након примене микромолских концентрација нитроглицерина у односу на наномолске. Најснажнији ефекат је забележен комбинованом применом милимолске дозе кофеина и микромолске дозе нитроглицерина на ћелијској култури аденокарцинома плућа (*A549*).

6. ЗАКЉУЧАК

У складу са постављеним циљевима ове докторске тезе, а на основу добијених резултата, могу се извести следећи закључци:

- Метформин испољава антитуморско дејство на ћелијским културама аденокарцинома плућа (*A549*), колоректалног карцинома (*HT29*) и аденокарцинома цервикса (*HeLa*).
- 2-деокси-*D*-глукоза и кофеин индивидуално показују антитуморско дејство на ћелијским културама карцинома цервикса, колона и аденокрациному плућа.
- Кофеин потенцира антитуморско дејство метформина и нитроглицерина.
- Комбинована примена метформина и кофеина има снажан цитотоксични ефекат на ћелијској култури аденокарцинома плућа, и пролиферативни ефекат на здравим фибробластима плућа. Након опсежних истраживања постоји могућност коришћења комбинације кофеина и метформина за карцином плућа.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Willis RA. The Spread of tumors in the human body. London: Butterworth & Co; 1952.
2. Kumar V, Abbas AK, Aster J. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9th ed. New York: Elsevier; 2014.
3. Cooper GM. Elements of human cancer. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 1992. p. 16.
4. Rohan TE, Xue X, Lin HM, D'Alfonso TM, Ginter PS, Oktay MH, et al. Tumor microenvironment of metastasis and risk of distant metastasis of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016;106(8):136.
5. Bommer U, Vine KL & Cancer Council Australia O. Cancer biology: molecular and genetic basis. In Sabesan S. Olver I & Cancer Council Australia O (Eds.), *Clinical Oncology for Medical Students* (p. On Line). Sydney: Cancer Council Australia Oncology Education Committee. 2014.
6. Pignatelli J, Bravo-Cordero JJ, Roh-Johnson M, Gandhi SJ, Wang Y, Chen X, et al. Macrophage-dependent tumor cell transendothelial migration is mediated by Notch1/MenaINV-initiated invadopodium formation. *Sci Rep.* 2016;6:37874.
7. Cancer Council [homepage on the Internet]. Citation: Alison MR 2001. *Encyclopedia of Life Sciences* [updated 2019 Mar 23; cited 2018 Jun 25]. Available from: https://wiki.cancer.org.au/oncologyformedicalstudents/Citation:Alison_MR_2001
8. Malarkey DE, Maronpot RR. Carcinogenesis. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. 2nd ed. New York: Elsevier; 2014. p. 445-66.
9. Weinberg RA. *The biology of cancer* 1st ed. New York: Garland Science, 2007.
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646–74.
11. COSMIC [homepage on the Internet]. Catalogue of somatic mutations in cancer. [updated 2019 May 23; cited 2018 Jun 26]. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
12. Tsuchida N, Murugan AK, Grieco M. Kirsten Ras* oncogene: significance of its discovery in human cancer research. *Oncotarget.* 2016;7(29):46717-33.
13. Boeckx N, Peeters M, Van Camp G, Pauwels P, Op de Beeck K, Deschoolmeester V. Prognostic and Predictive Value of RAS Gene Mutations in Colorectal Cancer: Moving Beyond KRAS Exon 2. *Drugs.* 2015;75(15):1739-56.
14. Guedes JG, Veiga I, Rocha P, et al. High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2013;13:169.

15. Meng D, Yuan M, Li X, Chen L, Yang J, Zhao X, Ma W, Xin J. Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer*. 2013;81(1):1-10.
16. Moura MM, Cavaco BM, Leite V. RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma. *EndocrRelat Cancer*. 2015;22(5):235-52.
17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*, 4th ed. New York: Garland Science/Taylor & Francis LLC; 2002.
18. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasse A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differ*. 2018; 25(1), 104–113.
19. ROCKLAND [homepage on the Internet]. p53 signaling pathway overview [updated 2019 May 15; cited 2019 Jun 14]. Available from: <https://rockland-inc.com/p53-pathway.aspx>
20. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7-30.
21. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
22. World Health Organization [homepage on the Internet]. Health statistics and information systems. WHO mortality database New York: WHO Press; 2014 [updated 2017 Aug 17; cited 2017 Sep 2]. Available from: who.int/healthinfo/mortality_data/en/.
23. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2014; 136(5):E359-86.
24. Svirčev Z, Drobac D, Tokodi N, Lužanin Z, Munjas AM, Nikolin B, et al. Epidemiology of cancers in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci Health C Environ CarcinogEcotoxicol Rev*. 2014;32(4):319-37.
25. World Health Organization. World global statistics 2013 [monograph on the Internet]. Switzerland: WHO Press; 2014 [cited 2017 Mar 9]. Available from: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf
26. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
27. Crawford S. Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. *Front Pharmacol*. 2013;4:68.
28. Incidencija imortaliteta od raka u Centralnoj Srbiji. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“; 2013.
29. Warburg O. The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*. 1925;9(1):148–163.
30. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):211-8.

31. Yu L, Lu M, Jia D, Ma J, Ben-Jacob E, Levine H, et al. Modeling the genetic regulation of cancer metabolism: interplay between glycolysis and oxidative phosphorylation. *Cancer Res.* 2017;77(7):1564-74.
32. Smith B, Schafer XL, Ambeskovic A, Spencer CM, Land H, Munger J. Addiction to coupling of the Warburg effect with glutamine catabolism in cancer cells. *Cell Rep.* 2016;17(3):821-36.
33. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol.* 2015;17(4):351-9.
34. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(8):935-46.
35. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012;21(3):297-308.
36. Shestov AA, Liu X, Ser Z, Cluntun AA, Hung YP, Huang L, Kim D, Le A, Yellen G, Albeck JG, Locasale JW. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife*, 2014;3, p.e03342.
37. Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, Thornton C. Mitochondria: hub of injury responses in the developing brain. *Lancet Neurol.* 2014;13(2):217–32.
39. Xie J, Wu H, Dai C, Pan Q, Ding Z, Hu D, et al. Beyond Warburg effect-dual metabolic nature of cancer cells. *Sci Rep.* 2014;4:4927-37.
40. Slavov N, Budnik BA, Schwab D, Airoidi EM, van Oudenaarden A. Constant growth rate can be supported by decreasing energy flux and increasing aerobic glycolysis. *Cell Rep.* 2014;7(3):705-14.
41. Faubert B, Boily G, Izreig S, Griss T, Samborska B, Dong Z, et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab.* 2013;17(1):113-24.
42. Zhu R, Zou ST, Wan JM, Li W, Li XL. BTG1 inhibits breast cancer cell growth through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* 2013;30(5):2137-44.
43. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, et al. Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy. *J Cell Physiol.* 2016;231(12):2570-81.
44. Wu H, Ying M, Hu X. Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget.* 2016;7(26):40621-9.
45. Li C, Zhang G, Zhao L, Ma Z, Chen H. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J Surg Oncol.* 2016;14(1):15.
46. Liko D, Hall MN. mTOR in health and in sickness. *J Mol Med.* 2015;93:1061-73.
47. Howell JJ, Ricoult SJ, Ben-Sahra I, Manning BD. A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(4):906-12.

48. Epstein T, Xu L, Gillies RJ, Gatenby RA. Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. *Cancer Metab.* 2014;2:7.
49. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, Wortman M, Yachyshin S, Chow LM, et al. Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl AcadSci U S A.* 2014;111(4):E435-44.
50. Shimizu T, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Beeram M, Rasco DW, Smith LS, et al. The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(8):2316-25.
51. Dai C, Sun F, Zhu C, Hu X. Tumor environmental factors glucose deprivation and lactic acidosis induce mitotic chromosomal instability-an implication in aneuploid human tumors. *PLoS One.* 2013;8:e63054.
52. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert OpinTher Targets.* 2012;16Suppl 2:S17-27.
53. McKenzie M. Mitochondrial DNA mutations and their effects on complex I biogenesis: implications for metabolic disease. In: St. John JC, editor. *Mitochondrial DNA, mitochondria, disease and stem cells.* Totowa: Humana Press; 2013. p. 25-47.
54. Villar VH, Nguyen TL, Delcroix V, Teres S, Bouche-careilh M, Salin B, et al. mTORC1 inhibition in cancer cells protects from glutaminolysis-mediated apoptosis during nutrient limitation. *Nat Commun.* 2017;8:14124.
55. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 2005;330(7503):1304-5.
56. Brodowska K, Theodoropoulou S, Meyer ZuHörste M, Paschalis EI, Takeuchi K, Scott G, et al. Effects of metformin on retinoblastoma growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2014;45(6):2311-24.
57. Yin M, Zhou J, Gorak EJ, Quddus F. Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist.* 2013;18(12):1248-55.
58. Gandini S, Puntoni M, Hecman-Stoddard BM, Dunn BK, Ford L, DeCensi A, et al. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res.* 2014;7(9):867-85.
59. Quinn BJ, Kitagawa H, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends EndocrinolMetab.* 2013;24(9):469-80.
60. Heckman-Stoddard BM, DeCensi A, Sahasrabudde VV, Ford LG. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. *Diabetologia.* 2017;60(9):1639-47.
61. Dowling RJ, Goodwin PJ, Stambolic V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Med.* 2011;9:33.

62. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:98–107.
63. Xie W, Du L. Diabetes is an inflammatory disease: Evidence from traditional Chinese medicines. *Diabetes ObesMetab.* 2011;13:289–301.
64. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM) *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;26:259–265.
65. Djiogue S, NwaboKamdje AH, Vecchio L, Kipanyula MJ, Farahna M, Aldebasi Y, SekeEtet PF. Insulin resistance and cancer: The role of insulin and IGFs. *EndocrRelat Cancer.* 2013; 20:R1–R17.
66. Gallagher EJ, LeRoith D. The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends EndocrinolMetab.* 2010;21:610–618.
67. Xue C, Wang C, Liu Q, Meng Q, Sun H, Huo X, et al. Targeting P-glycoprotein expression and cancer cell energy metabolism: combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of K562/Dox cells to doxorubicin. *Tumour Biol.* 2016;37(7):8587-97.
68. Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl AcadSci U S A.* 2014;111(29):10574-9.
69. Zi FM, He JS, Li Y, Wu C, Yang L, Yang Y, et al. Metformin displays anti-myeloma activity and synergistic effect with dexamethasone in in vitro and in vivo xenograft models. *Cancer Lett.* 2015;356(2 Pt B):443-53.
70. Sakoda LC. et al., Metformin use and lung cancer risk in patients with diabetes. *Cancer Prev. Res. (Phila.).*2015;8:174–79.
71. Kim EH, Kim MS, Cho CK, Jung WG, Jeong YK, Jeong JH. Low and high linear energy transfer radiation sensitization of HCC cells by metformin. *J Radiat Res.* 2014;55(3):432-42.
72. Babcook MA, Sramkoski RM, Fujioka H, Danershgari F, Almasan A, Shukla S, et al. Combination simvastatin and metformin induces G1-phase cell cycle arrest and Ripk1- and Ripk3-dependent necrosis in C4-2B osseous metastatic castration-resistant prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* 2014;5(11):e1536.
73. Chen G, Feng W, Zhang S, Bian K, Yang Y, Fang C, et al. Metformin inhibits gastric cancer via the inhibition of HIF1 α /PKM2 signaling. *Am J Cancer Res.* 2015;5(4):1423-34.
74. Karnevi E, Said K, Andersson R, Rosendahl AH. Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer.* 2013;13(10):235.
75. Zhang R, Zhang P, Wang H, Hou D, Li W, XiaoG, et al. Inhibitory effects of metformin at low concentration on epithelial–mesenchymal transition of CD44(+)/CD117(+) ovarian cancer stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:262.

76. Choi WY, Lim KI. Sensitization of metformin-cytotoxicity by dichloroacetate via reprogramming glucose metabolism in cancer cells. *Cancer Lett.* 2014;346(2):300-8.
77. Loubière C, Goiran T, Laurent K, Djabari Z, Tanti JF, Bost F. Metformin-induced energy deficiency leads to the inhibition of lipogenesis in prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(17):15652-61.
78. Bruno S, Ledda B, Tenca C, Ravera S, Orengo AM, Mazzarello AN, et al. Metformin inhibits cell cycle progression of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget.* 2015;6(26):22624-40.
79. Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J, Xu GM. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2008;14(47):7192-8.
80. Isakovic A, Harhaji L, Stevanovic D, Markovic Z, Sumarac-Dumanovic M, Starcevic V, et al. Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(10):1290–302.
81. Liu J, Li M, Song B, Jia C, Zhang L, Bai X, et al. Metformin inhibits renal cell carcinoma in vitro and in vivo xenograft. *UrolOncol.* 2013;31(2):264-70.
82. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature.* 2014;510(7506):542-6.
83. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia.* 2013;56(9):1898–906.
84. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, Wortman M, Yachyshin S, Chow LM, et al. Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl AcadSci U S A.* 2014;111(4):E435-44.
85. Brown KA, Samarajeewa NU, Simpson ER. Endocrine-related cancers and the role of AMPK. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;366(2):170-9.
86. Larrue C, Saland E, Vergez F, Serhan N, Delabesse E, Mansat-De Mass V. Antileukemic activity of 2-Deoxy-D-glucose through inhibition of N-linked glycosylation in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD or c-KIT mutations. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(10):2364-73.
87. Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett.* 2014;355(2):176-83.
88. Xi H, Barredo JC, Merchan JR, Lampidis TJ. Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKK β leading to autophagy. *BiochemPharmacol.* 2013;85(10):1463-77.
89. Zhang D, Fei Q, Li J, Zhang C, Sun Y, Zhu C, et al. 2-deoxyglucose reverses the promoting effect of insulin on colorectal cancer cells in vitro. *PLoS One.* 2016; 11(3):e0151115.
90. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 1996;24(2):131-9.

91. Chuang IC, Yang CM, Song TY, Yang NC, Hu ML. The anti-angiogenic action of 2-deoxyglucose involves attenuation of VEGFR2 signaling and MMP-2 expression in HUVECs. *Life Sci.* 2015;139:52-61
92. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J SurgOncol.* 2013;11(1):118-29.
93. Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP, Pantziarka P. Repurposing drugs in oncology (ReDO)-nitroglycerin as an anti-cancer agent. *Ecancermedalscience.* 2015;9:568-604.
94. Hałas M, Izdebska M, Klimaszewska-Wisniewska A, Gagat M, Radciniewska D, Glińska A, et al. Caffeine induces cytoskeletal changes and cell death in H1299 cells. *Open Life Sci.* 2014;9(8):727-38.
95. Mishra M, Panta R, Miyares M. Influence of coffee and its components on breast cancer: a review. *Asian Pac J Trop Dis.* 2016;6(10):827-31.
96. Li H, Jin SY, Son HJ, Seo JH, Jeong GB. Caffeine-induced endothelial cell death and the inhibition of angiogenesis. *Anat Cell Biol.* 2013;46(1):57-67.
97. Cao J, Han J, Xiao H, Qiao J, Han M. Effect of tea polyphenol compounds on anticancer drugs in terms of anti-tumor activity, toxicology, and pharmacokinetics. *Nutrients.* 2016;8(12):762-72.
98. Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP, Vikas P. The repurposing drugs in oncology (ReDO) Project. *Ecancermedalscience.* 2014;8:442.
99. Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB. Autophagy in cellular metabolism and cancer. *J Clin Invest.* 2015;125(1):47-54.
100. Morani F, Titone R, Pagano L, Galetto A, Alabiso O, Aimaretti G, et al. Autophagy and thyroid carcinogenesis: genetic and epigenetic links. *EndocrRelat Cancer.* 2013;21(1):13-29.
101. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2016;12(1):1-222
102. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis.* 2013;34(3):503-12.
103. Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *J Cancer Prev.* 2016;21(1):1-12.
104. Eini H, Frishman V, Yulzari R, Kachko L, Lewis EC, Chaimovitz C, et al. Caffeine promotes anti-tumor immune response during tumor initiation: involvement of the adenosine A2A receptor. *BiochemPharmacol.* 2015;98(1):110-8 .
105. Wang G, Bhoopalan V, Wang D, Wang L, Xu X. The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. *ExpHematolOncol.* 2015;4:5.
106. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001;21(1):A.3B.1-A.3B.2.

107. Bogdanović G, Raletić-Savić J, Marković N. In vitro assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay. *Arch Oncol*. 1994;2(4):181-4.
108. Wikipedia [homepage on the Internet]. Hemocytometer [updated 2019 May 15; cited 2019 Mar 11; cited 2019 Jun 14]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>
109. Shekan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(13):1107-12.
110. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112-6.
111. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.
112. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84(5):1415-20.
113. Robinson JP, Carter WO, Narayanan P. Functional assays by flow cytometry. *Immune Cell Phenotyping and Flow Cytometric Analysis*. 1993;26:245-55.
114. Engvall E, Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8:871-5.
115. Abcam [homepage on the Internet]. Assay kits, reagents and antibodies for your next discovery [updated 2019 Jan 21; cited 2019 Apr 11]. Available from: <https://www.abcam.com/>
116. Scannell JW, Blanckley A, Boldon H, Warrington B. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(3):191–200.
117. Pammolli F, Magazzini L, Riccaboni M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(6):428–38.
118. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol*. 2014;32(1):40–51.
119. Kaitin KI, DiMasi J. Pharmaceutical innovation in the 21st century: new drug approvals in the first decade, 2000–2009. *ClinPharmacol Therapeutics*. 2001;89(2):183–8.
120. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New Eng J Med*. 2012;366(10):883–92 .
121. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer*. 2013;108(3):479–85.
122. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(8):689–702.

123. U.S. National Library of Medicine [homepage on the Internet]. ClinicalTrials.gov: Metformin and cancer [updated 2019 Mar 12; cited 2018 Jun 7]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>
124. Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, Pollak MN. The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008;1:369–75
125. Xiao X, He Q, Lu C, Werle KD, Zhao RX, Chen J, et al. Metformin impairs the growth of Liver Kinase B1-intact cervical cancer cells. *GynecolOncol*. 2012;127(1):249-55.
126. Abd-Rabou AA, Mohame SH, Mwaheb MA, Sayed ON, Kishta MS. Metaformin-based regimen inhibits glucose uptake and G6PD activity: a de novo anti-cervical cancer strategy tackles HeLa and its derivative Hep2 cells. *J Pharm Toxicol*. 2017;12(2):76-86.
127. Hsieh Li SM, Liu ST, Chang YL, Ho CL, Huang SM. Metformin causes cancer cell death through downregulation of p53-dependent differentiated embryo chondrocyte 1. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):81.
128. Chae YK, Arya A, Malecek MK, Shin DS, Carneiro B, Chandra S, et al. Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies. *Oncotarget*. 2016; 7(26):40767-80.
129. Chang YT, Tsai HL, Kung YT, Yeh YS, Huang CW, Ma CJ, et al. Dose-dependent relationship between metformin and colorectal cancer occurrence among patients with type 2 diabetes - A Nationwide Cohort Study. *TranslOncol*. 2018;11(2):535-41.
130. Al Omari A, Abdelkhaleq H, Al-Hussaini M, Turfa R, Awad N, Hassan MM, et al. Validation of the survival benefits of metformin in middle eastern patients with type II diabetes mellitus and colorectal cancer. *J Glob Oncol*. 2018;4:1-10.
131. Meng F, Song L, Wang W. Metformin improves overall survival of colorectal cancer patients with diabetes: a meta-analysis. *J Diabetes Res*. 2017;2017:5063239.
132. Mogavero A, Maiorana MV, Zanutto S, Varinelli L, Bozzi F, Belfiore A, et al. Metformin transiently inhibits colorectal cancer cell proliferation as a result of either AMPK activation or increased ROS production. *Sci Rep*. 2017;7(1):15992.
133. Kim JH, Lee KJ, Seo Y, Kwon JH, Yoon JP, Kang JY, et al. Effects of metformin on colorectal cancer stem cells depend on alterations in glutamine metabolism. *Sci Rep*. 2018;8(1):409.
134. Coyle C, Cafferty FH, Vale C, Langley RE. Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2016;27(12):2184-95.
135. Morgillo F, Fasano M, Della Corte CM, Sasso FC, Papaccio F, Viscardiet G, et al. Results of the safety run-in part of the METAL (METformin in Advanced Lung cancer) study: a multicentre, open-label phase I-II study of metformin with erlotinib in second-line therapy of patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *ESMO Open*. 2017;2(2):e000132.
136. Chuang MC, Yang YH, Tsai YH, Hsieh MJ, Lin YC, Lin CK, et al. Survival benefit associated with metformin use in inoperable non-small cell lung cancer patients with

- diabetes: A population-based retrospective cohort study. *PloS One*. 2018; 13(1):e0191129.
137. Smiechowski BB, Azoulay L, Yin H, Pollak MN, Suissa S. The use of metformin and the incidence of lung cancer in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012;36(1):124-9.
 138. Cao X, Wen ZS, Wang XD, Li Y, Liu KY, Wang X. The Clinical effect of metformin on the survival of lung cancer patients with diabetes: a comprehensive systematic review and meta-analysis of retrospective studies. *J Cancer*. 2017;8(13):2532-41.
 139. Marrone KA, Zhou X, Forde PM, Purtell M, Brahmer JR, Hann CL, et al. A randomized phase II study of metformin plus Paclitaxel/Carboplatin/Bevacizumab in patients with chemotherapy-naïve advanced or metastatic nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2018 ;23(7):859-65.
 140. Kitazono S, Takiguchi Y, Ashinuma H, Saito-Kitazono M, Kitamura A, Chiba T, et al. Effect of metformin on residual cells after chemotherapy in a human lung adenocarcinoma cell line. *Int J Oncol*. 2013;43(6):1846-54.
 141. Shackelford DB, Abt E, Gerken L, Vasquez DS, Seki A, Leblanc M, et al. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell*. 2013;23(2):143–58.
 142. Zhang Y, Feng X, Li T, Yi E, Li Y. Metformin synergistic pemetrexed suppresses non-small-cell lung cancer cell proliferation and invasion in vitro. *Cancer Med*. 2017;6(8):1965-75.
 143. Zhao Z, Cheng X, Wang Y, Han R, Li L, Xiang T, et al. 2014. . 2014;9(4):e95884.
 144. Teixeira SF, Guimarães Idos S, Madeira KP, Daltoé RD, Silva IV, Rangel LB. Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. *J Bras Pneumol*. 2013;39(6):644-9.
 145. Morgillo F, Sasso FC, Della Corte CM, Vitagliano D, D’Aiuto E, Troiani T, et al. Synergistic effects of metformin treatment in combination with gefitinib, a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, in LKB1 wild-type NSCLC cell lines. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3508-19.
 146. Storozhuk Y, Hopmans SN, Sanli T, Barron C, Tsiani E, Cutz JC, et al. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK. *Br J Cancer*. 2013;108(10):2021-32
 147. Li L, Han R, Xiao H, Lin C, Wang Y, Liu H, et al. 2014. Metformin sensitizes EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells in vitro and in vivo through inhibition of IL-6 signaling and EMT reversal. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2714–26.
 148. Mukherjee P, Mulrooney TJ, Marsh J, Blair D, Chiles TC, Seyfried TN. Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain. *Mol Cancer*. 2008;7:37.
 149. Landau BR, Laszlo J, Stengle J, Burk D. Certain metabolic and pharmacologic effects in cancerpatients given infusions of 2-deoxy-D-glucose. *J Natl Cancer Inst*. 1958;21(3):485-94.

150. Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2004;53:116–22.
151. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Viola G, Della Puppa A, Cavallini L, et al. Hypoxia and succinate antagonize 2-deoxyglucose effects on glioblastoma. *BiochemPharmacol.* 2010;80:1517–27.
152. Staab A, Loffler J, Said HM, Katzer A, Beyer M, Polat B, et al. Modulation of glucose metabolism inhibits hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). *StrahlentherOnkol.* 2007;183:366–73.
153. Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, et al. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:3049–58.
154. Dwarakanath BS, Singh D, Banerji AK, Sarin R, Venkataramana NK, Jalali R, et al. Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: Present status and future prospects. *J Cancer Res Ther.* 2009;5(Suppl 1):S21–6.
155. Brban S, Schulze HO. The effects of 2-deoxyglucose on the growth and metabolism of cultured human cells. *J Biol Chem.* 1961;236:1887-90.
156. Kang HT, Hwang ES. 2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sci.* 2006;78(12):1392-9.
157. Koltai T. Finding a role for 2-deoxyglucose in cancer treatment [homepage on the Internet]. Research gate [update 2019 May 23; cited 2018 Oct 20]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/315527289_FINDING_A_ROLE_FOR_2-DEOXYGLUCOSE_IN_CANCER_TREATMENT.
158. Ciavardelli D, Rossi C, Barcaroli D, Volpe S, Consalvo A, Zucchelli M, et al. Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death Dis.* 2014;5(7):e1336
159. Ramírez-Peinado S, Alcázar-Limones F, Lagares-Tena L, El Mjiyad N, Caro-Maldonado A, Tirado OM, et al. 2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 2011;71(21):6796-806.
160. Ahmad IM, Abdalla MY, Aykin-Burns N, Simons AL, Oberley LW, Domann FE, et al. 2-Deoxyglucose combined with wild-type p53 overexpression enhances cytotoxicity in human prostate cancer cells via oxidative stress. *Free RadicBiol Med.* 2008;44(5):826-34.
161. Lea MA, Chacko J, Bolikal S, Hong JY, Chung R, Ortega A, et al. Addition of 2-deoxyglucose enhances growth inhibition but reverses acidification in colon cancer cells treated with phenformin. *Anticancer Res.* 2011;31(2):421-6.
162. Coleman MC, Asbury CR, Daniels D, Du J, Aykin-Burns N, Smith BJ, et al. 2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free RadicBiol Med.* 2008;44(3):322-31.

163. Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P, et al. Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res.* 2006;26(5A):3561-6.
164. Raez LE, Papadopoulos K, Ricart AD, Chiorean EG, Dipaola RS, Stein MN, et al. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71(2):523–30.
165. Zhang D, Fei Q, Li J, Zhang C, Sun Y, Zhu C, et al. 2-Deoxyglucose reverses the promoting effect of insulin on colorectal cancer cells in vitro. *PLoS One.* 2016; 11:e0151115.
166. Muley P, Olinger A, Tummala H. 2-Deoxyglucose induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells independent of its glycolysis inhibition. *Nutr Cancer.* 2015;67(3):514-22.
167. Sinthupibulyakit C, Ittarat W, St Clair WH, St Clair DK. p53 Protects lung cancer cells against metabolic stress. *Int J Oncol.* 2010;37(6):1575-81.
168. Zhu J, Zheng Y, Zhang H, Sun H. Targeting cancer cell metabolism: The combination of metformin and 2-Deoxyglucose regulates apoptosis in ovarian cancer cells via p38 MAPK/JNK signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2016;8(11):4812-21.
169. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.* 2016;16(10):635-49.
170. Ben Sahara I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, et al. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2010;70(6):2465-75.
171. Hou XB, Li TH, Ren ZP, Liu Y. Combination of 2-deoxy d-glucose and metformin for synergistic inhibition of non-small cell lung cancer: A reactive oxygen species and P-p38 mediated mechanism. *Biomed Pharmacother.* 2016;84(2):1575-84.
172. Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett.* 2007;247(1):26–39.
173. Al-Ansari MM, Aboussekhra A. Caffeine mediates sustained inactivation of breast cancer-associated myofibroblasts via up-regulation of tumor suppressor genes. *PLoS One.* 2014;9(3):e90907.
174. Rosendahl AH, Perks CM, Zeng L, Markkula A, Simonsson M, Rose C, et al. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor and insulin-like growth factor I receptor levels in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(8):1877-87.
175. Gururajanna B, Al-Katib AA, Li YW, Aranha O, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. Molecular effects of taxol and caffeine on pancreatic cancer cells. *Int J Mol Med.* 1999;4(5):501–7.
176. Bessler H, Salman H, Bergman M, Djaldetti M. Caffeine alters cytokine secretion by PBMC induced by colon cancer cells. *Cancer Invest.* 2012;30(2):87–91.
177. Saito Y, Gopalan B, Mhashilkar AM, Roth JA, Chada S, Zumstein L, et al. Adenovirus-mediated PTEN treatment combined with caffeine produces a synergistic therapeutic effect in colorectal cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2003;10(11):803–13.

178. Schmit SL, Rennert HS, Rennert G, Gruber SB. Coffee consumption and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(4):634-9.
179. Mhaidat NM, Alzoubi KH, Al-Azzam SI, Alsaad AA. Caffeine inhibits paclitaxel-induced apoptosis in colorectal cancer cells through the upregulation of Mcl-1 levels. *Mol Med Rep.* 2014;9(1):243-8.
180. Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102(6):543–51.
181. Liu H, Zhou Y, Tang L. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):2445-54.
182. Jang MH, Shin MC, Kang IS, Baik HH, Cho YH, Chu JP, et al. Caffeine induces apoptosis in human neuroblastoma cell line sk-n-mc. *J Korean Med Sci.* 2002;17(5):674–8.
183. Dai Y, Yu C, Singh V, Tang L, Wang Z, McInistry R, et al. Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (mapk) kinase/mapk cascade interact synergistically with ucn-01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res.* 2001;61(13):5106–15.
184. Ku BM, Lee YK, Jeong JY, Ryu J, Choi J, Kim JS, et al. Caffeine inhibits cell proliferation and regulates PKA/GSK3beta pathways in U87MG human glioma cells. *Mol Cells.* 2011;31(3):275–9.
185. Miwa S, Sugimoto N, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Ohnari I, et al. Caffeine activates tumor suppressor PTEN in sarcoma cells. *Int J Oncol.* 2011;39(2):465–72.
186. Hashimoto T, He Z, Ma WY, Schmid PC, Bode AM, Yang CS, et al. Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res.* 2004;64(9):3344–9.
187. Tolmach LJ, Jones RW, Busse PM. The action of caffeine on x-irradiated Hela cells. I. Delayed inhibition of DNA synthesis. *Radiat Res.* 1977;71(3):653–65.
188. Aliwaini SH, Dawas SA, Abu Tayem HEM, Aljoujou SH, Al-Qatati, AS. Combined caffeine and cisplatin treatment induces synergistic cytotoxicity in HeLa cell Line. *IUG J Nat Stud.* 2017;25:250–6.
189. Jha MN, Bamburg JR, Bernstein BW, Bedford JS. Caffeine eliminates gamma-ray-induced g2-phase delay in human tumor cells but not in normal cells. *Radiat Res.* 2002;157(8):26–31.
190. Ohsaki Y, Ishida S, Fujikane T, Akiba Y, Osanai S, Onodera S. Combination effect of caffeine and cisplatin on a cisplatin resistant human lung cancer cell line. *GanTo Kagaku Ryoho.* 1990;17(7);1339-43 .
191. Qi W, Qiao D, Martinez JD. Caffeine induces tp53-independent g(1)-phase arrest and apoptosis in human lung tumor cells in a dose-dependent manner. *Radiat Res.* 2002;157(2):166–74.
192. Wang G, Bhoopalan V, Wang D, Wang L, Xu X. The effect of caffeine on cisplatin induced apoptosis of lung cancer cells. *ExpHematolOncol.* 2015;4:5.

193. Bonavida B. Nitric oxide (NO) and cancer: prognosis, prevention, and therapy. New York: Springer; 2010.
194. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000;50(1-2):139–48.
195. Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17(1):91–106.
196. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis.* 1998;11(5):711–21.
197. de Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol.* 1995;8(3):473–7.
198. Matthews NE, Adams MA, Maxwell LR, Gofton TE, Graham CH. Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(24):1879-85.
199. Frederiksen LJ, Sullivan R, Maxwell LR, Macdonald-Goodfellow SK, Adams MA, Bennett BM, et al. Chemosensitization of cancer in vitro and in vivo by nitric oxide signaling. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2199-206.
200. Frederiksen LJ, Siemens DR, Heaton JP, Maxwell LR, Adams MA, Graham CH. Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate. *J Urol.* 2003;170(3):1003-7.
201. Millet A, Bettaieb A, Renaud F, Prevotat L, Hammann A, Solary E, et al. Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cells. *Gastroenterology.* 2002;123(1):235-46.
202. Cortier M, Boina-Ali R, Racœur C, et al. H89 enhances the sensitivity of cancer cells to glyceryl trinitrate through a purinergic receptor-dependent pathway. *Oncotarget.* 2015;6(9):6877-86.
203. Dingemans AM, Groen HJ, Herder GJ, Stigt JA, Smit EF, Bahce I, et al. A randomized phase II study of paclitaxel-carboplatin-bevacizumab (PCB) with or without nitroglycerin patches (NTG) in patients (pts) with stage IV nonsquamous non-small cell lung cancer (NSCLC): Nvalt 12 (NCT01171170). *Ann Oncol.* 2015;26(11):2286-93.
204. Leon-Bollotte L, Subramaniam S, Cauvard O, Plenchette-Colas S, Paul C, Godard C, et al. S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology.* 2011;140(7):2009–18.

О АУТОРУ

Весна Зељковић рођена је 03. новембра 1981. године у Зрењанину. Основну школу завршила је 1996. године као носилац Вукове дипломе. Исте године уписала је Зрењанинску Гимназују, природно-математичког смера, коју је завршила 2000. године са одличним успехом и као носилац Вукове дипломе.

Медицински факултет у Новом Саду, одсек фармација, уписала је 2000. године и на њему положила све испите предвиђене Планом и програмом Факултета са просечном оценом 9,22. Дипломирала је 01. јуна 2006. године, са оценом десет. Аутор је дипломског рада „Хемоглобин, структура, особине, механизам деловања и поремећаји метаболизма“, под менторством проф. др Јеле Бороте. Током студија била је стипендиста Министарства за науку и технологију Републике Србије.

Након завршеног факултета најпре је радила у апотеци „Лаурус“, а потом и у фармацеутској компанији Pharmaswiss, а од 2010. године у фармацеутској компанији Алкалоид АД Скопље.

Уписала је докторске студије Клиничке медицине на Медицинском факултету школске 2011/2012. године. У научно звање истраживач-приправник изабрана је 2016. године. Тема докторске тезе „Дејство метформина и нитроглицерина са 2-деокси-Д-глукозом и кофеином на одабраним ћелијским културама“ прихваћена је 2017. године.

Током израде доктората била је део више пројеката од којих се издваја колаборација са Јејл (Yale) Универзитетом, као и учешће у пројекту од значаја за науку и технолошки развој АП Војводине под називом „Ефикасна, селективна, нетоксична антитуморска терапија наноинкапсулацијом, циљаним погађањем антиканцерских мета и *PET/CT* праћењем болесника” (чији је носилац проф. др Јован Поповић).

Коаутор је једног рада објављеног у интернационалном часопису категорије М21, као и више извода на међународним скуповима.

Поносна је мајка ћерке Искре (4).